

Zellbiologische Effekte aktivierter Gerinnungsfaktoren auf Tumorzellen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Momme Denker

Kiel, 2011

Referent:	Prof. Dr. T. Kunze
Koreferent/in:	Prof. Dr. S. Sebens
Tag der mündlichen Prüfung:	08.12.2011
Zum Druck genehmigt:	Kiel, den 14.12.2011

Prof. Dr. L. Kipp
(Dekan)

In Liebe für Katharina

Gefördert von der DFG GI (152/4-1) und GI (152/5-1)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
<hr/>	
1.1	Tumorerkrankungen 1
1.2	Charakteristika der Tumorentstehung 1
1.2.1	Einfluss von Genmutationen auf die Tumorentstehung 1
1.2.2	Tumorgene 2
1.2.3	Genomische Stabilität und DNA-Reparatursysteme 3
1.2.4	Verlust der Transkriptionskontrolle 4
1.2.5	Proliferation 5
1.2.6	Apoptose und Apoptoseschutz 7
1.2.7	Ansprechen auf Zytostatika 10
1.2.8	Epitheliale-mesenchymale Transition 13
1.2.9	Metastasierung 16
1.2.9.1	Maligne Ergüsse 17
1.2.9.2	Prokoagulatorischer Status im Serum und in malignen Ergüssen 18
1.2.9.3	Thrombin 19
1.2.9.4	Faktor Xa 21
1.2.9.5	Proteinase-aktivierte Rezeptoren 22
1.3	Therapeutische Ansätze zur Behandlung maligner Ergüsse 26
1.3.1	Klinische Praxis 26
1.4	Zielsetzung der Arbeit 28
2 Material und Methoden	29
<hr/>	
2.1	Material 29
2.1.1	Geräte 29
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien 30

2.1.3	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.4	Antikörper	33
2.1.5	Primer	33
2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellbiologische Methoden	35
2.2.1.1	Zelllinien	35
2.2.1.2	Zellkultur	35
2.2.1.3	Aufarbeitung von Ergüssen und Kultivierung isolierter Zellen	37
2.2.1.4	Mikroskopie und Fotografie	37
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	38
2.2.2.1	Fibrinfärbung nach Weigert	38
2.2.2.2	Herstellung von Ganzzelllysaten	38
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung aufgearbeiteter Proteine	39
2.2.2.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.2.2.5	Proteintransfer (Western-Blotting)	40
2.2.2.6	Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper	41
2.2.3	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus humanen Zellen	42
2.2.3.2	Reverse Transkription (RT)	43
2.2.3.3	Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)	43
2.2.4	Analytische Methoden	44
2.2.4.1	Koagulometrie	44
2.2.4.2	Bestimmung der Proteaseaktivität mit chromogenen Peptidsubstraten	45
2.2.4.3	Chromogener Assay zur Bestimmung der FIIa-Aktivität	47
2.2.4.4	Chromogener Assay zur Bestimmung der FXa-Aktivität	48
2.2.4.5	Proteaseaktivitätsstudien in malignen Ergüssen	49
2.2.4.6	Alamar Blue Assay	49
2.2.4.6.1	Etablierung des Alamar Blue Assays	50
2.2.4.6.2	Bestimmung der IC ₅₀ der Zytostatika	51

2.2.4.6.3	Alamar Blue Assay: Einfluss des Ergusses auf Zellwachstum und Ansprechen auf Zytostatika	51
2.2.4.6.4	Alamar Blue Assay: Einfluss von PAR-Agonisten auf Zellwachstum und Chemosensitivität	53
2.2.4.7	MTS-Proliferationsassay	53
2.2.4.8	Transwell-Migrationsassay	55
2.2.4.9	Wundheilungs-Migrationsassay / <i>Scratch</i> -Assay	57
2.2.5	Immunologische Untersuchungen	58
2.2.5.1	Immunfluoreszenzfärbung auf Deckgläschen	58
2.2.5.2	Immunfluoreszenzfärbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie	59
3	Ergebnisse	61
<hr/>		
3.1	Nachweis eines aktivierten Gerinnungssystems im Ergussmilieu	61
3.1.1	Charakterisierung der verwendeten Ergüsse	61
3.1.2	Spontane Fibrinogenese im frischen Ergussmaterial	64
3.1.3	Ergüsse enthalten Gerinnungsfaktoren der extrinsischen Kaskade	64
3.1.4	FIIa und FXa liegen im punktierten Erguss inaktiv vor	66
3.2	<i>In-vitro</i> Untersuchungen an Zelllinien und Zellen aus Ergüssen	70
3.2.1	Zellen aus malignen Ergüssen exprimieren PAR-1/2 Rezeptoren	70
3.2.2	Fötales Kälberserum enthält aktive Gerinnungsfaktoren	71
3.2.3	Expression und Lokalisation von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren in den Modellzelllinien	72
3.2.4	Zellwachstums- und Zytotoxizitätsstudien	76
3.2.4.1	Etablierung des Alamar Blue Assays	76
3.2.4.2	Titration der IC ₅₀ für Carboplatin und Doxorubicin	77
3.2.4.3	Ergüsse beeinflussen Zellwachstum und Chemosensitivität von THP-1 Zellen uneinheitlich	78
3.2.4.4	Der Einfluss der Ergüsse auf Zellwachstum und Ansprechen auf Carboplatin korreliert mit der enthaltenen FII-Aktivität	84
3.2.4.5	Einfluss von PAR-Agonisten auf das Zellwachstum und die Chemosensitivität von PANC-1 und THP-1 Zellen	88

3.2.4.6	Einfluss von PAR-Agonisten auf die Proliferation von PANC-1 Zellen (MTS-Assay)	90
3.2.4.7	Lepirudin und Rivaroxaban haben keinen Einfluss auf den proliferationsmodulierenden Effekt von Ergüssen auf PANC-1 Zellen	92
3.2.5	FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV aktivieren PAR-1/2 Rezeptoren	94
3.2.6	Stimulation von PANC-1 Zellen mit PAR-Agonisten induziert eine spindelförmige Morphologie und ein verändertes Migrationsverhalten	95
3.2.7	Erhöhte Migrationsfähigkeit von HPDE und PANC-1 Zellen durch Stimulation mit PAR-Agonisten	98
3.2.8	PAR-Agonisten beeinflussen die Expression von EMT-assoziierten Markerproteinen in HPDE und PANC-1 Zellen nicht	100
3.2.9	PAR-Agonisten und Erguss führen in HPDE und PANC-1 Zellen zu einer Delokalisierung von E-Cadherin, die mit einer Auflösung von Zell-Zell-Kontakten einhergeht	107
4	Diskussion	113
4.1	Nachweis eines aktivierten Gerinnungssystems im Ergussmilieu	114
4.2	Nachweis von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren auf Patientenzellen und Zelllinien	117
4.3	Einfluss von Ergüssen auf Proliferation und Chemosensitivität von THP-1 Zellen	118
4.4	Einfluss von FIIa, FXa und PAR-Agonisten auf die Proliferation und Chemosensitivität von PANC-1 und THP-1 Zellen	122
4.5	FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV aktivieren PAR-1/2 Rezeptoren	127
4.6	FIIa, FXa, PAR-Agonisten und Erguss führen in HPDE und PANC-1 Zellen zu EMT-ähnliche Veränderungen	128
4.6.1	Stimulation von PANC-1 Zellen mit PAR-Agonisten führt zu einer spindelförmigen Morphologie und einem veränderten Migrationsverhalten	128
4.6.2	Einfluss von PAR-Agonisten auf das Migrationsverhalten von HPDE und PANC-1 Zellen	129

4.6.3	Das erhöhte Migrationsverhalten von HPDE und PANC-1 Zellen nach Stimulation mit PAR-Agonisten beruht nicht auf einer veränderten Expression EMT-assoziiierter Proteine	131
4.6.4	PAR-Agonisten führen zu einer Delokalisierung von E-Cadherin in HPDE und PANC-1 Zellen	132
5	Zusammenfassung	137
6	Literaturverzeichnis	139
	Danksagung	165
	Lebenslauf	167
	Erklärung zu §10 Abs. 2 der Promotionsordnung	169
	Summary	171

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3'UTR	3' untranslatierte Region
α -SMA	<i>α-Smooth muscle actin</i> ; α -Smooth Muscle Actin
Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivatorprotein 1
APAF-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i> ; Apoptose-Protease-aktivierender Faktor 1
APC-EPCR	Aktiviertes Protein C + endothelialer Protein C Rezeptor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT III	Antithrombin III
ATCC	American Type Culture Collection
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated kinase</i> ; Ataxia-Telangiectasia-mutierte Kinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and rad-3-related kinase</i> ; ATM- und rad-3-verwandte Kinase
ATU	<i>Anti thrombin unit</i> ; Antithrombineinheit
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer protein</i> ; Bcl-2-homologer Antagonist/Killer
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i> ; Bcl-2-assoziiertes X-Protein
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i> ; B-Zell Lymphomprotein 2
BMP	<i>Bone morphogenic protein</i> ; Knochen morphogenetische Proteine
bp	<i>Base pair</i> ; Basenpaar
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C1s	Komplementprotein C1s
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARD	<i>Caspase recruitment domain-containing protein</i> ; Rezeptordomäne
CD95/ Fas	<i>Tumor necrosis receptor superfamily, member 6</i> ; Todesrezeptor
CD95L	Fas-Ligand
CDH1	<i>Cadherin 1</i> ; E-Cadherin
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i> ; Cyclin-abhängige Kinase
CDKI	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor</i> ; Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor
cDNA	<i>Complementary DNA</i> ; Rekombinante Desoxyribonukleinsäure
cIAP-1/2	<i>Cellular inhibitors of apoptosis 1 and 2</i> ; Zelluläre Apoptoseinhibitoren 1 und 2
c-Jun	Protein, Teil des Transkriptionsfaktors AP-1
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2

CP	<i>Crossing point</i> ; Kreuzungspunkt zur Auswertung der Echtzeit-PCR
DD	<i>Death domain</i> ; Todesdomäne
DDR	<i>DNA damage response</i> ; DNS-Reparatursystem
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i> ; DNS-abhängige Proteinkinase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> ; Epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal growth factor</i> ; Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
ELISA	<i>Enzym-linked immune sorbent assay</i> ; Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
Em	<i>Emission</i> ; Emissionswellenlänge
EMT	<i>Epithelial-mesenchymal transition</i> ; Epitheliale-mesenchymale Transition
ERCC1-3	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency 1-3</i> ; Exzisionsreparaturenzym 1-3
ERK1/2; p44/42	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> ; Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2; p44/42
Ex	<i>Excitation</i> ; Anregungswellenlänge
EZM	Extrazellulärmatrix
F1+2	Prothrombinfragmente 1 +2
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> ; Durchflusszytometrie
FADD	<i>FAS-associated death domain protein</i> ; Fas-assoziierte Todesdomäne
FADH ₂	Flavinadenindinukleotid
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i> ; Fokale Adhäsionskinase
Fas/ CD95	<i>Tumor necrosis receptor superfamily, member 6</i> ; Todesrezeptor
FCS	<i>Fetal calf serum</i> ; Fötales Kälberserum
FEU	<i>Fibrinogen equivalent units</i> ; Fibrinogen-Äquivalenz Einheiten
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> ; Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FII / FIIa	Gerinnungsfaktor II inaktiv (Prothrombin) / aktiv (Thrombin)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMNH/ FMNH ₂	Flavinmononukleotid Semichinonform
FPA+B	Fibrinopeptide A+B
FV, FVa	Gerinnungsfaktor II (Proaccelerin) inaktiv / aktiv
FVII, FVIIa	Gerinnungsfaktor VII (Proconvertin) inaktiv / aktiv
FX, FXa	Gerinnungsfaktor X (Stuart-Prower-Faktor) inaktiv / aktiv
GnRH II	<i>Gonadotropin releasing hormone Typ II</i> ; Gonadotropin freisetzendes Hormone Typ II
GRK3/ 5	<i>G protein-coupled receptor kinase 3/5</i> ; G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 3/5
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferasen

Abkürzungsverzeichnis

GYPGQV	Hexapeptid: Glycin, Tyrosin, Prolin, Glycin, Glutamin, Valin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> ; Leberzellenwachstumsfaktor
HHV-8	Humanes Herpesvirus Typ 8
HPDE	Humane pankreatische duktale Epithelzelllinie
HPV-16	Humanes Papillomavirus-16
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
HSP90 α/β	Hitzeschockprotein 90 alpha/beta Isoform
ICAD	<i>Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease</i> ; Inhibitor der Caspase aktivierten DNase
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i> ; Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICD-10	<i>International Classification of Diseases, 10th Revision</i> ; Internationale Klassifikation der Krankheiten, 10. Ausgabe
IgG	Immunglobulin G
IL-1/6/8	Interleukin 1/6/8
Jab1	<i>Jan kinase binding protein 1</i> ; Januskinase-bindendes Protein 1
JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i> ; c-Jun N-terminale Kinase
Jun-D	<i>Jun D proto-oncogene</i> ; Jun D Protoonkogen
KSFM	Keratinozyten serumfreies Medium
Λ_{EM}	Emissionswellenlänge
Λ_{EX}	Anregungswellenlänge
l	Liter
L1CAM	<i>L1 cell adhesion molecule</i> ; L1 Zelladhäsionsmolekül
LMWH	<i>Low molecular weight heparin</i> ; Niedermolekulares Heparin
LRP	Lungenresistenzprotein
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Mikromol pro Liter
mA	Milliampere
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein-1</i> ; Monozyten chemotaktisches Protein-1
MDM2	<i>Murine double minute 2 gene</i> ; Maus <i>double-minute 2</i> Gen
MDR	<i>Multi drug resistance</i> ; Multidrug-Resistenz
MEKK	<i>Mitogen effector kinase kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Kinase-Kinase
min	Minute
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i> ; Mikro RNA
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter

MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i> ; Moloney-Maus-Leukämie-Virus
MMP /-1	Matrixmetalloproteinase /-1
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> ; Mitochondrienmembran-Permeabilisierung
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
MRP1-9	<i>Multidrug resistance related protein 1-9</i> ; Multidrug-Resistenz Protein 1-9
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i> ; Ziel des Rapamycins im Säugetier
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MTX	Methotrexat
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaN ₂	Natriumazid
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i> ; Transkriptionsfaktor-κB
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control, Hearts, UK</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
NRF	<i>NF-κB-repressing factor</i> ; NF-κB reprimierender Faktor
NSCLC	<i>Non small cell lung cancer</i> ; Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
OD	<i>Optical density</i> ; Optische Dichte
p27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i> ; Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen 1B
p44/42; ERK1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> ; Extrazellulär regulierte Kinasen 1/2; p44/42
p53	<i>Tumor protein 53</i> ; Tumorsuppressorprotein 53
PAA	Polyacrylamid
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	Plasmingenaktivator-Inhibitor 1
PAK2	<i>p21-activated kinase 2</i> ; p21-aktivierte Proteinkinase 2
PANC-1	Humane pankreatische Karzinomzelllinie
PAR-1/2/3/4	Proteinase-aktivierter Rezeptor-1/2/3/4
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Salzlösung
PC / aPC	Protein C inaktiv / aktiv
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i> ; Thrombozytenwachstumsfaktor
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i> ; Thrombozytenwachstumsfaktor-Rezeptor
PE	Phycoerythrin

Abkürzungsverzeichnis

PEG	Polyethylenglykol
pERK1/2; phospho-p42/44	<i>Phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 / p44/42</i> ; Phosphorylierte extrazellulär regulierte Kinase 1/2 / p44/42
Pgp	P-Glykoprotein
PI3K/Akt	Phosphoinositol-3-phosphat/Proteinkinase B-Signalweg
PKC	Proteinkinase C
PMS	Phenazinmethosulfat
pNA	p-Nitroanilin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	<i>Retinoblastoma protein</i> ; Retinoblastom-Protein
RFU	<i>Relative fluorescence units</i> ; Relative Fluoreszenzeinheiten
RHE	Rinderhypophysenextrakt
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i> ; Ras-homologe Genfamilie Mitglied A
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i> ; RNA-induced Silencing Komplex
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium Nr. 1640
SCLC	<i>Small cell lung cancer</i> ; Kleinzelliges Bronchialkarzinom
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumlaurylsulfat
SFLLRN	Hexapeptid: Serin, Phenylalanin, Leucin, Leucin, Arginin, Asparagin
SIP1	<i>Smad-interacting protein 1</i> ; Transkriptionsfaktor
siRNA	<i>Small interfering RNA</i> ; Kleine interferierenden RNA
SLIGKV	Hexapeptid: Serin, Leucin, Isoleucin, Glycin, Lysin, Valin
Slug	Transkriptionsfaktor
Snail	Transkriptionsfaktor
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAT	Thrombin-Antithrombin-Komplex
TBP	<i>TATA box binding protein</i> ; TATA-Box-bindendes Protein
TBS	<i>Tris buffered saline</i> ; TRIS-gepufferter Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	<i>Tissue factor</i> ; Gewebethromboplastin/Gerinnungsfaktor III
TGF- β	<i>Transforming growth factor-beta</i> ; Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TGF- β 1	<i>Transforming growth factor-β1</i> ; Transformierender Wachstumsfaktor- β 1
THP-1	Humane Leukämiezelllinie
TM	Thrombomodulin
TNF α / β	<i>Tumor necrosis factor α/β</i> ; Tumornekrosefaktor α / β
TP53	p53-Gen
TPZ	Thromboplastinzeit
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain</i>
TRAF-2	<i>TNF-receptor associated factor 2</i> ; TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor-2

TRAP	Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Twist	Transkriptionsfaktor
U	<i>NIH Unit</i> ; NIH Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UK-SH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
V. a.	Verdacht auf
VAD	Therapieschema: Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion protein-1</i> ; Vaskuläres Zelladhäsionsprotein-1
VEC	<i>Vascular endothelial cadherin</i> ; Vaskuläres endotheliales Cadherin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> ; Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i> ; Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
VMAT	Vesikulärer Monoamintransporter
VTE	Venöse Thromboembolie
v/v	Volumenprozent pro Volumen
w/v	Massenprozent pro Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i> ; Weltgesundheitsorganisation
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium</i> ; Wasserlösliches Tetrazoliumsalz-1
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-((phenylamino)carbonyl)-2H-tetrazoliumhydroxid
ZEB-1	<i>Zinc finger E-box-binding homebox 1</i> ; Transkriptionsfaktor

1 Einleitung

1.1 Tumorerkrankungen

Laut dem Statistischen Bundesamt stellten Tumorerkrankungen mit 26 % in Deutschland im Jahr 2009 nach den Erkrankungen des Kreislaufsystems mit 42 % die zweithäufigste Todesursache nach ICD-10 Klassifikation der WHO dar [1]. Unter diesen Todesfällen dominierten bei Frauen 2006 (197.600 Neuerkrankungen) Tumoren der Brustdrüse mit 29,3 %, des Darmes mit 16,4 % und der Lungen mit 7,4 %, während bei Männern 2006 (229.200 Neuerkrankungen) Tumorlokalisationen besonders in der Prostata mit 26,2 %, dem Darm mit 15,8 % und der Lunge mit 14,2 % diagnostiziert wurden [2].

1.2 Charakteristika der Tumorentstehung

1.2.1 Einfluss von Genmutationen auf die Tumorentstehung

Tumorzellen entstehen durch Mutationen. Mutationen sind permanente, unphysiologische und ungerichtete Veränderungen der DNA. Sie werden nach Ausmaß und Ort unterschieden in Genommutationen, Chromosomenmutationen, Mutationen in repetitiven DNA-Sequenzen und Gen- oder Sequenzmutationen oder in Keimbahnmutationen und somatische Mutationen. Somatische Mutationen betreffen knapp 80 % der Tumorgene, Keimbahnmutationen weitere 10 %, Keimbahn- und somatische Mutationen zusammen die restlichen 10 %.

Eine Mutation kann sich als Funktionsgewinn (*gain of function*) oder Funktionsverlust (*loss of function*) des betroffenen Proteins auswirken. Mutagene, die Krebs verursachen, heißen Kanzerogene oder Karzinogene, wobei nicht alle Mutagene Krebs verursachen und nicht alle Karzinogene mutagen sind. Spontane Mutationen der DNA sind mit einem Basenaustausch pro 10^9 Basen pro Zellgeneration sehr selten, was an den komplexen, effektiven und schnell greifenden Reparaturmechanismen der Zelle liegt sowie der Konservierung der genetischen Information durch die doppelsträngige Bauweise der DNA mit komplementärer Basenpaarung [3].

1.2.2 Tumorgene

Sogenannte Tumorgene sind für die Entstehung von Krebs verantwortlich oder daran beteiligt und können aufgrund unterschiedlicher Funktionsweisen in Onkogene und Tumorsuppressorgene unterteilt werden [4]. Mutierte Gene können ohne Auswirkung auf die Funktion der Tumorzelle bleiben (*passenger mutation*) oder ursächlich für die Entartung der Zelle sein (*driver gene*). Generell gilt es als erwiesen, dass für die Entstehung manifester Tumorerkrankungen eine einzelne genetische Veränderung nicht ausreicht, sondern eine konzertierte Veränderung mehrerer Protoonkogene, Tumorsuppressorgene oder miRNA-Gene erforderlich ist [5]. Ein vielstufiger Prozess unter Umgehung komplexer und effektiver zellulärer Kontrollmechanismen (Abb. 1) gilt als gesichert [6].

Onkogene sind zelluläre oder virale Gene, deren Produkte (Onkoproteine) den Zellzyklus und die Apoptose kontrollieren [5]. Körpereigene Protoonkogene können durch Mutation, Genfusion, Juxtaposition zu Transkriptionsverstärkern oder Überamplifikation einen Funktionsgewinn erfahren und zu tumorigenen Onkogenen werden oder die Tumorprogression vorantreiben [7-9]. Die Proteinprodukte von Tumorsuppressorgenen regulieren wichtige zelluläre Signaltransduktionswege der Zellzykluskontrolle, Apoptose, Genomintegrität und Morphogenese. Sie können als Gegenspieler der Onkogene verstanden werden. Ihr Funktionsverlust führt zu unkontrollierter Zellteilung und Tumorwachstum. Mutatorgene können zusätzlich die Mutationsrate dermaßen stark erhöhen, dass es früher oder später zur Entwicklung einer Tumorerkrankung kommt [10].

Im Jahr 2000 waren bereits hundert potentielle Onkogene und zwanzig Tumorsuppressorgene sowie Mutatorgene identifiziert [5]. So führt eine Mutation im ERBB2 Protoonkogen zur Überexpression der Rezeptortyrosinkinase HER2/neu, was mit Apoptosehemmung und Proliferationsstimulation sowie einer schlechten Prognose bei Brustkrebs assoziiert ist [11]. Mutationen des K-RAS Onkogens führen zu einer ununterbrochenen Signaltransduktion und treten gehäuft bei Darm-, Lungen- und Pankreaskrebs auf [12]. In etwa der Hälfte aller Tumoren können Mutationen im Tumorsuppressorgen TP53 nachgewiesen werden, die zu einem defekten Transkriptionsfaktor p53 und dadurch zu einer Deregulation von Zellzyklus, Apoptose, Migration und Invasion führen [13].

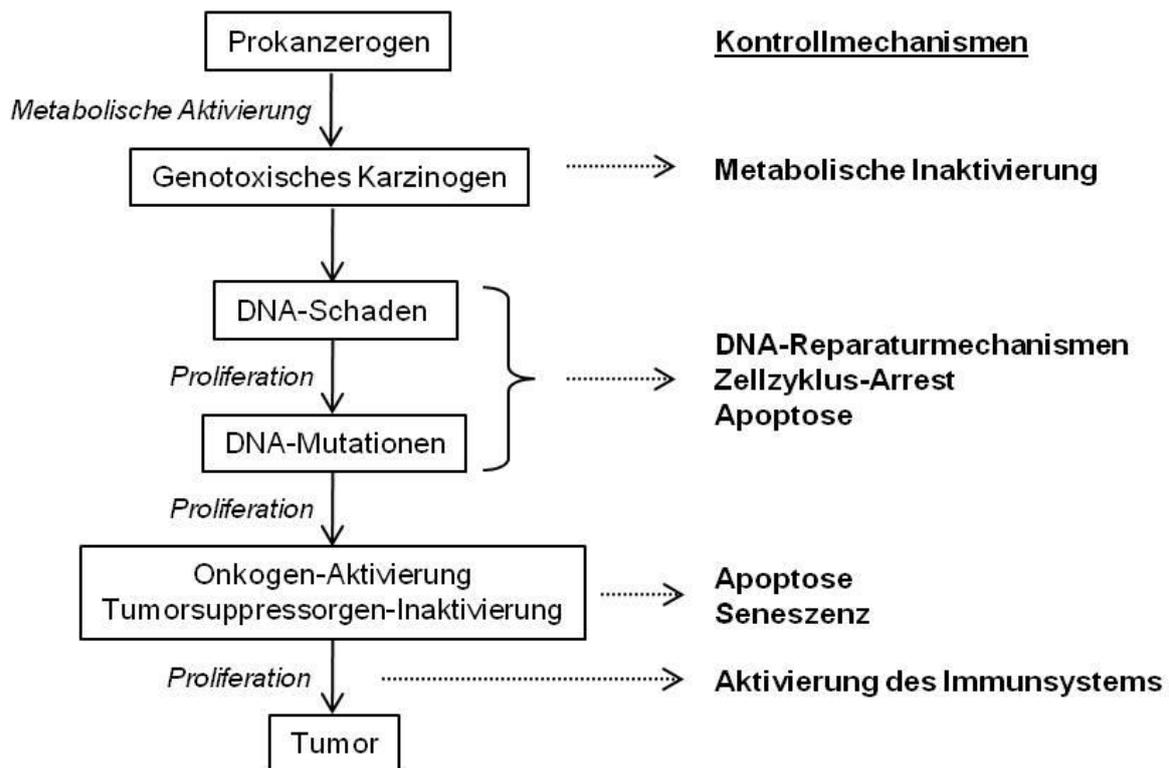


Abbildung 1: Schematische Darstellung der mehrstufigen Tumorigenese sowie der körpereigenen Kontrollmechanismen zur Verhinderung mutierter Zellen. Adaptiert nach [6].

1.2.3 Genomische Stabilität und DNA-Reparatursysteme

Der Erhalt der genetischen Information in jeder einzelnen Zelle ist für das Überleben und die Funktion des Organismus von entscheidender Bedeutung. Eine Vielzahl komplexer zellulärer Mechanismen erkennt (*DNA-damage checkpoint*) und repariert (*DNA-repair*) ungerichtete Veränderungen der genomischen DNA in verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Wird an einem *DNA-damage checkpoint* durch einen Sensor ein DNA-Schaden erkannt, wird die Zellteilung gestoppt (Zellzyklusarrest) und eine Reparatur oder der kontrollierte Zelltod (Apoptose) über *DNA-damage response pathways* initiiert. Den Erfolg einer DNA-Reparatur kontrollieren Erfolgssensoren, die den Zellzyklusarrest aufheben können oder bei erfolgloser oder fehlerhafter Korrektur Apoptose oder Seneszenz auslösen. Betreffen Mutationen Gene, die am DNA-Schadenserkennungssystem oder am Reparatursystem beteiligt sind, pflanzt sich der Fehler mit jeder Zellteilung auf die Tochtergeneration fort: Die genetische Information wird instabil, die Mutationsrate erhöht und das Krebsrisiko steigt drastisch an [3].

1.2.4 Verlust der Transkriptionskontrolle

In Tumoren ist laut Wagener et al. (2010) die Transkription von Genen aufgrund verschiedener Ursachen fehlreguliert [3]:

- Mutationen von Transkriptionsfaktoren können diese ausschalten, am falschen Ort oder zum falschen Zeitpunkt aktivieren, ihre Wirkung verstärken oder die komplette Funktion verändern
- miRNAs sind etwa 22 Nukleotide lange, hochkonservierte, nicht kodierende Ribonukleinsäuresequenzen, die durch Bindung an die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) der mRNA im RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) deren Expression posttranslational verhindern (*gene silencing*) oder den Abbau der mRNA initiieren [14]. Gendelektionen, mutierte miRNAs oder 3'UTR-Deletion in mRNAs führen zu unkontrollierter Translation und Anhäufung des Proteinproduktes und sind mit diversen Tumoren assoziiert [15]
- Signalwege, die in den Transkriptionsapparat münden, können gestört sein und Veränderungen der Transkription verursachen
- Durch Methylierung von Cytosinresten in Promotoren können Gene abgeschaltet werden. Über diesen Mechanismus kann das zweite Allel eines Tumorsuppressorgens abgeschaltet werden, wie für TP53 und miRNAs in diversen Tumoren beschrieben [16, 17]
- Mutationen, die zu Änderungen der Chromatinstruktur führen, tragen entscheidend zur Fehlregulation der Transkription bei. Die Regulation der Chromatinstruktur ist komplex und unterliegt vielen Einflussfaktoren. Phosphorylierungen an Serin- und Threoninresten sind in DNA-Reparaturmechanismen und Chromatinkondensation involviert. Acetylierungen von Lysinresten durch Histon-Acetyltransferasen entfalten das Chromatin und ermöglichen die Translation, während Histondeacetylasen zur Transkriptionsrepression durch Chromatinkompaktierung führen [18]. Bestimmte Mono- bis Trimethylierungsmuster an Lysin- und Argininresten der Histone durch Histon-Methyltransferasen gehen mit Transkriptionsaktivierung oder Transkriptionsrepression einher [19]. Diese epigenetischen Genregulationsmechanismen durch gerichtete oder mutagene posttranslationale Acetylierungen und Methylierungen sind vererbbar und mit diversen Tumorerkrankungen sowie deren Progression assoziiert [20-23]

1.2.5 Proliferation

Gesunde Zellen proliferieren, differenzieren, üben als differenzierte Zelle ihre Funktion aus und können in eine vorübergehende Ruhephase (G_0) eintreten oder durch den programmierten Zelltod (Apoptose) sterben [3]. Nach Hanahan und Weinberg (2000) unterscheiden sich kultivierbare Tumorzellen von gesunden Zellen durch fünf grundlegende Aspekte [24]:

- Tumorzellen benötigen weniger Stimuli durch externe Wachstumsfaktoren, da sie unabhängig von Wachstumsfaktoren wachsen oder die notwendigen Wachstumsfaktoren selbst produzieren. Dadurch sind Zellteilung und Wachstum autonom reguliert
- Tumorzellen haben eine praktisch unbegrenzte Teilungsfähigkeit und wachsen über natürliche Barrieren wie Organgrenzen hinweg
- Erhöhte Resistenz gegen wachstumshemmende und apoptoseinduzierende Signale
- Die Kontaktinhibition gesunder Zellen ist bei Tumorzellen außer Kraft gesetzt
- Häufig sind Defekte in intrazellulären Apoptosesignalwegen zu detektieren

Zwischen zwei Zellteilungen durchlaufen die Zellen die verschiedenen Phasen des Zellzyklus und passieren die drei *DNA-damage checkpoints* [25]. Am Übergang von der G_1 - in die S-Phase befindet sich der wichtigste Checkpoint, der sogenannte *restriction point* (Abb. 2). Wenn die Zelle keine DNA-Schäden aufweist, ausreichend Zellorganellen für die bevorstehende Teilung besitzt und Stimuli durch externe Wachstumsfaktoren wie den Transformierenden Wachstumsfaktor-beta ($TGF-\beta$, *transforming growth factor-beta*) erfährt, kann sie in die S-Phase eintreten. Am G_2/M -Checkpoint wird die Vollständigkeit des replizierten Genoms kontrolliert und ob die Größe der Zelle für eine Teilung ausreicht. Am Anaphase- oder M/G_1 -Checkpoint wird die gleichmäßige Verteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen überprüft. Bei Vorliegen von DNA-Schäden kommt es durch die Serin/Threonin-Kinasen ATR und ATM zum Zellzyklusarrest, der nach erfolgter Reparatur wieder aufgehoben werden kann oder die Zelle geht in die G_0 -Phase über.

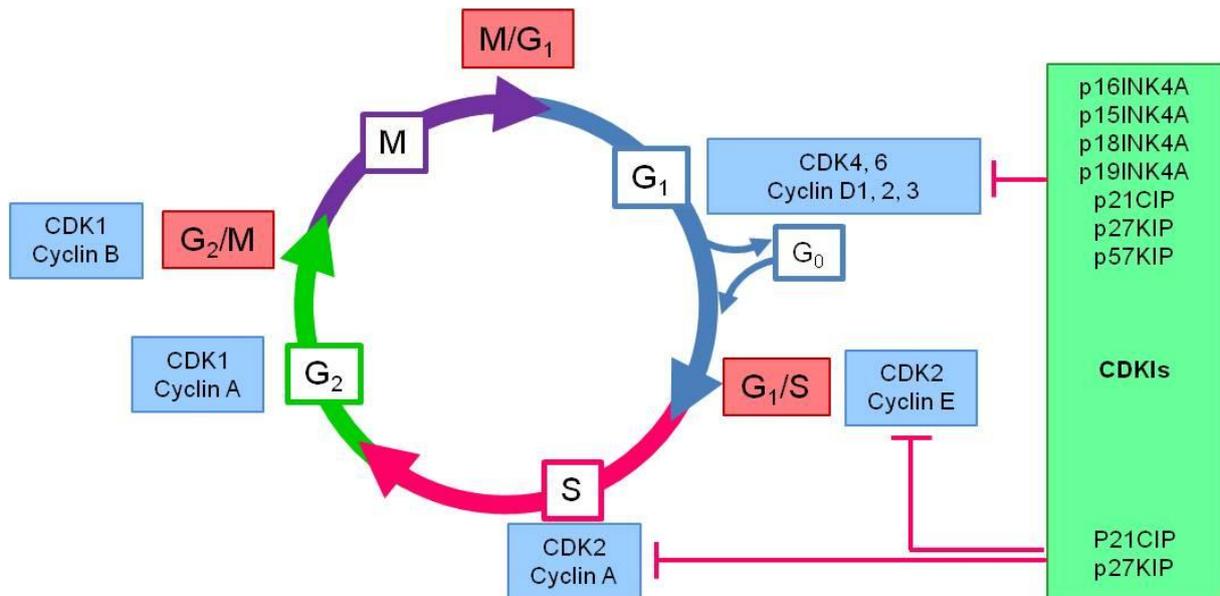


Abbildung 2: Zellzykluskontrolle durch Cycline, cyclinabhängige Kinasen (CDKs) und deren Inhibitoren (CDKIs). Adaptiert nach [26].

Der Zellzyklus wird durch Cycline (Cyclin A-L) gesteuert und kontrolliert, deren Konzentration durch gesteigerte Expression oder Ubiquitinierung und Degradation kurzfristig erhöht oder verringert werden kann. Die Cycline aktivieren Cyclin-abhängige Kinasen (CDK1-11), die nur im Komplex mit Cyclinen und nach erfolgter Phosphorylierung an konservierten Domänen (Threoninreste) wichtige Proteine der jeweiligen Zellzyklusphasen (z.B. Transkriptionsfaktoren) phosphorylieren können [27, 28]. Proteolytischer Abbau des Cyclins, Phosphorylierung eines weiteren Threonin- und Tyrosinrests oder Assoziation mit einem CDK-Inhibitor (CDKI) der INK4-Gruppe (p15, p16, p18, p19) oder Cip/Kip-Familie (p21, p27, p57) führen zur Inaktivierung der CDKs (Abb. 2) [26]. Die Expression der CDKIs wird durch Zellzyklusinhibitoren wie TGF- β oder Kontaktinhibition und Stresssignale wie DNA-Läsionen oder reaktive Sauerstoffspezies aktiviert und durch Aktivierung mitogener Signalwege wie PI3K/Akt gehemmt [29-32]. Mutationen in den Genen der Zellzykluskontrolle findet man in vielen Tumoren wie zum Beispiel eine Überexpression von Cyclin D1 in Brustkrebs [33]. Weitere Beispiele zeigt Tabelle 1. Die Gene der CDKIs gehören zu den am häufigsten mutierten Tumorsuppressorgenen und fungieren als prognostische Marke in Brust-, Magen- und Darmkrebs [34, 35]. In einigen Tumoren finden sich mutierte CDKs, die nicht mehr durch CDKIs inhibiert werden können.

Tabelle 1: Tumorproteine im Zellzyklus, ihre Aktivität, zelluläre Funktion und Tumore, die mit einer Fehlfunktion dieser Proteine einhergehen. Adaptiert nach [3].

Protein	Aktivität	Zelluläre Funktion	Tumore
Cyclin B1	Aktiviert CDK1	G ₂ /M-Übergang	Überexprimiert in kolorektalen Tumoren
Cyclin D1	Aktiviert CDK4 und CDK6	G ₁ /S-Übergang	Mutiert in Mammakarzinomen und Leukämien
Cyclin E	Aktiviert CDK2	G ₁ /S-Übergang	<i>Gene rearrangements</i> und Überexpression in Mammakarzinomen
CDK4	Phosphoryliert Rb und andere Proteine	G ₁ /S-Übergang	Genamplifikation in Gliomen, mutiert im erblichen Melanom
P21CIP1	Inhibiert CDK2, CDK4 und CDK6	G ₁ /S-Blockade	Mutiert oder epigenetisch inaktiviert in vielen Tumoren
P16INK4A	Inhibiert CDK4 und CDK6	G ₁ /S-Blockade	Inaktiviert und mutiert in Melanomen und anderen Tumoren

1.2.6 Apoptose und Apoptoseschutz

Die Apoptose ist der genetisch kontrollierte Zelltod und dient der Eliminierung ausgewählter Zellen, beispielsweise im Rahmen von Gewebeverjüngung und Gewebekontrolle sowie der Eliminierung mutierter oder funktionsgestörter Zellen. Die Apoptose wird in vier Phasen unterteilt: Initiation, Exekution, Phagozytose und Degradation. Die Initiationsphase wird aktiv durch extra- oder intrazelluläre Mechanismen sowie passiv beim Entzug von Wachstumsfaktoren eingeleitet.

Extrazellulär kann sich von zytotoxischen T-Lymphozyten freigesetztes Granzym B an die Zelle anlagern (Abb.3) und nach Aufnahme die Exekutionscaspase-3 durch Spaltung aktivieren [36]. Alternativ können Todesrezeptoren aus der TNF-Rezeptorsuperfamilie durch Liganden wie Tumornekrosefaktor α und β (TNF α , TNF β) oder CD95L (Fas-Ligand) aktiviert werden, wodurch der Rezeptor trimerisiert, das Inhibitorprotein BAG-4 abstößt und das Adapterprotein *TNFR1-associated death domain* (TRADD) an die intrazellulären Todesdomänen (*Death domains*, DD) binden kann [37]. TRADD bindet *TNF-receptor associated factor 2* (TRAF2) und kann über eine Aktivierung des *Nuclear factor kappa B* (NF- κ B)-Signalweges entzündungsassoziierte Gene induzieren, über eine Aktivierung des MEKK/JNK-Signalweges den Transkriptionsfaktor AP-1 und damit mitoseassoziierte Gene aktivieren oder über die Bindung des Proteins FADD (*FAS-associated death domain protein*) den Caspase-Weg und damit die Apoptose aktivieren [38]. FADD rekrutiert die Initiationscaspase-8, die dann über Aktivierung einer Exekutionscaspase wie

Caspase-3 zur Apoptose führt [39]. Weitere extrazelluläre Apoptoseinitiatoren sind Toxine, Hormone und Stickstoffmonoxid [40-43].

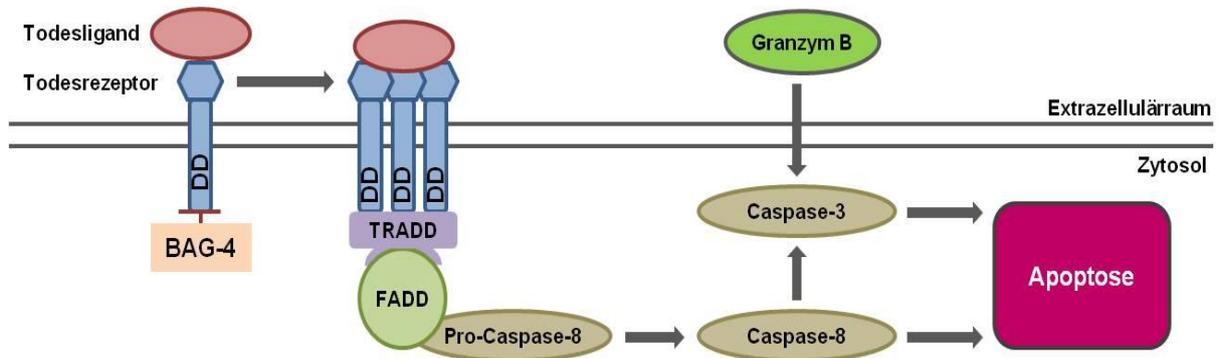


Abbildung 3: Extrazelluläre Apoptoseinduktion: Bindet ein Todesligand (z.B. CD95L) an den Todesrezeptor (z.B. CD95) wirft dieser daraufhin das inhibitorische Protein BAG-4 ab und trimerisiert. In der Folge bindet das Protein TNFR1-associated death domain (TRADD) an die intrazellulären Todesdomänen (DD) und aktiviert durch Bindung von FAS-associated death domain protein (FADD) die Initiatorcaspase-8. Die Initiatorcaspase-8 und u.a. Granzym B können die Effektorcaspase-3 aktivieren. Aktivierte Caspasen führen zur Apoptose. Adaptiert nach [3].

Die intrinsische Initiation der Apoptose (Abb. 4) wird durch zellinterne Signale wie DNA-Schäden ausgelöst und führt zu einer Aktivierung von p53, welches die Expression des antiapoptotischen Proteins BCL-2 hemmt [44]. Nun dimerisieren die proapoptotischen Proteine BAK und BAX und bilden Porenkomplexe in der äußeren Mitochondrienmembran wodurch die Permeabilität erhöht wird (*Mitochondrial outer membrane permeabilization*, MOMP) [45]. MOMP führt unweigerlich zur Apoptose durch die Freisetzung von Cytochrom c, Protonen und Ca^{2+} -Ionen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Zytosol, wodurch der Protonengradient an der inneren Mitochondrienmembran zusammen bricht. Cytochrom c bildet im Zytosol Komplexe mit dem Protein *Apoptotic protease activating factor-1* (APAF-1), der die Pro-Caspase-9 aktiviert. Die Aktivierung der Pro-Caspase 9 kann durch *Cellular inhibitors of apoptosis* (cIAP-1/2) und Survivin gehemmt werden. Die Initiationscaspase-9 spaltet und aktiviert Pro-Caspase-3 und weitere Exekutionscaspasen [46].

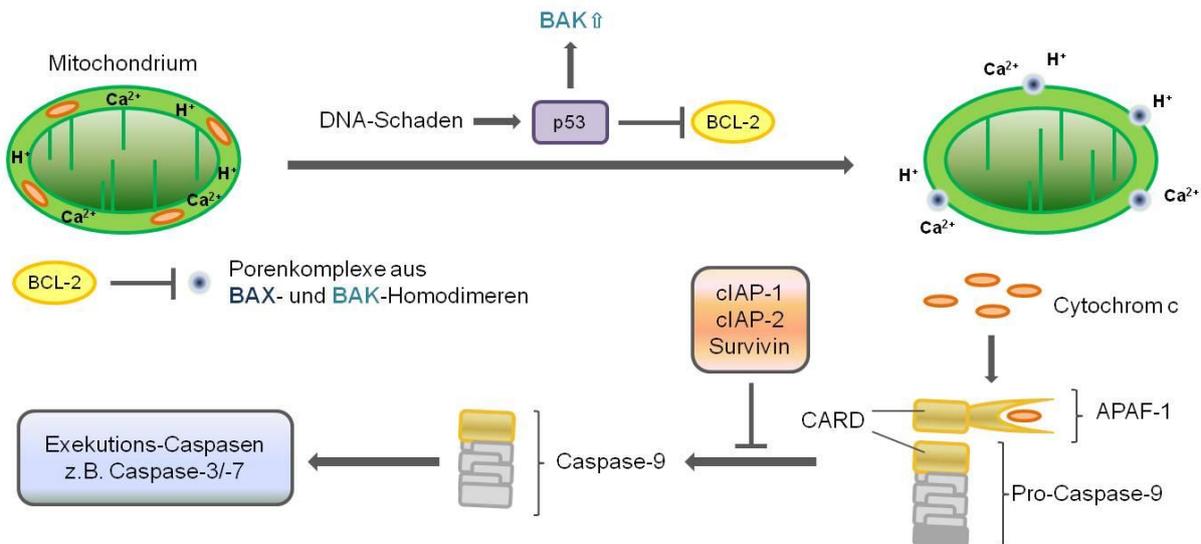


Abbildung 4: Intrazelluläre Apoptoseinduktion: Noxen wie DNA-Schäden führen zur Aktivierung von p53. p53 aktiviert die Genexpression von BAK und hemmt BCL-2, wodurch sich Porenkomplexe aus BAX- und BAK-Homodimeren bilden können, die sich in die äußere Mitochondrienmembran einlagern und die Permeabilität erhöhen (Mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP). Cytochrom c, Ca^{2+} -Ionen und Protonen treten ins Zytosol aus, das Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran bricht zusammen und es kommt zum Verlust der für die Zellfunktion existenziellen Mitochondrien. Zytosolisches Cytochrom c aktiviert im Komplex mit Apoptotic protease activating factor-1 (APAF-1) über Caspase recruitment domain-containing proteins (CARD) die Initiationscaspase-9, die wiederum Exekutionscaspasen aktiviert. Survivin und Cellular inhibitors of apoptosis (cIAP-1/2) können die Aktivierung von Caspase-9 verhindern. Adaptiert nach [47].

Caspase-3 und -6 leiten die Exekutionsphase durch Spaltung funktioneller Proteine der Zelle ein. Betroffen sind u.a. Zellzyklusregulatoren (Rb, Cyclin A, p21CIP1), Zytoskelettproteine (Aktin, Keratin, Lamine), Signalproteine (PLA2, MAP-Kinasen, PKC, BCL-2) und DNA/RNA-metabolisierende Proteine (Topoisomerase, DNA-PK) [3]. Im Zellkern kommt es nach Spaltung des *Inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease* (ICAD) zur Degradation der DNA durch DNAsen [48]. Der Abbau des Zytoskeletts führt zum Verlust der Zellstruktur und intrazellulärer Bläschenbildung (*Apoptotic blebbing*). Durch Verdau der Proteine FAK (*Focal adhesion kinase*), PAK2 (*p21-activated kinase 2*) und Gelsolin kommt es zum Verlust der Zelladhäsion, zur Abschnürung von Vesikeln (*apoptotic bodies*) und der Umverteilung von Membranproteinen und Phospholipiden [49, 50]. Phosphatidylserin gelangt so auf die Außenseite der Zellmembran, wodurch die Phagozytose der *Apoptotic bodies* durch Makrophagen und Nachbarzellen vermittelt wird [51].

Grundlegende Störungen in Apoptose auslösenden und steuernden Mechanismen sind für die Tumorigenese und Tumorprogression essentiell und können sogar der Grund für die Entstehung eines Tumors sein [52-54]. Im Rahmen der Tumorprogression kommt es zu weiteren gravierenden Veränderungen, die aufgrund

der Störung im intrinsischen Weg der Apoptoseinitiation nicht zum kontrollierten Zelltod führen (Tab. 2) [3].

Tabelle 2: Ereignisse in Tumorzellen, die zu mangelnder Sensitivität gegenüber externen oder internen Apoptosesignalen führen. Adaptiert nach [3].

Ereignis	Konsequenz
BAX-Mangel	Keine Öffnung der Mitochondrienkanäle
BCL-2-Überschuss	Mitochondrienkanäle bleiben blockiert
Caspase-8-Mutationen	Keine Aktivierung der Exekutionscaspasen
CD95-Mutation	Keine Weiterleitung des Apoptosesignals
FADD-Mangel	Keine Aktivierung der Caspase-8
MAPK-Signalwegaktivierung	Inhibition der Caspase-8-Expression
MDM2-Mutation	p53-Mangel
NF-κB-Signalwegaktivierung	Induktion antiapoptotischer Gene
Todesrezeptor-Mangel	Keine Weiterleitung des Apoptosesignals
TP53-Mutation	Keine Hemmung der BCL-Expression
Überexpression von c-FLIP	Keine Aktivierung der Caspase-8

1.2.7 Ansprechen auf Zytostatika

Zytostatika sind synthetische, partialsynthetische oder Naturstoffe mit dem Zweck des möglichst selektiven Abtötens von Tumorzellen durch Nutzung bestimmter Unterschiede zwischen Tumorzellen und gesunden Zellen. Die erhöhte Proliferationsrate mit gesteigerten Raten der DNA-, RNA- und Proteinsynthese ist der Hauptunterschied, weshalb die meisten Zytostatika im Zellzyklus von Tumorzellen und nicht normalen Zellen angreifen. Aus toxischen Effekten auf gesunde, rasch proliferierende Zellen resultieren die Nebenwirkungen der Zytostatika wie Schleimhautveränderungen, Haarausfall, Übelkeit, Erbrechen und Immunsuppression. Innerhalb der Tumorzelle existieren vier wesentliche Angriffspunkte: DNA, Zellzykluskinasen, Mikrotubuli und die Signaltransduktion (Tab. 3) [26].

Aufgrund defekter DNA-Reparaturmechanismen und eines erhöhten Apoptoseschutzes in Tumorzellen kumulieren die DNA-Schäden, bis die Zelle nicht mehr lebensfähig ist. Gesunde Zellen sind aufgrund des intakten DNA-Reparatursystems weniger stark betroffen. Die DNA-Integrität kann durch Alkylantien wie Stickstoff-Lost-Derivate, Alkylsulfonate oder Nitrosoharnstoffe geschädigt werden, wodurch es zu DNA-Strangbrüchen kommt [55]. Carboplatin verursacht wie

Alkylantien eine Quervernetzung der DNA, während Antibiotika wie Bleomycin und Anthracycline wie Doxorubicin interkalieren und ebenso wie die Topoisomerase-Inhibitoren wie z.B. Etoposid DNA-Strangbrüche induzieren. Basen- und Nukleosidanaloga führen zur DNA-Synthesehemmung [56]. Das Basenalogon 5-Fluorouracil hemmt u.a. die Thymidilat-Synthase, ein Enzym der Nukleosidsynthese, während Nukleosidanaloga wie Gemcitabin und Cytarabin die DNA- und RNA-Polymerasen hemmen [57, 58]. Methotrexat (MTX) hemmt irreversibel die Dihydrofolatreduktase wodurch ein relativer Mangel an Tetrahydrofolat entsteht [59]. In der Folge kommt es zu einer gestörten Purin- und Thymidylatsynthese und Einbau von Uracil in die DNA, wodurch Strangbrüche auftreten können. Ein relativ neuer Angriffspunkt sind Kinaseinhibitoren wie Flavopiridol, welches zahlreiche Zellzykluskinasen hemmt und in verschiedenen Tumorzelllinien Zellzyklusstop und Apoptose induziert [60]. Vinca-Alkaloide wie Vinblastin blockieren die Polymerisation der Tubulindimere, während Taxane wie Paclitaxel die Depolymerisation blockieren, wodurch sie in der Metaphase als Mitosehemmer wirken [61, 62]. Die Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen von Wachstumsfaktorrezeptoren wie beispielsweise VEGFR, PDGFR oder EGFR kann extrazellulär durch Antikörper gegen die Rezeptoren (z.B. Cetuximab bindet und inaktiviert EGFR) oder die Agonisten (z.B. Bevacizumab bindet VEGF), durch Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen (z.B. Sorafenib hemmt VEGFR und PDGFR) oder signalabwärts durch mTOR (*Mammalian target of rapamycin*)-Inhibitoren wie Sirolimus unterbrochen werden [63, 64].

Tabelle 3: Die vier wichtigsten Angriffspunkte für Zytostatika nach [26].

Angriffspunkt	Wirkmechanismus	Beispiel
DNA	Alkylierung der DNA	Cyclophosphamid
DNA	Inhibition der DNA-Synthese	Cytarabin
DNA	Inhibition der Nukleosid-Synthese	5-Fluorouracil, MTX
Zellzykluskinasen	Inhibition der CDK	Flavopiridol
Mikrotubuli	Beeinflussung der Dynamik der Mikrotubuli	Vincristin
Signaltransduktion	Hemmung von Rezeptortyrosinkinasen	Sorafenib

Nach der Aufnahme in die Zelle werden die meisten klassischen Zytostatika bioaktiviert bzw. müssen ihre Aktivität behalten, bis sie ihre Zielstruktur geschädigt haben, um den Zellzyklusarrest oder die Apoptose einzuleiten [65]. In jedem dieser

Schritte kann sich die Tumorzelle der schädigenden Wirkung eines Zytostatikums entziehen [66]. Generell handelt es sich dabei um gesteigerte Genamplifikation, erhöhte Genexpression oder Genmutationen in Zielstrukturen der Zytostatika oder in Signaltransduktions- oder Metabolismuswegen [3].

Die Konzentration des Zytostatikums in der Zelle kann durch einen verminderten Influx sowie einen erhöhten Efflux sinken. Die meisten intrazellulär wirkenden Zytostatika gelangen aufgrund einer ausgeprägten Lipophilie durch passive Diffusion über die Zellmembran ins Zellinnere. Strukturänderungen der Plasmamembran gegenüber gesunden Zellen sind für viele Zellen mit Multidrug-Resistenz (MDR) beschrieben [67]. Einen größeren Einfluss auf das Anfluten des Zytostatikums in der Zelle haben ATP-abhängige Multidrug-Transporter wie p-Glykoprotein (Pgp), die *Multidrug resistance related proteins* (MRP1-9), das Lungenresistenzprotein (LRP) sowie der vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) [65]. Das membranständige Pgp wird ubiquitär exprimiert, besonders in den Zellen von Leber, Pankreas, Niere, Dickdarm, Dünndarm und in der Blut-Hirn-Schranke, und fungiert als Effluxpumpe für Xenobiotika [68, 69]. Der Zusammenhang mit der MDR von Tumoren zeigt sich bei Betrachtung der Expression von Pgp vor und nach einer Chemotherapie: Pgp wird bei Diagnosestellung z.B. nur in 6 % der multiplen Myelome gefunden, während nach einer Therapie (besonders VAD: Vincristin, Doxorubicin, Dexamethason) 85 % der Resistenzen mit einer Pgp-Expression einhergehen [70]. Diese Beobachtung wurde für viele Tumore bestätigt [71]. Die membranständigen MDR-Proteine MRP1-9 werden von vielen Zellen exprimiert und transportieren Xenobiotika-Glutathion-Addukte aus den Zellen [72, 73]. Die vermittelten Resistenzen ähneln denen des Pgp und gehen ebenfalls mit einer Expressionssteigerung der MRPs einher [65, 74].

Das zelluläre Glutathion (GSH)-System dient der Detoxifizierung von Xenobiotika. Glutathion-S-Transferasen (GST) koppeln GSH an Xenobiotika wodurch diese einen Aktivitätsverlust und eine Löslichkeitsverbesserung erfahren und z.B. mittels MDR-Effluxpumpen ausgeschieden werden können. Tumorzellen mit Resistenzen gegen Alkylantien weisen oft einen erhöhten GSH-Spiegel und/oder eine erhöhte GST-Aktivität auf [75]. Eine erhöhte Genamplifikation ist auch der Grund einer Resistenz gegen MTX durch einen Überschuss an Dihydrofolatreduktase [76]

Mutationen in Genen der Zielstrukturen von Zytostatika können diese unwirksam machen, wie im Fall von Camptothecin und Topoisomerase I [77]. Überexpression von DNA-Exzisions-Reparaturenzymen wie ERCC1-3 (*Excision repair cross-*

complementing rodent repair deficiency 1-3) ist der Grund einer Resistenz gegen Platinkomplexe in der Zellkultur [78]. Weiterhin korreliert der p53-Status (Wildtyp oder Mutante) von Zellen mit dem Ansprechen auf Zytostatika, die sich die Apoptoseinduktion über den p53-Signaltransduktionsweg zunutze machen [79]. Zelllinien mit p53-Mutanten weisen häufiger Resistenzen gegen Zytostatika auf. Ebenso weisen Zellen mit BCL-2 Überexpression oder CD95-Mutanten eine erhöhte Resistenz gegen Chemotherapeutika auf [80, 81].

1.2.8 Epitheliale-mesenchymale Transition

Epithelien sind ein- bis mehrschichtige Zellschichten, die Organe, Drüsen- und Exkretgänge sowie andere Oberflächen innerhalb des Körpers bedecken und Schutz-, Resorptions-, Sinnes-, Sekretions- oder Transportfunktion besitzen können. Epithelzellen zeigen eine prismatische Morphologie und weisen einen Phänotyp mit apikaler und basaler Polarisierung auf, wobei die basale Seite an eine Basalmembran gebunden ist. Apikale und basale Membran der Epithelzellen weisen deutliche Unterschiede in Struktur und Funktion auf. Die Integrität des Gewebes wird durch Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wie *Adherens junctions*, *Tight junctions*, *Gap junctions* und Desmosomen gewährleistet. E-Cadherin, α - und β -Catenin, Zytokeratine, Desmoplakin und Okkludin werden in der Literatur als epitheliale Markerproteine genannt [82, 83]. E-Cadherin besitzt fünf extrazelluläre Immunglobulin-Domänen, die durch adhäsive Bindungen Homodimere bilden und Zell-Zell-Kontakte vermitteln. Die zytoplasmatischen Regionen des E-Cadherins interagieren durch Bindung von α -, β - und γ -Catenin mit dem Aktinskelett [84]. Aus dem Zusammenschluss mehrerer Zell-Zell-Kontakte entstehen *Adherens junctions* und Desmosomen [85].

Mesenchymale Zellen haben eine spindelförmige Morphologie und besitzen aufgrund der weitgehend fehlenden Zell-Zell-Kontakte eine erhöhte Migrationsfähigkeit. Statt der für epitheliale Gewebe typischen Zell-Zell-Kontakte kommt es nur zur Ausbildung von Fokalkontakten und selten zur Bildung von *Gap junctions* [86]. Vimentin, N-Cadherin, α -Smooth muscle actin (α -SMA), Fibronektin und Desmin werden in der Literatur als spezifische mesenchymale Marker genannt [87]. Vimentin ist ein Intermediärfilament und wird besonders in Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert. Es verbindet als Element des Zytoskeletts Nukleus, endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien und fixiert sie im Zytosol. Vimentin wird eine Rolle bei

der Signaltransduktion von der Zelloberfläche in den Kern zugeschrieben sowie Verantwortlichkeit für Morphologie, Zytoplasmaintegrität und Zytoskelettstabilität [88, 89]. N-Cadherin vermittelt extrazelluläre Signale in die Zelle, inhibiert die Proliferation durch Induktion von p27KIP und induziert Migration und Invasion [90].

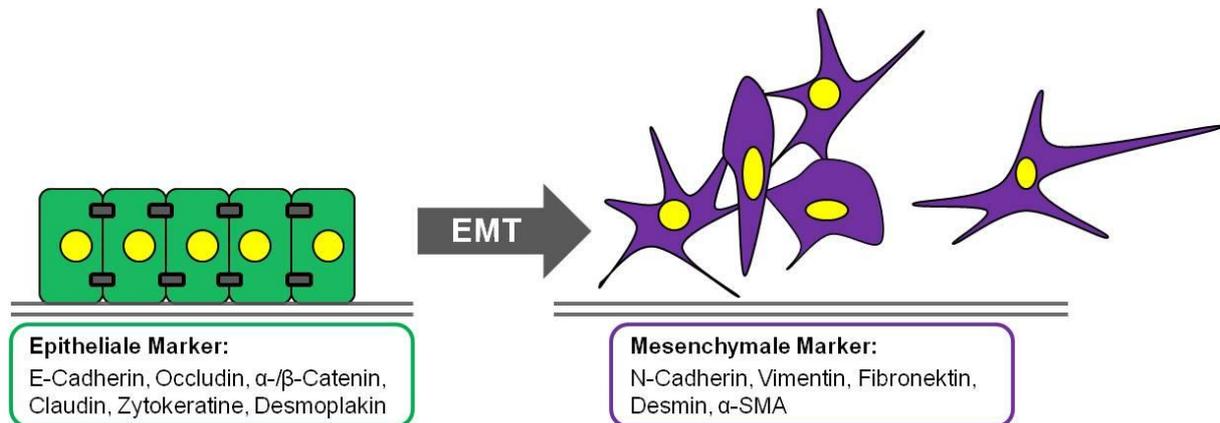


Abbildung 5: Schematische Darstellung der EMT und typischer Marker. Adaptiert nach [91].

Die Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) ist ein vielstufiger Prozess, bei dem polarisierte Epithelzellen ihre apikal-basale Polarität sowie Zell-Zell-Kontakte verlieren und einen fibroblastoiden, motilen, individuellen, mesenchymalen Phänotyp annehmen (Abb. 5) [84, 90, 91]. Vielfältige Stresssignale lösen die Internalisierung und den Abbau von E-Cadherin aus, wodurch es zum Verlust von *Tight junctions*, *Adherens junctions* und *Gap junctions* kommt [92]. Die Zelle verliert ihre Zell-Zell-Kontakte zugunsten von Zell-Matrix-Kontakten, ist aber resistent gegenüber Anoikis und Amorphosis [82]. Durch den Mangel an E-Cadherin kommt es zu einer Reorganisation der Aktin-Moleküle im Zytoskelett, der Ausbildung von Aktin-Stressfasern und dem Verlust der prismatischen Morphologie zugunsten einer Spindelform [93]. Die EMT kann am Verlust von E-Cadherin und der steigenden Expression mesenchymaler Markerproteine wie N-Cadherin, Vimentin, L1CAM (L1 Zelladhäsionsmolekül), Fibronectin, α -SMA und Desmin gemessen werden. Die Zelle sezerniert nun andere Proteasen, Extrazellulärmatrixproteine und deren Rezeptoren,

die mit einer erhöhten Migration, Invasion und Ausbreitung in das Gewebe einhergehen [82].

Unter physiologischen Bedingungen ist die EMT ein wichtiger Prozess der Embryogenese und u.a. an der Entwicklung von Herz, Skelettmuskulatur und peripherem Nervensystem beteiligt [84]. Im adulten Gewebe tritt die EMT eher selten auf, z.B. im Zusammenhang mit Stress, Wundheilung, Geweberemodelling und Fibrosierung [94].

Die EMT ist heute als wesentlicher Vorgang im Rahmen der Metastasierung und Progression von Tumoren bekannt, und geht vermutlich der Migration von Tumorzellen voraus. Inaktivierende Mutationen des CDH1-Gens (E-Cadherin) gehen mit einer stark ausgeprägten, diffusen Metastasierung von Tumorzellen einher und treten besonders bei Magenkarzinomen und in 50 % der Mammakarzinome auf [83, 95]. Darüber hinaus wurde der Verlust oder die Minderexpression von E-Cadherin für diverse gastrointestinale Tumore (Kolon-, Ösophagus-, Magen-, Pankreaskarzinome) festgestellt [96]. Reduktion der E-Cadherin Expression *in-vitro* führte zum Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Phänotyp und war mit einer erhöhten Invasivität der Zellen verbunden [96]. Damit ist E-Cadherin ein wichtiger Marker der EMT und für das Metastasierungspotential von Tumoren.

Die Expression von E-Cadherin korreliert negativ mit den EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, ZEB-1, SIP1 und Twist, die an der Regulation von Proteinen junctionaler Komplexe beteiligt sind [84, 96]. Auch die epithelialen Proteine Claudin, Connexin, Desmoplakin, Occludin und Zytokeratine stehen unter der negativen Kontrolle dieser Transkriptionsfaktoren [96, 97]. Darüber hinaus sind die epithelialen Proteine negativ mit der Induktion des mesenchymalen Phänotyps und einer gesteigerten Expression mesenchymaler Proteine wie Fibronectin und Vitronectin assoziiert.

In der Karzinogenese wirken verschiedene Signale als Induktoren der EMT, wie die Wachstumsfaktoren TGF- β , *Bone morphogenic protein* (BMP), *Hepatocyte growth factor* (HGF), *Platelet-derived growth factor* (PDGF) und *Fibroblast growth factor* (FGF), die vornehmlich vom tumorassoziierten Stroma freigesetzt werden [92].

1.2.9 Metastasierung

Nach Aufhebung der epithelialen Zellintegrität durch EMT sowie den Erwerb eines motilen Phänotyps kann die Tumorzelle durch Sekretion von Serinproteasen (besonders Plasmin) und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) die Extrazellulärmatrix (EZM) auflösen, wobei diese Faktoren auch durch Stromazellen im aktivierten Tumorstroma exprimiert werden. Für die Tumordinvasion ist das Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator-System von besonderer Bedeutung, da die Serinprotease Plasmin ein breites Spektrum von Matrixproteinen wie Fibronectin, Vitronectin, Laminin und Fibrin lysiert sowie Pro-Kollagenasen an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten aktiviert [98, 99]. Da die Tumorzelle resistent gegen Anoikis und Amorphosis ist, kommt es durch die gesteigerte Migrationsfähigkeit nach dem Auflösen der Zell-Zell-Kontakte zum Eintritt der Tumorzelle in Lymph- und Blutgefäße (Intravasation; Abb. 6) [100]. Zirkulierende Tumorzellen aktivieren über die Expression von Thromboplastin (*Tissue factor*, TF) Thrombozyten und Gefäßoberflächen, wodurch es zur Thrombenbildung und Adhäsion an das Gefäßendothel kommt [101]. Geschützt durch den Thrombus um die intravaskulären Mikrometastase weitet die Tumorzelle das Endothel und invadiert in dahinter liegende Gewebe (Extravasation). Über komplexe Zell-Matrix-Interaktionen schafft sich die Zelle ein optimales Milieu, schützt sich vor Immunzellen (*immune escape*) und induziert zur Verbesserung der Nährstoffversorgung die Vaskularisierung durch Freisetzung von angiogenetischen Faktoren wie VEGF, u.a. aus rekrutierten, tumorassoziierten Makrophagen [24, 100, 102, 103]. In der Folge proliferiert die metastasierte Zelle und bildet eine manifeste Metastase. Während der Metastasierung nutzt die Tumorzelle körpereigene Strukturen wie Zell-Zell-Kontakte und Zell-Matrix-Kontakte, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle, Proteasen, das Immunsystem, das Lymph- und das Blutgefäßsystem in unphysiologischer Weise, um sich einen Progressionsvorteil zu verschaffen.

Metastasen betreffen aufgrund der hämatologischen oder lymphatischen Ausbreitung der Tumorzellen im Körper häufig Organe stromab des Primärtumors sowie stärker durchblutete Organe. Metastasierende Tumorzellen können aber auch in die Pleuramembran, das Bauchfell oder Perikard einwandern und zur Entstehung maligner Ergüsse führen.

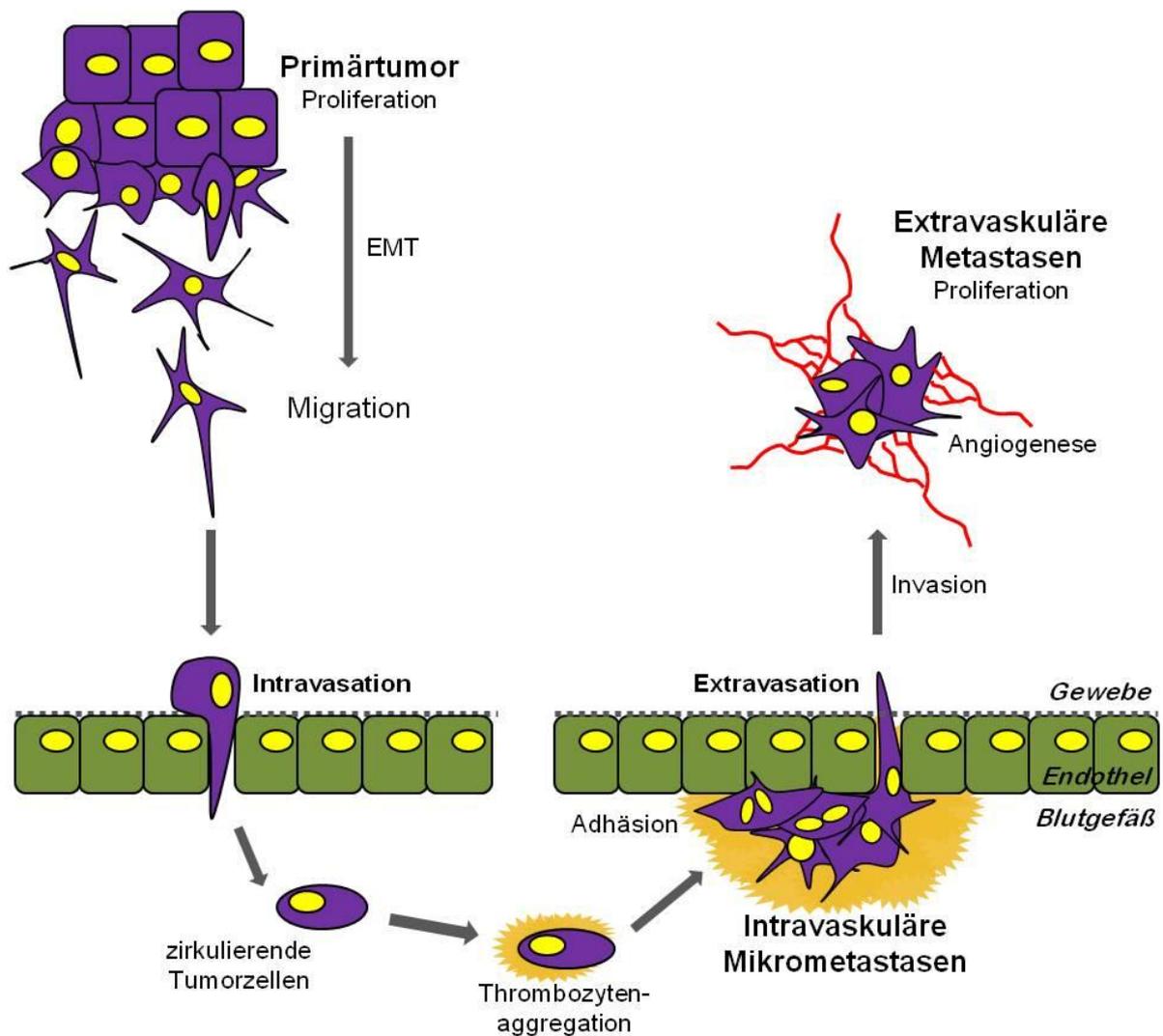


Abbildung 6: Schematische Darstellung wichtiger Prozesse der Metastasierung. Der Primärtumor proliferiert und einzelne Zellen können nach EMT den Zellverband verlassen und, oft zunächst über Lymphgefäße, in die Blutbahn migrieren (Intravasation). Hier zirkulieren sie und aktivieren Thrombozyten und das Gefäßendothel. Nach Adhäsion des Thrombus an das Endothel und verstärkter Fibrinogenese (intravaskuläre Mikrometastasen) invadieren die metastasierenden Zellen in das darunter liegende Gewebe (Extravasation) und bilden Metastasen, die durch verstärkte Neoangiogenese ihre Nährstoffversorgung sicherstellen. Die Metastasen betreffen häufig Organe stromab des Primärtumors aber auch Pleuramembran, Perikard oder Peritoneum.

1.2.9.1 Maligne Ergüsse

Maligne Ergüsse, die Ansammlung von abnormen Flüssigkeitsmengen aus dem Gefäß- oder Lymphsystem in Geweben oder serösen Körperhöhlen, treten bei 15 % aller Tumorpatienten auf und sind ein Symptom bei Tumorerkrankungen beinahe aller Entitäten [104-106]. Die Genese der Ergüsse ist nur teilweise geklärt. Metastasierende Tumorzellen vieler Tumorentitäten können in Pleuramembran, Bauchfell oder Perikard ausstreuen und lokale Entzündungen hervorrufen [105]. In der Folge wandern Lymphozyten und Makrophagen in die Gewebe ein und es kommt zu einer Ausschüttung von Zytokinen, MMPs und Wachstumsfaktoren wie VEGF, der

auch als *Vascular permeability factor* beschrieben wurde, wodurch die Barrierefunktion der endothelialen und subendothelialen Gewebe aufgelockert wird, und Flüssigkeit sowie Plasmaproteine wie Albumine oder Gerinnungsfaktoren aufgrund des erhöhten onkotischen Drucks aus den Blutgefäßen in die seröse Kavität einströmen können [105, 107]. Mesothelzellen, infiltrierende Entzündungszellen und Tumorzellen verstärken diesen Mechanismus [105, 107-110].

Etwa 50 % aller Pleuraergüsse haben eine maligne Ursache und bei 13 % der Patienten mit Pleuraerguss ist dies der erste Hinweis auf eine ursächliche Tumorerkrankung [111, 112]. Dem gegenüber werden nur 10 % aller klinisch manifesten Aszitesergüsse von malignen Erkrankungen, besonders Ovarial- und Pankreastumoren, hervorgerufen [113-116]. Bei 50 % der Patienten mit Aszites ist dies der erste Hinweis auf eine ursächliche Tumorerkrankung [117, 118]. Die Inzidenz für maligne Perikardergüsse variiert von 5-53 % in Autopsien und klinischen Studien [119]. Dabei ist ein Perikarderguss oft ein erster Hinweis auf eine ursächliche Tumorerkrankung [120]. Maligne Ergüsse gehen generell mit einer signifikant ($p < 0,05$) gesteigerten Morbidität der Betroffenen einher [121-123].

Die betroffenen Patienten leiden je nach Lokalisation und Umfang des Ergusses unter Brust- oder Abdominalschmerzen, Atemnot, Husten, Verdauungsstörungen, Erbrechen, Anorexie und Kachexie, Nausea sowie einer eingeschränkten Beweglichkeit [113, 122, 124]. Die Therapieoptionen werden in Kapitel 1.3 besprochen.

1.2.9.2 Prokoagulatorischer Status im Serum und in malignen Ergüssen

Etwa 90 % der Tumorpatienten zeigen einen hyperkoagulatorischen Gerinnungsstatus [125]. Venöse Thromboembolien (VTE) sind bekannte Komplikationen bei Tumorpatienten und bei etwa 11 % der Patienten der erste Hinweis auf eine maligne Erkrankung [126-128]. Je nach Tumorentität kann die Inzidenz für eine manifeste VTE bis zu 28 % betragen [129]. Diagnostische Parameter einer aktivierten Gerinnung sind F1+2 Fragmente, Spaltprodukte der Aktivierung von Prothrombin, sowie D-Dimere, die beim enzymatischen Abbau von Fibrin entstehen (Abb. 7). Erhöhte D-Dimer Plasmaspiegel sind ein prädiktiver Marker für maligne Erkrankungen [130]. Weiterhin korrelieren F1+2-Spiegel, D-Dimere und Prothrombinspiegel mit dem Tumorstadium und der Lymphknoten-

Metastasierung bei Patienten mit Magentumoren [131]. Ferner weisen Patienten mit gynäkologischen Tumoren erhöhte F1+2 Spiegel auf [132]. Anhand erhöhter Plasmaspiegel für D-Dimere und F1+2 lassen sich venöse Thromboembolien vorhersagen [133].

In malignen Ergüssen wurden alle Gerinnungsfaktoren der extrinsischen Kaskade (Faktor II, V, VII, X, TF) sowie erhöhte Spiegel für F1+2 Fragment und D-Dimere nachgewiesen [107, 134]. Tatsächlich könnten Tumorzellen in Ergüssen das Gerinnungssystem durch Expression von Gewebefaktor und dem hypothetischen *Cancer procoagulant* direkt aktivieren oder indirekt durch Ausschüttung von Zytokinen in mononukleären Zellen die Expression prokoagulatorischer Proteine stimulieren [135, 136]. Fibrin tritt in vielen Tumorgeweben auf und scheint das Tumorstadium durch Neoangiogenese und eine Schutzfunktion vor Angriffen immunkompetenter Zellen zu fördern [137].

1.2.9.3 Thrombin

Die Vitamin K-abhängige Serinprotease Thrombin (Faktor IIa, FIIa) ist das Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade und wird bei Gefäßverletzungen oder Thrombozytenaktivierung nach Oberflächenkontakt aus seinem Vorläufer Prothrombin (Faktor II, FII) durch Abspaltung der Prothrombinfragmente 1+2 (F1+2) im Prothrombinasekomplex aktiviert (Abb. 7). Frei zirkulierender FIIa wird aufgrund seiner unkontrollierten proteolytischen und prokoagulatorischen Aktivität sofort durch Antithrombin III (AT III) im Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) inaktiviert. Die Hauptfunktion des FIIa ist die Aktivierung der Fibrinpolymerisation während der sekundären Hämostase durch proteolytische Abspaltung der Fibrinopeptide A und B (FPA+B) vom Fibrinogen, wodurch dieses unlöslich wird und zusammen mit aktivierten Thrombozyten einen Thrombus bildet. FIIa bindet als ein potenter Plättchenaktivator am Proteinase-aktivierten Rezeptor 1 und 4 (PAR-1/4).

Der prokoagulatorischen Wirkung von FIIa steht die antikoagulatorische gegenüber. Der Komplex aus membranständigem Thrombomodulin und FIIa kann Protein C (PC) aktivieren. Aktiviertes Protein C (aPC) ist zusammen mit Protein S nach Bindung an Phospholipidoberflächen ein potenter physiologischer Gerinnungsinhibitor und hemmt die Faktoren Va und VIIIa sowie Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) [138].

Durch FIIa aktivierte Endothelien exprimieren vermehrt E- und P-Selektine, die das transiente *rolling* von chemotaktischen Immunzellen vermitteln und damit einen Schlüsselmechanismus der Leukozytenchemotaxis darstellen [139, 140]. Die PAR-1 vermittelte Freisetzung von Prostacyclin aus dem Endothel wirkt antiinflammatorisch, hämostaseolytisch, antimitogen und antiproliferativ [140, 141]. FIIa regt in diversen Zellen die Synthese von Plättchen-aktivierendem Faktor (PAF) an, einem potenten Mediator in Hämostase und Inflammation. PAF aktiviert Granulozyten und Monozyten, induziert Interleukin-1 (IL-1) und führt zur Thrombozytenaggregation [140].

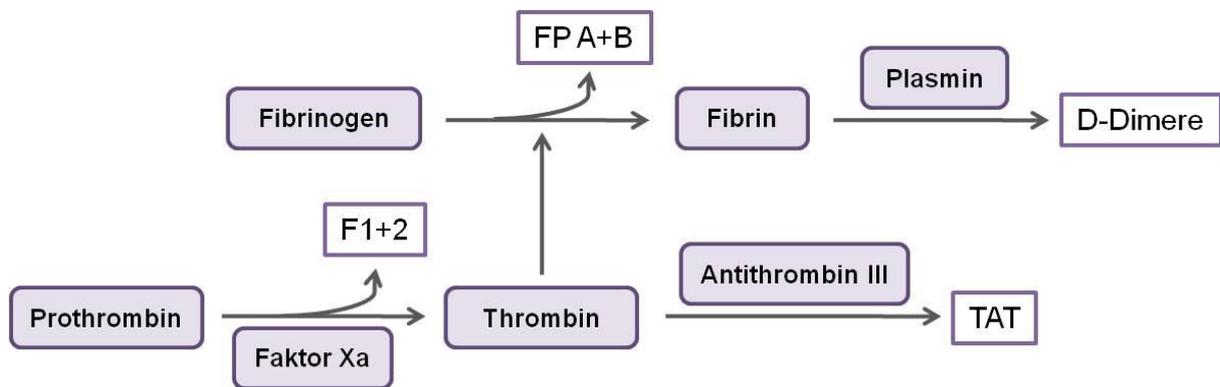


Abbildung 7: Endstrecke der Gerinnungskaskade, schematisch. F1+2 und D-Dimere gelten als klinische Marker für ein aktiviertes Gerinnungssystem.

Die Thrombozytenaggregation ist ein essentieller Schritt der Metastasierung vieler Tumorzellen [142]. Durch die Expression von TF auf Tumorzellen und dem Gefäßendothel kommt es zur Aktivierung von FIIa. FIIa führt zur Bildung von Glykoprotein IIb/IIIa abhängigen Tumorzell-Thrombozyten-Emboli und deren Adhäsion am Endothel, wodurch das Überleben der Tumorzellen im Gefäßsystem verlängert wird [143]. Durch FIIa stimulierte Thrombozyten, Endothel- und Gefäßmuskelzellen exprimieren diverse tumorprogressive Wachstums- und Angiogenesefaktoren wie NF-κB, PDGF, FGF, IL-8, VEGF und VEGFR [144-149]. FIIa induziert *in-vitro* konzentrationsabhängig Proliferation oder wirkt apoptoseinduzierend [134, 150]. Es fördert durch die Expression von Adhäsionsproteinen wie ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin, Integrin αIIbβ3 und *GP1Ib-IIIa-like structures* auf Tumor- und Endothelzellen die Adhäsion von Monozyten und Tumorzellen ans Endothel [151-153]. Weiterhin beeinflusst FIIa die Endothelbarrierefunktion durch Auflösung von *Adherens junctions*, die durch vaskuläres endotheliales Cadherin (VEC) und Catenine gebildet werden, was mit der Tumorprogression korreliert [154, 155]. Eine Migrationsinduktion durch FIIa konnte

bei Gefäßmuskelzellen, -endothelzellen und diversen Tumorzellen beobachtet werden und geht teilweise mit einer erhöhten Expression von MMPs einher [156-159]. Eine durch FIIa gesteigerte Expression von MMPs ist u.a. ursächlich für die ausgeprägte Migration von Brust- und Ovarialkrebszellen [160-163].

Zusammenfassend ist FIIa ein potentes Mitogen, induziert Proliferation, Angiogenese, Adhäsion, Migration und Invasion in benignen und malignen Zellen. Die Effekte sind oft konzentrationsabhängig ambivalent. Die meisten dieser Effekte sind PAR vermittelt und werden in Kapitel 1.2.9.5 besprochen.

1.2.9.4 Faktor Xa

Faktor Xa (FXa, Stuart-Prower-Faktor, Thrombokinase) ist eine Vitamin K-abhängige Serinprotease und wird im Rahmen der Hämostase durch einen Komplex aus Thromboplastin (TF) und Faktor VIIa aktiviert (extrinsischer Pfad) oder durch einen Komplex aus Faktor IXa und VIIIa (intrinsischer Pfad). FXa spaltet seinerseits F1+2 vom Prothrombin ab und initiiert damit die Gerinnungsphase. FXa wird u.a. durch AT III inaktiviert [138].

Neben seiner Schlüsselrolle in der Hämostase sind für FXa über die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 weitreichende Effekte in diversen Zellsystemen beschrieben. Die Hälfte aller PAR-2-defizienten Mäusen stirbt direkt nach der Geburt mit Hinweis auf Störungen der Gefäßentwicklung [164]. Akute und chronische Verletzungen im Lungengewebe sowie eine renale Fibrose gehen mit einer erhöhten PAR-2 Expression einher [165, 166]. Über PAR-2 führt FXa zur Differenzierung von Fibroblasten und einer gesteigerten Sekretion von PAI-1, TGF- β 1, IL-6, IL-8, *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und PDGF, die potente profibrotische, mitogene und inflammatorische Faktoren sind [167-171]. FXa vermittelt die Proliferation und Migration von glatten Gefäßmuskelzellen und ist an der Bildung atherosklerotischer Plaques beteiligt [172]. In Fibroblasten zeigt FXa durch Erhöhung der Sekretion von VEGF und MMPs eine gesteigerte angiogenetische Wirkung [170, 173].

Tumorzellen exprimieren verstärkt *Cancer procoagulant* und TF, Aktivoren von FXa [101, 136]. Neben der potenten Aktivierung von FIIa und dessen Einfluss kann FXa selbst an PAR-1 und PAR-2 diverse Effekte induzieren. So kann an MDA-MB-231 Brustkrebszellen durch Stimulation mit FXa die Migrationsrate in Abhängigkeit von der Anzahl exprimierter PAR-1 bzw. PAR-2 erhöht werden [174, 175]. In

serumstarvierten Adr-MCF-7 Brustkrebszellen führt FXa bzw. der FVIIa/FXa-Komplex über eine gesteigerte Expression von Survivin zu einer Reduktion der Apoptoserate um 50 % [176]. Dagegen konnte FXa PAR-1 abhängig die Migration in MDA-MB-231 und MCF-7 Brustkrebszellen in einer anderen Untersuchung hemmen [177]. In diversen Tumorzelllinien löst FXa Apoptose aus, auf einige Tumorzelllinien wirkt die Serinprotease jedoch antiapoptotisch [176, 178].

1.2.9.5 Proteinase-aktivierte Rezeptoren

Die vier Isoformen des Proteinase-aktivierten Rezeptors (PAR 1-4) stellen eine Untergruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren dar [179, 180]. Die Aktivierung der heptahelikalen Transmembranproteine erfolgt am extrazellulären N-Terminus nach Bindung an das aktive Zentrum von Serinproteasen durch irreversible Proteolyse, wodurch ein versteckter, spezifischer Ligand (Tab. 4; Abb. 8) freigelegt wird [181]. Der freigelegte Ligand besteht aus den ersten sechs Aminosäuren des neuen N-Terminus und autoaktiviert den Rezeptor an der zweiten extrazellulären Ligandenbindestelle, wodurch die bevorzugt G-Protein vermittelte Signaltransduktion initiiert wird [182-184]. Für alle vier PAR sind zahlreiche aktivierende Serinproteasen, die Sequenz der aktivierenden hexapeptidischen Liganden, Signal-Effektoren sowie Mechanismen, die zum Signalabbruch führen, beschrieben (Tab. 4) [180, 182, 183, 185]. Das extrazellulär vom PAR-1 abgespaltene Oligopeptid Parstatin besitzt eine hemmende Wirkung auf die VEGF und FGF vermittelte Angiogenese, der Mechanismus ist jedoch bisher unklar [186].

Wichtige aktivierende Serinproteasen sind FIIa (PAR-1, -3, -4) und FXa (PAR-1, -2). Die Aktivierung der PAR induziert eine Konformationsänderung der transmembranären Domänen des Rezeptors, wodurch unterschiedliche G-Proteine gebunden werden [187, 188]. Je nach gebundener α -, β - und γ -Untereinheit des G-Proteins werden unterschiedliche Signalkaskaden mit Einfluss auf Mitogenese, Proliferation, Zelldifferenzierung, Adhäsion, Sekretion oder Motilität der jeweiligen Zellen angestoßen (Abb. 8) [180, 182, 183]. Aktivierte PAR-1 und PAR-2 binden besonders an multiple heterotrimere G-Proteine wie G_i , G_q und $G_{12/13}$ [189, 190]. PAR-4 bindet bevorzugt an G_q und $G_{12/13}$, während PAR-3 lange nur eine Funktion als Kofaktor von PAR-4 zugeschrieben wurde [191]. Mittlerweile sind jedoch auch für PAR-3 autonome Effekte nachgewiesen [192].

Darüber hinaus interagieren aktivierte PAR-1 und PAR-2 mit diversen Adapterproteinen ohne eigene proteolytische Aktivität. Der Einfluss von PAR-1 auf das Zytoskelett neuronaler Zellen ist von einer Bindung an HSP90 und Kreatinkinase abhängig [193, 194]. Ein RhoA unabhängiger Einfluss auf das Aktinskelett kommt durch eine Bindung von PAR-1 an das in Fokalkontakten angereicherte Phosphoprotein Zyxin zustande [195]. β -Arrestine steuern die Intensität und Dauer des G-Protein vermittelten Signals sowie die Transduktion des Signals in die Zelle, indem sie als Gerüstproteine eigenständige Signalkomplexe (Signalosom) mit den Rezeptor assoziierten Effektorproteinen bilden [196, 197]. Für PAR-2 konnte eine Ko-Internalisierung mit β -Arrestinen nachgewiesen werden, woraus eine vesikelvermittelte ERK1/2-Aktivität mit Änderung des Aktinskeletts und der Zellmigration resultierte [198]. Darüber hinaus bindet PAR-2 an Jab1 und stabilisiert so den Transkriptionsfaktor AP-1, einen Komplex aus c-Jun und Jun-D [199].

Tabelle 4: Versteckte Liganden, aktivierende Proteasen, Signal-Effektoren und Signalabbruch der Proteinase-aktivierten Rezeptoren 1-4 (PAR). Adaptiert und modifiziert nach [180, 200].

Rezeptor	Verst. Ligand	Aktivierende Proteasen	Signal-Effektoren	Signalabbruch
PAR-1	SFLLRN	FIIa FXa TF-FVIIa-FXa APC-EPCR Trypsin Plasmin MMP-1 Granzyme	G _q G _i G _{12/13} HSP90 Kreatinkinase Zyxin	Phosphorylierung β -Arrestine Internalisierung Degradierung
PAR-2	SLIGKV	Trypsin Tryptase TF-FVIIa(-FXa) FXa Matriptase Bakterielle Gingipaine Kallikrein Granzyme	G _q G _i G _{12/13} β -Arrestine Jab1	Phosphorylierung
PAR-3	TFRGAP	FIIa	G _q	?
PAR-4	GYPGQV	FIIa Trypsin TF-FVIIa-FXa Plasmin Cathepsin G Bakterielle Gingipaine Kallikrein MASP-1	G _q G _{12/13}	Internalisierung

G-Protein unabhängige Signaltransduktionsmechanismen für PAR-3 und PAR-4 sind bisher nicht bekannt. Weiterhin sind für PAR einige Mechanismen der Rezeptor-Rezeptor-Interaktion bekannt [180].

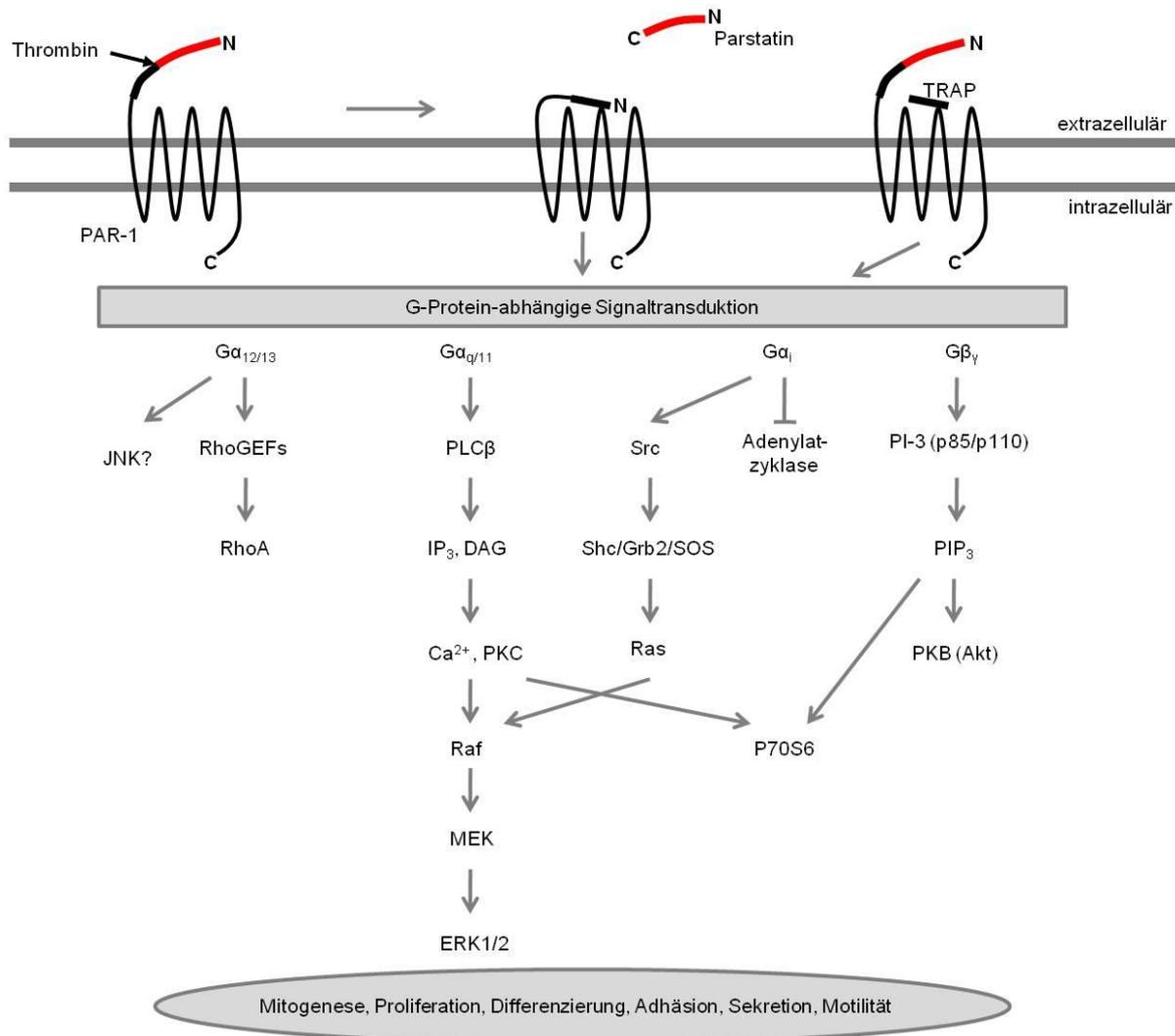


Abbildung 8: Aktivierung und Signaltransduktion des Proteinasen-aktivierten Rezeptor-1. Proteolytische Aktivierung des PAR-1 legt N-terminal einen versteckten Liganden frei, der den Rezeptor autoaktiviert. Über das gekoppelte G-Protein werden in Abhängigkeit der involvierten Untereinheiten verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die einen Einfluss auf Mitogenese, Proliferation, Zelldifferenzierung, Adhäsion, Sekretion oder Motilität der jeweiligen Zellen haben können. Synthetische Hexapeptide, die Thrombinrezeptor aktivierenden Peptide (TRAP) können als selektive Agonisten an PAR-Rezeptoren eingesetzt werden. Das abgespaltene Oligopeptid Parstatin ist ein potenter Angiogeneseinhibitor [186].

Synthetische Hexapeptide wie TRAP, Thrombinrezeptor-aktivierende Peptide, und *small molecules* können die Rezeptoren unabhängig von einer proteolytischen Freilegung des agonistischen Liganden aktivieren [183]. Allerdings induzieren synthetische und natürliche Liganden unterschiedliche Zellantworten: Eine proteolytische Aktivierung von PAR-1 auf Endothelzellen resultiert beispielsweise bevorzugt in der Rekrutierung von G $_{12/13}$ und einer Permeabilisierung der Endothelbarriere, während synthetische Peptide hier eher einen G $_q$ abhängigen

Ca²⁺-Einstrom vermitteln [201, 202]. Aktuelle Studien zeigen eine durch unterschiedliche Proteasen vermittelte Stabilisierung verschiedener Konformationen aktiver PAR, die durch Kompartimentierung der Plasmamembran in Mikrodomänen vermittelt sein könnte [190]. Trotzdem ist weiterhin unklar, wie verschiedene Agonisten am gleichen Rezeptor unterschiedliche Effekte vermitteln können. So resultiert beispielsweise eine Aktivierung von PAR-1 durch FIIa in inflammatorischen Effekten und einer Störung der endothelialen Barrierefunktion, während eine Aktivierung durch aPC antiinflammatorisch und stabilisierend auf die Endothelbarrierefunktion wirkt [203-205].

Die Desensitivierung und Resensitivierung der PAR ist komplex geregelt und bisher wenig verstanden. Aktivierte PAR-1 (G_q) scheinen eine definierte Menge an sekundären Botenstoffen zu aktivieren, bevor sie deaktiviert werden [206]. Eine Phosphorylierung aktiver PAR-1 bewirkt eine rasche Entkopplung von der Signalkaskade des G-Proteins, woran in Endothelzellen GRK3 und GRK5 (*G protein-coupled receptor kinase 3/5*) beteiligt sind [207, 208]. Neben der Rezeptorphosphorylierung und Internalisierung ist für PAR-1 und PAR-2 ein Desensitivierungsmechanismus durch Bindung an β -Arrestin 1 und 2 beschrieben [209-211]. Die Regulation aktivierter PAR-3 und PAR-4 ist kaum untersucht.

Zur Resensitivierung können Endothelzellen, Fibroblasten und andere Zellen, die Proteasen ausgesetzt sind, unabhängig von einer *de novo* Synthese die Zelloberfläche mit unaktivierten PAR aus intrazellulären Speichern ausstatten und bleiben so empfangsbereit für proteolytische Signalinduktion ihrer Umgebung [212, 213]. Dazu wird in Endothelzellen und Fibroblasten inaktiver PAR-1 zur Zelloberfläche transportiert und bildet einen zytoplasmatischen Rezeptorvorrat, der vor proteolytischer Aktivierung geschützt konstitutiv zwischen der Plasmamembran und früh-endosomalen Kompartimenten zirkuliert [214]. Bohm et al. (1996) postulieren für PAR-2 einen ähnlichen Mechanismus, ergänzt durch eine *de-novo* Synthese neuer Rezeptoren [212]. Im Rahmen dieses endozytotischen Austauschs der Rezeptoren an der Zelloberfläche werden inaktive PAR-1 aussortiert und der Zirkulation zwischen Zelloberfläche und Endosomen zugeführt, während aktivierte PAR-1 internalisiert und lysosomal degradiert werden [214, 215]. Im Gegensatz dazu ist bei aktivierten PAR-2 eine Internalisierung in endozytotische Vesikel zur Aktivierung von ERK1/2 erforderlich [216]. Die Regulation des endozytotischen

Transports der PAR-1 und PAR-2 ist komplex und bisher nur teilweise verstanden, für PAR-3 und PAR-4 liegen keine Erkenntnisse vor [180].

PAR werden von diversen gesunden Geweben exprimiert und üben dort eine Vielzahl von Funktionen aus, darunter Thrombozytenaggregation, Regulation der Endothelbarrierefunktion, Chemotaxis, Entzündung, Proliferation, Zelldifferenzierung, Wundheilung, Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Migration und Regeneration neuronaler Strukturen [182, 183]. Auffällig ist die Expression von PAR auf Primärtumoren und Tumorzelllinien, die mit dem hyperkoagulatorischen Status in über 90 % der untersuchten Tumorpatienten einhergeht [217, 218]: In einer Metaanalyse von 46 Publikationen zu den Schlagworten „PAR“, „Thrombin“ und „Cancer“ wurde die breite Expression von PAR-1 (77,3 %), PAR-2 (79,5 %), PAR-3 (12,6 %) und PAR-4 (54,9 %) in Primärtumoren festgestellt [179]. Auch in Tumorzelllinien fallen entgegengesetzte Effekte einer PAR-1 oder PAR-2 Aktivierung *in vitro* auf. Je nach verwendeter Tumorzelllinie konnte durch eine PAR Aktivierung die Proliferation, Migration und Invasion induziert als auch inhibiert oder Apoptose induziert werden, wobei die Effekte vom Rezeptor, Agonisten, der Konzentration und vom Tumormikromilieu abhängig zu sein scheinen [108, 134, 150, 177, 178, 219, 220].

1.3 Therapeutische Ansätze zur Behandlung maligner Ergüsse

1.3.1 Klinische Praxis

In der klinischen Praxis sind die Therapieoptionen von Patienten, die ein Tumorstadium mit malignen Ergüssen aufweisen, deutlich eingeschränkt. Zudem müssen die Symptome und der Zustand des Patienten, dessen Lebenserwartung und die Art des zugrunde liegenden Tumors berücksichtigt werden. Patienten mit schlechter Prognose sowie den Patienten, die nicht für einen operativen Eingriff zur Entfernung des Ergusses in Frage kommen, wird mittels Punktion unter Lokalanästhesie Linderung verschafft. Eine Punktion ist ausschließlich palliativ induziert, bringt dem Patienten einen symptomatischen Nutzen und birgt Risiken für Infektionen, Blutungen und einen Pneumothorax [221]. Trotz Punktion rezidivieren die Ergüsse rasch, im Mittel alle 4,2 Tage [222]. Als operative Alternativen stehen bei Pleuraergüssen lediglich eine Pleurodese (Induktion einer lokalen Entzündung im Pleuraspalt durch Applikation von Talkum, Tetracyclin, Bleomycin, Fibrin oder

Mitoxantron infolge derer die Pleurahäute zusammenwachsen), pleurale Dauerkatheter sowie pleuro-peritoneale Shunts zur Verfügung [223, 224]. Bei Perikardergüssen kann ebenfalls eine Drainage (Perikardiozentese) oder eine Perikardese (s. Pleurodese) durchgeführt werden [225]. Maligne Aszitesergüsse werden ebenfalls mittels wiederholter Punktion behandelt. Sofern die Patienten frei von intraperitonealen Tumoren sind und keine Tumorzellen im Erguss nachgewiesen werden können, kann ein peritoneovenöser Shunt gesetzt werden, während der Nachweis von chemosensitiven Tumorzellen im Aszites dagegen eine palliative intraperitoneale Chemotherapie erfordert [226].

Diverse Studien belegen, dass durch eine frühe antithrombotische Therapie mit dem Vitamin K-Antagonisten Warfarin oder den Prothrombinasekomplex inhibierenden niedermolekularen Heparinen (*low molecular weight heparin*, LMWH) das Tumorwachstum und die Metastasierung hinausgezögert werden können [227-229]. Kurzfristig resultiert aus einer Behandlung mit LMWH ein Überlebensvorteil für Tumorpatienten gegenüber keiner antithrombotischen Therapie [228]. LMWH sind Warfarin in der Unterdrückung der Tumorprogression überlegen und zeigen einen Überlebensvorteil, wobei sie sowohl antithrombotische Effekte haben aber auch direkt am Tumor wirken sollen [230-233]. In einer Anfang 2011 veröffentlichten großen Studie mit 25.570 Patienten konnte durch tägliche Einnahme von 75-300 mg Acetylsalicylsäure das Risiko für diverse Tumorerkrankungen ab dem fünften Jahr im Mittel signifikant um bis zu 20 % (10-60 % je nach Entität) gesenkt werden [234]. Die Effekte waren unabhängig von Risikofaktoren wie Geschlecht, Rauchen, etc., aber altersabhängig. Neben der hemmenden Wirkung auf die Thrombozytenaggregation beruht dieser Effekt auch wesentlich auf der antiinflammatorischen Wirkung der Acetylsalicylsäure. Aktuell läuft eine Studie zum Effekt des direkten Thrombininhibitors Lepirudin bei Patienten mit rezidivierendem kleinzelligen Lungenkrebs. Die Daten hierzu stehen noch aus.

In-vitro reduziert der direkte Thrombininhibitor Dabigatranetexilat die Invasivität von Brustkrebszellen, *in-vivo* nach 4 Wochen die Tumormasse in Mäusen um 50 % ohne Gewichtsverlust der Mäuse. Ferner wurden Blut- und Lebermetastasen um 50-60 % reduziert, womit eine direkte antiproliferative und antiinvasive Wirkung des Arzneistoffs belegt wird [235]. Antikoagulantien können das Ansprechen von Tumorzellen auf eine Chemotherapie schwach verbessern, wobei sie oft nur aufgrund des bereits bestehenden prokoagulatorischen Zustandes des Patienten

oder der prokoagulatorischen Wirkung diverser Zytostatika als Komedikation zur Thromboseprophylaxe verabreicht werden [236-241].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein prokoagulatorischer Status ist ein typisches Symptom von Tumorerkrankungen und deren Progression und geht mit tiefen Venenthrombosen sowie der Genese maligner Ergüsse einher, in denen Gerinnungsfaktoren nachgewiesen werden können. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss aktivierter Gerinnungsfaktoren auf Tumorzellen in malignen Ergüssen untersucht werden. Ziel war das Verständnis der Rolle von Gerinnungsfaktoren im Ergussmilieu und Metastasierungsprozess weiter zu verbessern, um möglichen Therapieansätzen mit Gerinnungsinhibitoren den Boden zu bereiten.

Dazu wurden zunächst benigne und maligne Ergüsse aus klinisch notwendigen Punktionen ausgewählt. Die Ergüsse und aus diesen isolierte Tumorzellen wurden hinsichtlich der Aktivität diverser Gerinnungsfaktoren sowie der Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren charakterisiert. Um die zahlreichen geplanten Versuche zu den biologischen Effekten von Gerinnungsfaktoren auf Tumorzellen durchführen zu können, wurden Tumorzelllinien aus unterschiedlichen Tumorentitäten sowie eine prä-maligne epitheliale Zelllinie als Zellmodelle ausgewählt und an diesen zunächst die PAR-1/2 Expression bestimmt. Danach wurde der Einfluss von malignen und benignen Ergüssen auf die Zellzahl und das Ansprechen auf Zytostatika untersucht sowie der Einfluss verschiedener Agonisten am PAR-1 (FIIa, SFLLRN) und PAR-2 (FXa, SLIGKV) Rezeptor auf die Zellzahl, das Ansprechen auf Zytostatika, das Migrationsverhalten und die Epitheliale-mesenchymale Transition.

Eine Einschränkung der Untersuchungen auf die Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa konnte erfolgen, da für diese in der klinischen Praxis etablierte inhibitorische Arzneistoffe wie Heparine und Heparinoide sowie neuere Arzneistoffe wie Dabigatran, Fondaparinux, Lepirudin und Rivaroxaban zur Verfügung stehen, die alle bereits eine Zulassung für unterschiedliche Indikationen besitzen. So konnten auch Untersuchungen zur Hemmwirkung der Gerinnungsinhibitoren Lepirudin (Refludan®) und Rivaroxaban (Xarelto®) auf das durch Ergüsse veränderte Wachstumsverhalten von Zellen durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Autoklav	Systemec, Wettenberg
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Blotkammer	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus, München
ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München
Durchflusszytometer FACSCalibur™	Beckton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer GalaxyArgon Plus	DakoCytomation, Hamburg
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer mini	Bio-Rad, München
Filmentwickler Curix 60	Agfa, Düsseldorf
Fluorimeter Infinite F200	Tecan, Crailsheim
Fotokamera Olympus E330	Olympus, Hamburg
iCycler MyiQ™	Bio-Rad, München
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena
MS2 Minishaker	IKA, Staufen
NanoDrop Spektrophotometer NS 1000	ThermoScientific, Langenselbold
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Orbital-Schüttler	IKA, Staufen
pH-Meter Microprocessor pH537	WTW, Weilheim
Pipetboy	Integra Bioscience, Fernwald
Plattenphotometer 5000 MR	Dynatech, Rückersdorf
Plattenphotometer Opsys MR	Dynex Technologies, Berlin

Powersupply Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Rollenmischer SRT6D	VWR, Darmstadt
Semi Dry Blot Kammer Whatman Fastblot	Biometra, Göttingen
Sofortbildkamera	ORMAF, Padova, Italien
Sonicator Sonoplus	Bandelin, Berlin
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomischer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühler (-30 °C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80 °C)	Heraeus, Hanau
UV-Transilluminator TI 1	Biometra, Göttingen
Vakuumpumpe	KNF, Freiburg
Zentrifuge Varifuge 20 RS	Heraeus, Hanau
Vortexer	IKA, Staufen
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad Julabo U3	Julabo, Seelbach

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien wurden in analytischen Reinheitsgraden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen.

100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Darmstadt
Accutase	PAA, Pasching, Österreich
AlamarBlue®	Invitrogen, Darmstadt
Anilin	Merck, Darmstadt
APS	Merck, Darmstadt
AT III, chromogener Assay	Dade Behring
Auftragspuffer (5x) PCR	Qiagen, Hilden
Carboplatin-Lösung	Apotheke des UK-SH, Kiel
DC™ Proteinassay	Bio-Rad, München
D-Dimer ELISA	Dade Behring, Marburg
Dithiotreitol	Biomol, Hamburg
Doxorubicin-Lösung	Apotheke des UK-SH, Kiel
EGF	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München

Faktor IIa	American Diagnostica, Pfungstadt
Faktor Xa	American Diagnostica, Pfungstadt
Fluorsafe™	Merck, Darmstadt
Formaldehyd-Lösung 4 % (w/v)	Walter CMP, Kiel
Fötales Kälberserum	Lonza, Basel, Schweiz
Hämatoxylinlösung	Merck, Darmstadt
Hoechst Dye 33342	Invitrogen, Darmstadt
Iod	Roth, Karlsruhe
IQ Sybr Green Supermix	Bio-Rad, München
Kaliumiodid	Roth, Karlsruhe
Keratinocyten Medium SFM	Gibco BRL, Eggenstein
Kernechtrotlösung	Merck, Darmstadt
Kollagen Typ I (rat tail)	Upstate, Lake Placid, USA
Kontroll-Plasma N	Dade Behring, Marburg
Kristallviolett-Lösung	Walter CMP, Kiel
Lepirudin (Refludan®)	Schering, Berlin
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Mangelplasmen Faktor II, V, VII, X	Dade Behring, Marburg
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MMLV-Reverse Transkriptase	Promega, Heidelberg
MTS-Proliferationsassay	Promega, Mannheim
NaCl 0,9 % (w/v)	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat-Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Oligo-dT-Primer	Promega, Heidelberg
PAR-1 Agonist SFLLRN	Tocris, Bristol, UK
PAR-2 Agonist SLIGKV	Tocris, Bristol, UK
PBS	PAA, Pasching, Österreich
PCR Auftragspuffer (5x)	Qiagen, Hilden
PD98056	Calbiochem, Darmstadt
Polyacrylamid-Lösung	Biomol, Hamburg
Protein C, chromogener Assay	Dade Behring, Marburg
Proteinmarker PageRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot
Prothrombinfragment F1+2-ELISA	Dade Behring, Marburg
Re-Blot Plus Strong	Chemicon, Schwalbach
Rinder Serumalbumin, Fraktion V	Biomol, Hamburg

Rinderhypophysenextrakt (RHE)	Gibco BRL, Eggenstein
Rivaroxaban (Xarelto®)	Bayer Schering Pharma, Berlin
RNAasin, RNase-Inhibitor	Gibco, Eggenstein
RNeasy Minikit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Total RNA Kit	Qiagen, Hilden
RPMI 1640 Medium	Gibco, Eggenstein
SuperSignal®-Kit	Thermo Scientific, Schwerte
S-2238, S-2765	Chromogenix, Mailand, Italien
Taq-DNA-Polymerase	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Sigma-Aldrich, München
TGF-β1	RD-Systems, Wiesbaden
Thrombin-Standard, human	NIBSC, Herts, UK
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich, München
Trypsin-EDTA 10x	PAA, Pasching, Österreich
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Wasser für die Chromatographie	Merck, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	Assistent, Sondheim
Einwegspritzen, steril (1/2/5/10/25ml)	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen	Sterilin, London, UK
Gerinnungsröhrchen	Dade Behring, Marburg
Kolbenhubpipetten	Eppendorf, Hamburg
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Kulturplatten (6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well)	Greiner, Frickenhausen
Objektträger	Assist, Sondheim
Optical Tape	Bio-Rad, München
Parafilm	American National Can, Gelsenkirchen
PCR Platten, 96 Well	Corning, Amsterdam, Niederlande
Reaktionsgefäße 0,5 - 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Protein-LoBind 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/ 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Roti-PVDF Membran	Roth, Karlsruhe

Serologische Pipetten (2/5/10/25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serum Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht
Silikoneinsätze Culture Inserts	Ibidi, Martinsried
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Spritzenvorsatzfilter Minisart 0,2 µM	Sartorius, Göttingen
ThinCert™ TC-Einsätze 24-Well, 8 µm	Greiner, Frickenhausen
Whatmann 3 MM Filterpapier	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturpetrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.4 Antikörper

<u>Antikörper/Antigen</u>	<u>Spezies/Isotyp</u>	<u>Hersteller</u>
E-Cadherin	Kaninchen, polyklonal	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
HSP90 α/β	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg
Humanes IgG	Maus, IgG2a	Acris Antibodies, Herford
Humanes IgG, PE	Maus, IgG1	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Kaninchen IgG, Alexa Fluor 555	Ziege, F(ab') ₂ Fragment	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
Kaninchen IgG, HRP	Ziege	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
Maus IgG, Alexa Fluor 555	Ziege, F(ab') ₂ Fragment	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
Maus IgG, FITC	Ratte, IgG2a	Biolegend, Uithoorn, Niederlande
p44/42 MAP-Kinase	Kaninchen, IgG	Cell Signalling, Frankfurt a. M.
PAR-1, PE	Maus, IgG1	Immunotech, Marseille, Frankreich
PAR-2	Maus, IgG2a	Lifespan Biosciences, Seattle, USA
phospho-p44/42 MAP-Kinase	Kaninchen, IgG	Cell Signalling, Frankfurt a. M.

2.1.5 Primer

Die PCR-Primer wurden von der Firma Biometra, Göttingen synthetisiert.

E-Cadherin

Vorwärtsprimer 5': TCT TCC CCG CCC TGC CAA TC

Rückwärtsprimer-5': GCC TCT CTC GAG TCC CCT AG

L1CAM

Vorwärtsprimer 5': TCA CGG GCA ACA ACA GCA ACT

Rückwärtsprimer-5': CGG CTT CCT GTC AAT CAT GCT

N-Cadherin

Vorwärtsprimer 5': GTG CAA TTA GCC AAG GGA ATT C

Rückwärtsprimer-5': CCT GTT CCA CTC ATA GGA GG

Slug

Vorwärtsprimer 5': ATA TTC GGA CCC ACA CAT TAC CT

Rückwärtsprimer-5': GCA AAT GCT CTG TTG CAG TGA

Snail

Vorwärtsprimer 5': CTG CTC CAC AAG CAC CAA GAG TC

Rückwärtsprimer-5': CCA GCT GCC CTC CCT CCA C

TATA-Box-bindendes Protein (TBP)

Vorwärtsprimer 5': GCT GGC CCA TAG TGA TCT TT

Rückwärtsprimer-5': CTT CAC ACG CCA AGA AAC AG

Vimentin

Vorwärtsprimer 5': TGG CAC GTC TTG ACC TTG AA

Rückwärtsprimer-5': GGT CAT CGT GAT GCT GAG AA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zelllinien

Die Zellen wurden entweder von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) oder von der *American Type Culture Collection* Zellbank (ATCC, Wesel) bezogen. Die HPDE-Zellen wurden von Herrn Ming-Sound Tsao, Montreal, Kanada, zur Verfügung gestellt.

PANC-1 ist eine humane Pankreasgangkarzinom-Zelllinie und wurde 1975 aus dem Pankreastumor eines Kaukasiers entnommen [242]. Die humane Leukämiezelllinie THP-1 wurde 1978 aus dem peripheren Blut eines einjährigen Kindes mit akuter myeloischer Leukämie isoliert [243].

Die humane pankreatische duktale Epithelzelllinie (HPDE) wurde aus gesundem, humanem Pankreasgewebe isoliert und durch Transduktion mit dem E6/E7-Onkogen des humanen Papillomavirus-16 (HPV-16) immortalisiert. Die Zellen zeigten keine Tumorigenität nach Inokulation in SCID-Mäuse und haben darüber hinaus einen fast normalen Phäno- und Genotyp einer pankreatischen Gangzelllinie (Expression von Cytokeratin-7, -8, -18, -19, Carboanhydrase II, normales K-RAS, C-myc, Smad 4, p16INK4A Genotyp). Die Zellen tragen den Wildtyp des Tumorsuppressors p53, dessen Expression durch die Bindung an das virale E6-Onkogen vermindert ist [244, 245]. THP-1 Zellen wachsen suspensiv, HPDE und PANC-1 Zellen adhärent.

2.2.1.2 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter einer Sterilbank ausschließlich mit sterilen Materialien, Lösungen und Geräten. Zum Ausschluss von Kontamination mit Mykoplasmen wurden alle Zelllinien regelmäßig mit dem *MycoAlert Mycoplasma Detection Kit* (Lonza) überprüft.

Adhärenente Zellen wurden im jeweiligen Kulturmedium (Tab. 5) bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert und dann passagiert. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5-15 Minuten im Brutschrank von der Kulturflasche abgelöst. Die Reaktion wurde mit 5 ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in einem 50 ml Röhrchen bei 1.200 U/min für 7 Minuten sedimentiert. Der Überstand

wurde entfernt, das Zellpellet mit 6 ml Kulturmedium resuspendiert und je nach Wachstumsrate 1-3 ml der Zellsuspension mit 8 ml Kulturmedium in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Bei allen Kulturen wurde mindestens einmal wöchentlich das Medium komplett gewechselt, wenn keine ausreichende Konfluenz zur Passagierung erreicht wurde.

Zur Vorbereitung von Versuchen wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin oder mittels eines Zellschabers von der Kulturflasche abgelöst, mit 10 ml Medium (Kulturmedium oder Mangelmedium) versetzt und 7 Minuten bei 1.200 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Ausschlusstest auf 1×10^5 vitale Zellen/ml eingestellt. Dazu wurden 90 μ l Trypanblau-Lösung mit 10 μ l Zellsuspension 5 Minuten in einem Reaktionsgefäß inkubiert und anschließend in einer Neubauer-Zählkammer die ungefärbten Zellen gezählt. Zellen mit intakter Zellmembran erscheinen durchscheinend hell, Zellen mit defekter Zellmembran können den Farbstoff nicht aus dem Zytosol transportieren und färben sich tiefblau ein [246]. In der Regel korreliert die Färbung der Zellen mit der Vitalität, da apoptotische Zellen rasch ihre Membranintegrität verlieren.

Die suspensiv wachsenden THP-1 Zellen wurden alle drei Tage durch Transfer von bis zu 2 ml Zellsuspension in 6 ml frisches Kulturmedium passagiert. Der Trypanblau-Ausschlusstest wurde abweichend von der obigen Beschreibung direkt mit der Zellsuspension aus der Kulturflasche durchgeführt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Zelllinien und jeweilige Kultur- und Mangelmedien. Kulturmedien wurden in der routinemäßigen Zellkultur eingesetzt, Mangelmedien zur Serumstarvierung im Rahmen von Versuchen (% = v/v).

Zelllinie	Typ	Kulturmedium	Mangelmedium
PANC-1	Adenokarzinom des Pankreas, human	RPMI 1640 10 % FCS	RPMI 1640 1 % o. 0,5 % FCS
THP-1	Akute myeloische Leukämie, human	1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Na-Pyruvat (100 mM)	1 % L-Glutamin (200 mM) 1 % Na-Pyruvat (100 mM)
HPDE	Pankreatische Gangepithelzellen, immortalisiert, human	Mischung aus A+B (1:1) A: RPMI 1640 10 % FCS 1 % L-Glutamin (200 mM) B: KFSM 50 μ g/ml RHE 5 ng/ml EGF (5 % FCS final)	Mischung aus A+B (1:1) A: RPMI 1640 2 % FCS 1 % L-Glutamin (200 mM) B: KFSM 50 μ g/ml RHE 5 ng/ml EGF (1 % FCS final)

2.2.1.3 Aufarbeitung von Ergüssen und Kultivierung isolierter Zellen

Die Ergüsse maligner und benigner Genese stammten aus klinisch notwendigen Punktionen an Patienten, die sich zwischen 2004 und 2008 auf den beteiligten Stationen des UK-SH, Campus Kiel, vorgestellt hatten. Punktierte Ergüsse wurden unverzüglich ins Labor verbracht und zügig aufgearbeitet. Alle Arbeiten am Ergussmaterial, den isolierten Zellen und die Archivierung der Daten wurden im Vorfeld von der Ethik-Kommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter dem Aktenzeichen AZ D421/04 am 30.06.2004 genehmigt.

Jeder Erguss wurde durch zehnmünütige Zentrifugation in 50 ml Kulturröhrchen bei 1.200 U/min von zellulären Bestandteilen und koagulierten Proteinen getrennt und für weitere Arbeiten tiefgekühlt (-30 °C) archiviert. Das Zellpellet wurde mit 5 ml Kulturmedium (Tab. 6) resuspendiert und mit weiteren 8 ml Kulturmedium in 250 ml Zellkulturflaschen zur Kultur angesetzt. Die Zellen wurden ab diesem Zeitpunkt als Patientenzellen bezeichnet. Zellen sowie Erguss waren durch eine fortlaufende Nummerierung ab Eingang im Labor eindeutig identifizierbar. Eine tabellarische Aufstellung der verwendeten Ergüsse und Patientenzellen befindet sich im Ergebnisteil (Kap. 3.1.1; Tab. 21).

Tabelle 6: Medien für die Kultur von Patientenzellen: Das Kulturmedium wurde in der routinemäßigen Zellkultur eingesetzt, das Mangelmedium zur Serumstarvierung im Rahmen von Versuchen (% = v/v).

Zelllinie	Typ	Kulturmedium	Mangelmedium
Patientenzellen	s. Kap. 3.1.1 Tab. 21	RPMI 1640	RPMI 1640
		10 % FCS	1 % FCS
		1 % L-Glutamin (200 mM)	1 % L-Glutamin (200 mM)
		10 % Erguss	10 % Erguss

2.2.1.4 Mikroskopie und Fotografie

Im Rahmen der Zellkultur und zur Fotografie der Zellen kam ein Durchlichtmikroskop Axiovert 25 sowie eine digitale SLR-Kamera Olympus E-330 zum Einsatz. Die jeweiligen Vergrößerungen sind bei den betreffenden Abbildungen angegeben.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Fibrinfärbung nach Weigert

Von Proteinklumpen, die zuvor aus den Ergüssen isoliert worden waren, wurden dünne Schnitte angefertigt, auf einem Objektträger fixiert und 15 Minuten mit 1-prozentiger (w/v) Kernechtrotlösung gefärbt. Nach Entfärben mit Wasser für zehn Minuten wurden die Präparate vorsichtig mit Zellstoff getrocknet und zehn Sekunden mit Weigertscher Lösung (Hämatoxylinlösung) gefärbt. Nach erneuter zehnmütiger Spülung mit Wasser wurde das Präparat mit Zellstoff getrocknet. Anschließend wurde für zwei Minuten mit Lugolscher Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung) gefärbt, das Präparat ohne Spülschritt mit Zellstoff getrocknet und in ethanolischer Anilinöl-Xylo-Lösung (1:1) differenziert. Kerne stellten sich unter dem Mikroskop rot dar, Fibrin blau bis violett. Die Fibrinfärbung nach Weigert wurde mit externer Hilfe durchgeführt.

2.2.2.2 Herstellung von Ganzzelllysaten

HPDE und PANC-1 Zellen wurden in 6 Well Platten über Nacht kultiviert und für 12 Stunden mit Mangelmedium serumstarviert. Anschließend wurde ohne oder mit 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 µM SFLLRN oder 100 µM SLIGKV für 15 Minuten stimuliert. Einige Ansätze wurden zuvor für 30 Minuten mit 25 µM ERK1/2-Inhibitor PD98056 inhibiert. Das Medium wurde entfernt und mit 2 ml PBS gespült. Die Zellen wurden mit 80-150 µl 2x-Lämmli-Puffer (Tab. 7) versetzt und mit einem Zellschaber zügig von der Kulturplatte gelöst. Das erhaltene Zelllysate wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mittels Ultraschall 4 Sekunden lang homogenisiert. Die Lagerung erfolgte tiefgekühlt bei -30 °C.

Tabelle 7: Zusammensetzung des 2x-Lämmli-Puffers zur Herstellung von Ganzzelllysaten.

2x-Lämmli-Puffer (pH 7,6)	
128 mM	Tris-Base
4,6 % (w/v)	SDS
10 % (v/v)	Glycerol
ad 100 ml	Aqua dest.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung aufgearbeiteter Proteine

Die Bestimmung des Proteingehalts der hergestellten Ganzzelllysate erfolgte durch den *D_c-Proteinassay* (Bio-Rad, München) nach Anleitung des Herstellers. Der Assay beruht auf einer Detergenzien-unempfindlichen Proteinbestimmung nach Lowry, die aus zwei Reaktionsschritten besteht [247-249]. Im ersten Schritt findet eine Biuret-Reaktion statt, wobei in alkalischer Lösung ein quadratisch-planarer Komplex aus Kupfer(II)-Ionen und Peptidbindungen entsteht. Im zweiten Schritt wird Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduziert, welches das gelbe Folin-Ciocalteau Reagenz (Molybdän(VI)- und Wolfram(VI)-Heteropolysäuren) zu Molybdänblau reduziert [250]. Die Auswertung erfolgte photometrisch am Opsys MR (Dynex Technologies) mit Hilfe der *Revelation QuickLink* Software bei einer Wellenlänge von 630 nm [251]. Die Proben wurden mit 2x-Lämmli-Puffer auf den gleichen Proteingehalt (7-20 µg) eingestellt. Die Lagerung erfolgte tiefgekühlt bei -30 °C.

2.2.2.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld, wobei das zugegebene Natriumdodecylsulfat (SDS) als anionisches Tensid die Eigenladung der Proteine überdeckt. Die so nach Größe aufgetrennten Proteine können anschließend qualitativ oder quantitativ nachgewiesen werden [252].

Tabelle 8: Zusammensetzung des 4x-Farbpuffers und des 10x-Laufpuffers für die SDS-PAGE.

4x-Farbpuffer	
0,005 % (w/v)	Bromphenolblau
2,5 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
100 ml	2x-Lämmli-Puffer (pH 7,6)
10x-Laufpuffer	
25 mM	Tris-Base
0,1 % (w/v)	SDS
190 mM	Glycin
ad 1.000 ml	Aqua dest.

Die auf 7-20 µg Protein eingestellten Proben wurden mit 2x-Lämmli-Puffer auf 15 µl ergänzt und mit 5 µl 4x-Farbpuffer (Tab. 8) versetzt. Die Proben wurden bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert, anschließend sofort auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden zu je 10 µl in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Ein Proteinstandard wurde zu 2,5 µl pipettiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte

nach 4-prozentigem (w/v) Sammelgel im 8-prozentigen (w/v) Trenngel bei 100-150 Volt (~35 mA) im Laufpuffer (Tab. 8 und 9) bis zum Austritt der Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel. Die aufgetrennten Proteine wurden zum Schutz vor Diffusionsprozessen und zur Durchführung immunologischer Nachweisreaktionen auf eine reißfeste Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels für die SDS-PAGE.

Sammelgel 4 % (w/v)	Trenngel 8 % (w/v)	
5,45 ml	1,5 ml	Aqua dest.
2,8 ml	-	Gelpuffer I (pH 6,8): 1 M TRIS-Base, 0,4 % (w/v) SDS, ad 200 ml Aqua best.
-	0,625 ml	Gelpuffer II (pH 8,8): 1,5 M TRIS-Base, 0,4 % (w/v) SDS, ad 200 ml Aqua dest.
3,0 ml	325 µl	PAA-Lösung 30 % (w/v)
37,5 µl	13,5 µl	APS-Lösung 10 % (w/v)
15 µl	2,5 µl	TEMED

2.2.2.5 Proteintransfer (Western-Blotting)

Die negativ geladenen Proteine wurden für 45 Minuten bei einer konstanten Stromstärke (1,25 mA/cm²) im *Semidry*-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurden mit Puffern getränkte Whatman Papiere wie folgt gestapelt (Tab. 10):

- sechs in Blot-Puffer A getränkte Whatman Papiere
- drei in Blot-Puffer B getränkte Whatman Papiere
- die PVDF-Membran (1 Minute in Methanol getränkt, 1 Minute in Wasser gewaschen)
- das Gel und
- sechs in Blot-Puffer C getränkte Whatman Papiere

Tabelle 10: Zusammensetzung der Blot-Puffer A, B und C zum Proteintransfer auf die PVDF-Membran.

Blot-Puffer A (pH 11,0)	Blot-Puffer B (pH 10,6)	Blot -Puffer C (pH 10,6)	
300 mM	25 mM	25 mM	Tris-Base
20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)	Methanol
-	-	40 mM	Aminocaprinsäure
ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml	Aqua dest.

2.2.2.6 Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran 10 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttelbad mit TBS-Tween gespült und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween blockiert (Tab. 11). Die Proteine aus dem Magermilchpulver binden dabei an die freie Oberfläche der PVDF-Membran, und verhindern so unspezifische Bindungen der Antikörper.

Tabelle 11: Zusammensetzung der 1x-TBS und der TBS-Tween-Lösung.

TBS (pH 7,6)	
20 mM	Tris-Base
140 mM	Natriumchlorid
ad 1.000 ml	Aqua dest.
TBS-Tween	
0,5 ml	Tween 20
ad 1.000 ml	TBS (pH 7,6)

Die spezifischen Erstantikörper wurden je nach Herstellerangaben mit 5 % (w/v) Magermilchpulver oder 5 % (w/v) BSA in TBS-Tween verdünnt und mit der PVDF-Membran über Nacht bei 4 °C in einem 50 ml Röhrchen auf einem Kipp-/Rollmischer inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran bei Raumtemperatur dreimal je 10 Minuten mit TBS-Tween gespült, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Alle Zweitantikörper waren Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt und wurden 1:2.000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween angesetzt. Die gewaschene Membran wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in einem 50 ml Röhrchen mit den entsprechenden Zweitantikörpern inkubiert.

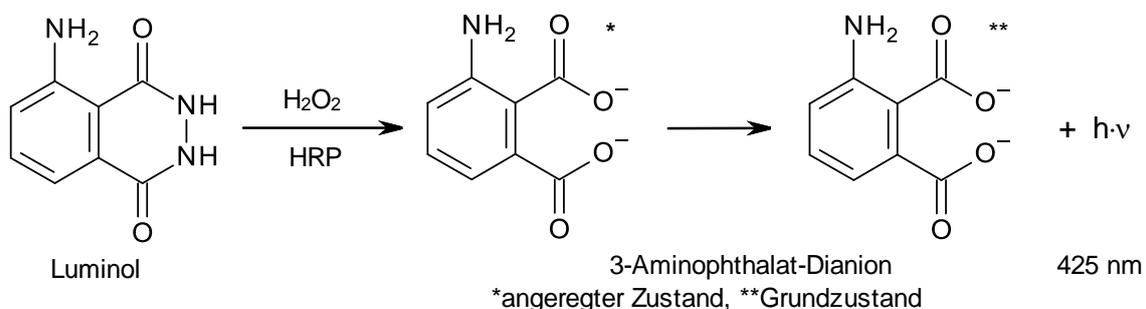


Abbildung 9: Prinzip der Meerrettich-Peroxidase (HRP)-katalysierten Biolumineszenz-Reaktion.

Vor der Entwicklung wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-Tween gewaschen. Zur Entwicklung wurde eine Luminol-Substratlösung auf den Blot gegeben, wodurch Luminol in der Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch die HRP unter Emission von Strahlung (425 nm) zu 3-Aminophthalat oxidiert wird (Abb. 9) [253]. Die Chemolumineszenz wurde im *ChemiDoc XRS* in Form von Banden dargestellt und mittels der Software *Quantity 1-D* ausgewertet. Durch den Proteinstandard war eine Größenordnung der markierten Proteine möglich. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde das Haushaltsprotein HSP 90 herangezogen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Die Isolierung der RNA erfolgte mit dem *RNeasy Minikit* (Qiagen, Hilden). Dazu wurden die benötigten Zellen wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben kultiviert, in 6 oder 12 Well Platten ausgesät und entsprechend des Versuchsansatzes über 24, 48 oder 72 Stunden ohne oder mit 10 ng/ml TGF- β 1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μ M SFLLRN, 100 μ M SLIGKV stimuliert. Danach wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 350 μ l Lysepuffer (25 mM Natriumcitrat, 3,5 M Guanidinthiocyanat, 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol, Wasser) lysiert. Das enthaltene β -Mercaptoethanol löst dabei Disulfidbrücken und die chaotropen Salze Guanidin und Thiocyanat Wasserstoffbrückenbindungen in Proteinen auf, wodurch u.a. Enzyme mit Nukleaseaktivität inaktiviert werden. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst, das Zelllysat in ein *Qiasredder*-Homogenisationsröhrchen überführt und bei 13.000 U/min für 1 Minute zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus). Unter den eingestellten Pufferbedingungen bindet die doppelsträngige DNA an die Kieselgelmatrix des *Qiasredders*, während sich die einzelsträngige RNA im Durchfluss befindet. Membranbestandteile sind weitgehend zu groß, um die Kieselgelmatrix zu passieren, und werden ebenfalls abgetrennt. Das Filtrat wurde zur Fällung der RNA mit 350 μ l 70 % (v/v) Ethanol versetzt und gut durchmischt. Das komplette Volumen wurde auf eine *RNeasy*-Säule gegeben und bei 10.000 U/min 1 Minute zentrifugiert, wobei die RNA an die Kieselgelmatrix der Säule bindet. Das Filtrat wurde verworfen. Die Kieselgelmatrix wurde mit 700 μ l Waschpuffer (Guanidinthiocyanat, TRIS-HCl, Ethanol, Wasser) für 1 Minute bei 10.000 U/min gewaschen. Anschließend folgten zwei weitere Waschschrte mit ethanolhaltigem

Puffer, bevor die RNA mit 35 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert wurde. Die Gehaltsbestimmung der aufgereinigten RNA erfolgte am Peqlab NanoDrop Photometer bei 260/280 nm. Isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Reverse Transkription (RT)

Für die Synthese der cDNA wurden 0,6-2,0 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf 11,4 µl Gesamtvolumen ergänzt. Der Ansatz wurde mit 1 µl Oligo-dT Primern (500 µg/ml) versetzt und 3 Sekunden zentrifugiert. Zum *primer annealing* wurde für 5 Minuten bei 95 °C im Thermomixer erhitzt und danach sofort für 1 Minute auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 11,6 µl Mastermix der Tabelle 12 zugefügt und für 90 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -30 °C aufbewahrt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkription je Probe.

RT-Mastermix (je Probe)	
5 µl	5x-M-MMLV <i>First Strand Buffer</i>
5 µl	dNTPs (2,5 mM/dNTP)
0,6 µl	RNAsin (4 U/µl)
1,0 µl	MMLV-RT (200 U/µl)

2.2.3.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Realtime-PCR)

Die Realtime-PCR beruht auf der konventionellen PCR, zusätzlich ist jedoch eine Quantifizierung der Amplifikate über Einlagerung fluoreszierender Sonden in Echtzeit möglich. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I interkaliert dabei zwischen die DNA-Basen und markiert somit doppelsträngige DNA. Die dadurch erhöhte Fluoreszenz des SYBR-Green-Moleküls kann fluorimetrisch am Ende jedes PCR-Zyklus erfasst werden, und erlaubt eine relative Quantifizierung der Amplifikate gegenüber einem *housekeeping gene*.

Zur Auswertung der Realtime-PCR-Experimente wurde die relative Quantifizierung nach Pfaffl herangezogen [254]. Sie beruht auf dem Verhältnis der Genexpression des Zielgens gegenüber einem idealerweise nicht regulierten *housekeeping gene*, in diesem Fall dem *TATA box binding protein* (TBP). Als Rechengröße dienen die CP (*crossing point*)-Werte, die der Anzahl der PCR-Zyklen entsprechen, die zum Erreichen eines konstanten Fluoreszenzniveaus über dem Hintergrundrauschen nötig sind. Am CP befinden sich in allen Ansätzen eines Versuches gleiche Mengen

neu synthetisierter DNA. Das Berechnungsmodell nach Pfaffl beruht auf dem Expressionsunterschied zwischen behandelten Ansätzen und unbehandelten Kontrollansätzen des Zielgens im Zähler gegenüber dem Expressionsunterschied zwischen behandelten Ansätzen und unbehandelten Kontrollansätzen des Referenzgens im Nenner (Abb. 10).

$$Ratio = \frac{2^{(CP\ Zielgen\ (Kontrolle) - CP\ Zielgen\ (Behandlung))}}{2^{(CP\ Referenzgen\ (Kontrolle) - CP\ Referenzgen\ (Behandlung))}}$$

Abbildung 10: Formel für die relative Quantifizierung der Genexpression nach Pfaffl [254].

Die Realtime-PCR erfolgte in Doppelbestimmungen. Die cDNA wurde mit Wasser auf ein Viertel der Ausgangskonzentration verdünnt und 5 µl je Well einer 96 Well PCR-Platte vorgelegt. Es wurden 20 µl Mastermix (Tab. 13) ergänzt und die Platte mit selbstklebender PCR-Folie verschlossen und kurz zentrifugiert. Die Realtime-PCR erfolgte im *iCycler MyiQ Single Color Realtime PCR Detection System* von BioRad unter Verwendung der *MyiQ*-Software.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Realtime-Mastermixes je Probe.

Realtime-Mastermix (je Probe)	
15 µl	SYBR Green
0,15 µl	Vorwärtsprimer
0,15 µl	Rückwärtsprimer
4,7 µl	Aqua dest.

2.2.4 Analytische Methoden

2.2.4.1 Koagulometrie

Die aufgetauten Ergüsse wurden auf dem Vortexer durchgemischt, 2 ml in eine Serum-Monovette (Citrat) gefüllt und bei 4.000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein Gerinnungsröhrchen überführt und durch das Zentrallabor im UK-SH, Campus Kiel, im Rahmen der Routine-Diagnostik analysiert. Dabei kamen Mangelplasmen zur Bestimmung der Faktoren II, V, VII, X und Fibrinogen zum Einsatz. Der Mangel an einem bestimmten Gerinnungsfaktor im Plasma führt zu

einer verlangsamten Gerinnung und somit zu einer verlängerten Thromboplastinzeit (TPZ). Der aufgearbeitete Erguss wurde dem entsprechenden Mangelplasma zugefügt und der Einfluss auf die TPZ bestimmt. Die Aktivität der Gerinnungsfaktoren wird als Prozent der Norm (100 % = 1 U/ml) relativ zu einem gepoolten Kontrollplasma gemessen. Die Gehaltsbestimmung von PC und AT III wurde mit chromogenen Assays durchgeführt, der Gehalt an Prothrombinfragment F1+2 und D-Dimeren wurde mittels Sandwich-ELISA ermittelt. Die gesammelten Daten wurden vom Zentrallabor zugestellt und mittels *Microsoft Excel 2007* ausgewertet.

2.2.4.2 Bestimmung der Proteaseaktivität mit chromogenen Peptidsubstraten

Grundlage dieses Versuchs sind die Monographien 2.7.18 und 2.7.19 des Europäischen Arzneibuchs 6.2, die hinsichtlich der eingesetzten Puffer und der Messmethodik modifiziert wurden [255, 256]. Der Methode liegt die proteolytische Umsetzung chromogener Substrate (S-2238: H-D-Phenylalanyl-L-pipecolyl-L-arginin-p-nitroanilin-dihydrochlorid; S-2765: N- α -Benzyloxycarbonyl-D-arginyl-L-glycyl-L-arginin-p-nitroanilin-dihydrochlorid) durch die zu bestimmenden Serinproteasen zugrunde, wobei p-Nitroanilin (pNA) vom Substrat abgespalten wird (Abb. 11). Das unhydrolysierte Substrat hat ein Absorptionsmaximum von ca. 300 nm, wogegen das Absorptionsmaximum von pNA bei ca. 380 nm liegt. Demnach kann bei 405 nm die Absorption des gebildeten pNA möglichst nah an dessen Absorptionsmaximum, aber außerhalb des Absorptionsbereichs des unhydrolysierten Substrates gemessen werden.

Die kinetische Messung der Substratumsetzung durch die inkubierte Enzymquelle erfolgte bei dieser Methode nach Reaktionsstart über mindestens drei Minuten im Plattenphotometer *Infinite F200* (Tecan, Crailsheim). Zusätzlich wurden alle Messwerte hintergrundkorrigiert durch eine turbidimetrische Messung bei 562 nm, da besonders Ergussfluid im Laufe der Messung sukzessive eintrübte. Die turbidimetrischen Werte wurden von den pNA-Werten subtrahiert. Alle Reagenzien sowie das Plattenphotometer wurden auf 37 °C vortemperiert.

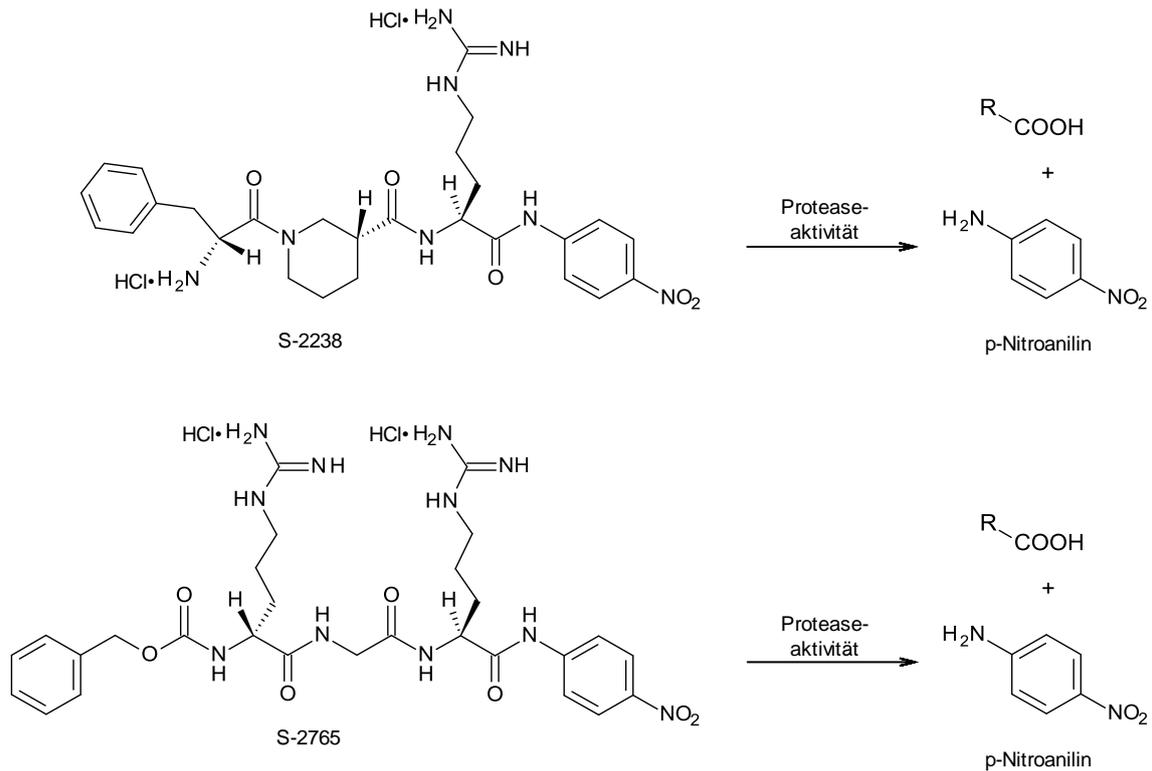


Abbildung 11: Die Umsetzung der chromogenen Substrate S-2238 und S-2765 zum absorptionsphotometrisch fassbaren *p*-Nitroanilin wird durch Proteaseaktivität (FIIa, FXa, etc.) katalysiert.

Mittels der verwendeten wenig spezifischen chromogenen Substrate (S-2238 für FIIa; S-2765 für FXa; Tab. 14) kann nur eine Gesamtaktivität aller im Erguss enthaltener Proteasen ermittelt werden, die das Substrat umsetzen [257]. Um die Gesamtaktivität von den Einflüssen anderer Proteasen zu bereinigen, wurde die Aktivität des untersuchten Faktors durch einen selektiven Inhibitor gehemmt. FIIa wurde mit dem rekombinanten, selektiven Polypeptid Lepirudin gehemmt. Die Aktivität von Faktor Xa konnte mit dem niedermolekularen Rivaroxaban inhibiert werden. Die resultierende Aktivitätsdifferenz aus dem gehemmt (Restaktivität) und dem ungehemmten (Gesamtaktivität) Ansatz entspricht der Aktivität des untersuchten Faktors. Die minimal nötige Konzentration der Inhibitoren zur Hemmung der gesamten Proteaseaktivität des Ansatzes wurde an der maximalen Enzymaktivität der jeweiligen Kalibrierung austitriert. Im Aktivitätsassay wurde mindestens die doppelte Konzentration der minimal nötigen Konzentration des Inhibitors zur zuverlässigen Hemmung des zu bestimmenden Faktors eingesetzt. Die finale Kinetik für die Berechnung der Enzymaktivität wurde nach Subtraktion der turbidimetrischen Werte von den jeweiligen ungehemmten oder gehemmt Messwerten erhalten, indem diese Trübungs-korrigierten Messwerte voneinander subtrahiert wurden (ungehemmt – gehemmt). Dabei wurden alle Ergüsse dreifach

parallel vermessen, wobei jede Kinetik separat pipettiert und vorinkubiert wurde. Die erhaltenen Daten wurden mit der Software *Microsoft Excel 2003* ausgewertet. Angegeben sind arithmetisches Mittel und Standardabweichung der ermittelten Aktivitäten aus je drei unabhängigen Messungen jeder Probe.

Tabelle 14: Spezifität der im chromogenen Assay verwendeten Substrate gegenüber ausgewählten Plasmaproteasen humaner (H) oder boviner (B) Herkunft in 50 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl bei einem pH von 8,3: Faktor Xa (FXa), Faktor XIa (FXIa), aktiviertes Protein C (aPC), Gewebeplasminogen-Aktivator (t-PA), Komplement Protein C1s (C1s).

Substrat	FIIa (B)	FXa (B)	FXIa (H)	aPC (H)	Plasmin (H)	Single chain t-PA (H)	Plasma Kallikrein (H)	C1s (H)	Substrat Konz. mM
S-2238 (FIIa)	100	5	5	40	5	5	60	2	0,2
S-2765 (FXa)	0	100	1	2	1	5	15	1	0,22

2.2.4.3 Chromogener Assay zur Bestimmung der FIIa-Aktivität

Die Kalibrierung des chromogenen Assays zur Bestimmung der FIIa-Aktivität erfolgte täglich vor Versuchsbeginn mit dem *WHO 2nd International Standard for Thrombin 01/580 US NIBSC*. Der FIIa-Standard wurde mit HEPES-Puffer pH 7,4 nach Angaben der WHO (Tab. 15) auf 100 U/ml eingestellt und auf Eis gekühlt aufbewahrt. Aus dieser Stammlösung wurden je dreifache Ansätze für die einzelnen Messpunkte der Kalibrierung durch Verdünnen mit HEPES-Puffer in *Protein LoBind Caps* vorbereitet und auf 37 °C temperiert. Das lyophilisierte Substrat S-2238 wurde mit HEPES-Puffer zu 4 mM rekonstituiert und lichtgeschützt auf 37 °C temperiert.

Tabelle 15: Zusammensetzung des HEPES-Puffers zur Aktivitätsbestimmung von FIIa.

HEPES-Puffer (pH 7,4)	
10 mM	HEPES
150 mM	NaCl
ad 1.000 ml	Aqua dest.

Für jede einzelne Messung wurden 100 µl der jeweiligen FIIa-Lösung mit 100 µl Substrat S-2238 in einer 96 Well Mikrotiterplatte vereint und die Messung umgehend gestartet. Das Messprogramm begann standardisiert mit 10 s orbitalem Schütteln (Amplitude: 3 mm) zur Durchmischung des Ansatzes vor der eigentlichen Messung.

Gemessen wurde über mindestens 3 Minuten, meist 35 Zyklen, bestehend aus je einem Absorptionswert bei 405 nm (fünf separate Messpunkte im Well, gemittelt) und einem Absorptionswert bei 562 nm (fünf separate Messpunkte im Well, gemittelt).

Um die nicht durch FIIa katalysierte Substratumsetzung von S-2238 zu pNA während der Vermessung der Ergüsse zu quantifizieren, wurde der selektive FIIa-linhibitor Lepirudin eingesetzt. Per Definition hemmt eine *anti thrombin unit* (ATU) Lepirudin eine U FIIa der WHO FIIa-Präparation 89/588 [258]. Es wurde eine Titration mit steigenden Konzentrationen Lepirudin an der höchsten Enzymaktivität der Kalibrierung durchgeführt. Dazu wurde der HEPES-Puffer in diesem Ansatz schrittweise durch steigende Konzentrationen Lepirudin ersetzt. Das Lepirudin wurde zuvor mit Aqua ad injectabilia zu 5 mg/ml rekonstituiert und auf 37 °C temperiert.

2.2.4.4 Chromogener Assay zur Bestimmung der FXa-Aktivität

Die Kalibrierung dieses Assays erfolgte in Ermangelung eines Standards der WHO täglich vor Versuchsbeginn mit aufgereinigtem humanen FXa (American Diagnostica, Pfungstadt). Das lyophilisierte Protein wurde mit Aqua ad injectabilia zu 100 U/ml rekonstituiert. Aus dieser Stammlösung wurden dreifache Ansätze für die einzelnen Messpunkte der Kalibrierung durch Verdünnen mit TRIS-Puffer in *Protein LoBind Caps* vorbereitet, 3 Minuten auf 37 °C temperiert und direkt vermessen (Tab. 16). Das lyophilisierte Substrat S-2765 wurde mit TRIS-Puffer zu 4 mM rekonstituiert und lichtgeschützt auf 37 °C temperiert. Die Messung wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung des TRIS-Puffers zur Aktivitätsbestimmung von FXa.

TRIS-Puffer (pH 8,3)	
50 mM	TRIS-Base
150 mM	NaCl
10 mM	CaCl ₂
0,1 % (w/v)	PEG 6.000
ad 1.000 ml	Aqua dest.

Um den nicht durch FXa katalysierten Anteil der Substratumsetzung zu quantifizieren, wurde der selektive FXa-Inhibitor Rivaroxaban eingesetzt. Es wurde eine Titration mit steigenden Konzentrationen Rivaroxaban an 0,2 U/ml FXa durchgeführt. Dazu wurde der TRIS-Puffer schrittweise durch Rivaroxaban ersetzt.

Rivaroxaban wurde zuvor mit 100 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) zu 0,01 mM gelöst. Alle Ansätze enthielten eine finale Konzentration von 0,5 % (v/v) DMSO. Rivaroxaban wurde von der Bayer Vital GmbH, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

2.2.4.5 Proteaseaktivitätsstudien in malignen Ergüssen

Zur Bestimmung der Proteaseaktivität im Ergussmaterial wurde zum Ansatz mit Inhibitor (2.000 ATU Lepirudin oder 1,0 µM Rivaroxaban) statt des Proteasestandards eine Verdünnung des Erguss im jeweiligen Puffer hinzugefügt. Dadurch wurden die Ergüsse im finalen Ansatz mit Substrat 1:10 verdünnt vermessen. Die Durchführung erfolgte wie zuvor beschrieben. An jedem Versuchstag wurde eine neue Kalibriergerade erstellt sowie eine Testhemmung mit dem Inhibitor an der höchsten eingesetzten Aktivität der Kalibrierfunktion durchgeführt.

2.2.4.6 Alamar Blue Assay

Der Alamar Blue Assay wird besonders für quantitative *in-vitro* Viabilitäts- und Zytotoxizitätsstudien an Säugetierzellen und als Redoxindikator in der Lebensmittelindustrie eingesetzt [259-262]. Die Methode nutzt die in Abbildung 12 dargestellte irreversible Reduktion des blauen, wasserlöslichen, nicht fluoreszierenden Resazurins (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on-10-oxid) zum pinkfarbenen, fluoreszierenden Resorufin [263]. In einem weiteren Schritt kann Resorufin reversibel zum farblosen Dihydroresorufin reduziert werden [264]. Das zytosolgängige Natriumsalz des Resazurins wird von lebenden Zellen enzymatisch durch Elektronenaufnahme von Kofaktoren (NADPH, FADH₂, FMNH/FMNH₂, NADH, Cytochrome) reduziert [260]. Die Reaktion wird durch Reduktasen und hier besonders durch die bevorzugt mitochondrial oder zytoplasmatisch exprimierten Diaphorasen (Lipoamid-Dehydrogenase (EC 1.8.1.4), NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase (EC 1.6.99.2), NADPH-Dehydrogenase (EC 1.6.99.1) sowie durch die Diaphorase-Aktivität vieler Flavoenzyme katalysiert, wobei die Lokalisation der Reduktion in der Zelle nicht eindeutig geklärt ist [265].

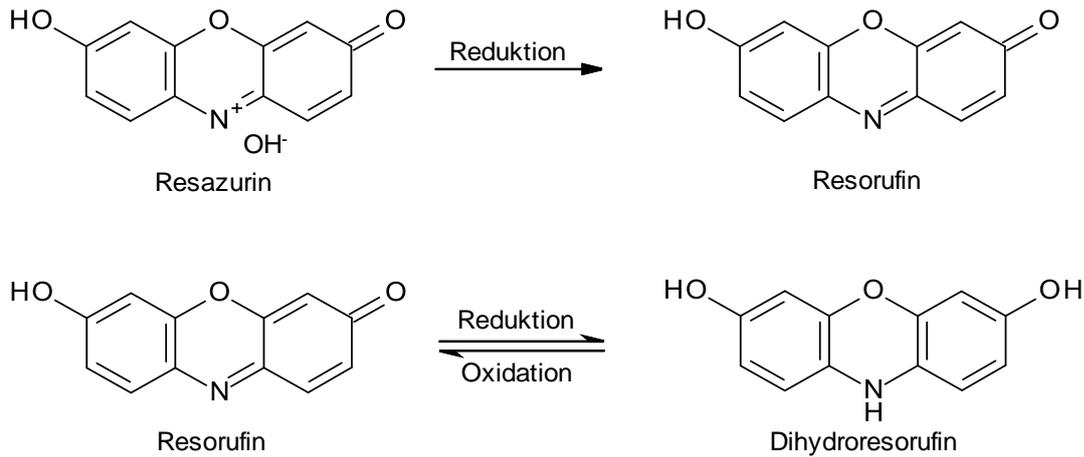


Abbildung 12: Resazurin wird in lebenden Zellen irreversibel zu Resorufin reduziert, welches reversibel mit Dihydroresorufin im Gleichgewicht vorliegt. Die Reaktion wird u.a. durch Diaphorasen katalysiert, und ist dann von elektronentransferierenden Kosubstraten (NADPH, FADH, FMNH, NADH, Cytochrome) abhängig.

Die fluorimetrische Auswertung wird aufgrund der sehr guten Empfindlichkeit bevorzugt [265]. Der Redoxindikator wird wegen seiner geringen Giftigkeit bei Zytotoxizitätsmessung an Bakterien und Säugetierzellen eingesetzt [259]. Die Ergebnisse aus dem Alamar Blue Assay korrelieren gut mit denen Formazan-basierter (MTT/XTT, MTS) Methoden und sind dem ³H-Thymidin-Assay in der Aussagekraft nur leicht unterlegen [261].

2.2.4.6.1 Etablierung des Alamar Blue Assays

Es wurden verschiedene Zelldichten (0 bis 15.000 Zellen/Well) in drei einzelnen 48 Well Platten je sechsfach in 500 µl Kulturmedium ausgesät. Die Platten wurden im Brutschrank inkubiert und je eine Platte nach 24, 48 und 72 Stunden mit 50 µl vorgewärmtem (37 °C) Resazurin-Reagenz je Well versetzt. Es erfolgte sofort eine Fluoreszenzmessung des Nullwertes (t_0) aller Wells bei einer Anregungswellenlänge (Ex) von 540 nm und einer Emissionswellenlänge (Em) von 590 nm. Die Platte wurde über weitere drei Stunden inkubiert und mehrfach die Fluoreszenz gemessen ($t_x = t_1, t_2, t_3, \dots$ usw.). Anschließend wurde das Medium im Well entfernt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit 200 µl Trypsinlösung für zehn Minuten im Brutschrank abgelöst und das gesamte Volumen dem entsprechenden Reaktionsgefäß des jeweiligen Wells hinzugefügt. Jedes Well wurde mit 500 µl Phosphatpuffer nachgespült, der ebenfalls in das entsprechende Reaktionsgefäß überführt wurde. Mit den gesammelten Zellsuspensionen erfolgte eine dreifache

Zellzahlbestimmung je Reaktionsgefäß im Durchflusszytometer *GalaxyArgon Plus*. Die Eigenfluoreszenz des Ansatzes zum Zeitpunkt t_0 wurde von den Fluoreszenzwerten t_x subtrahiert und die Daten (RFU = relative Fluoreszenzeinheiten) gegen die Zellzahl aufgetragen.

Als Messzeitpunkt für nachfolgende Experimente wurden Bedingungen gewählt, die eine Linearität der Umsetzung des Resazurins in beide Richtungen über einen breiten Zellzahlbereich bei guter Korrelation und geringer Standardabweichung garantieren. Die Ergebnisse der Etablierung wurden durch Inprozesskontrollen in den nachfolgenden Experimenten kontrolliert.

2.2.4.6.2 Bestimmung der IC_{50} der Zytostatika

Es wurden 5.000 Zellen je Well einer 48 Well Platte in 500 μ l Kulturmedium ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle zur Beurteilung des Zellzustandes wurden die benötigten Wells mit der entsprechenden Menge Zytostatikum (verdünnt mit PBS) versetzt. Dazu wurden geeignete Stammlösungen hergestellt und die Volumendifferenz in allen Wells mit PBS ausgeglichen. Es wurden Verdünnungsreihen der Zytostatika inklusive einer unbehandelten Kontrolle sowie einer Mediumkontrolle ohne Zellen pipettiert. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurden je Well 50 μ l vorgewärmte Resazurin-Lösung zugefügt und sofort im Plattenfluorimeter *Infinite F200* ein Nullwert gemessen (Ex: 540 nm; Em: 590 nm). Die Platten wurde weiter inkubiert und je nach Zelllinie nach ein bis drei Stunden ein Endwert gemessen.

Zur Auswertung wurde mit Hilfe der Software *MS Excel 2003* die Differenz der Nullwerte (RFU Ansatz mit Zellen – RFU Mediumkontrolle) von der Differenz der Messwerte nach drei Stunden (RFU Ansatz mit Zellen – RFU Mediumkontrolle) je Well subtrahiert und daraus der Mittelwert gleicher Ansätze ($n=3$) sowie die Standardabweichung errechnet. Diese Daten wurden zur Ermittlung der IC_{50} -Werte sowie weiterer kinetischer Daten als Prozent der unbehandelten Kontrolle halblogarithmisch aufgetragen und mit der Software *SigmaPlot* ausgewertet.

2.2.4.6.3 Alamar Blue Assay: Einfluss des Ergusses auf Zellwachstum und Ansprechen auf Zytostatika

Es wurden drei Ansätze ohne und mit 5×10^3 THP-1 Zellen je Well einer 48 Well Platte in 500 μ l Kulturmedium je ohne und mit 10 % (v/v) sterilfiltriertem Erguss

pipettiert (Tab. 17). Die entsprechenden Wells wurden mit der ermittelten IC_{50} eines Zytostatikums (Carboplatin oder Doxorubicin) versetzt. Dazu wurden geeignete Stammlösungen hergestellt und die Volumendifferenz in allen Wells mit PBS ausgeglichen. Nach 72 Stunden Inkubation wurden je Well 50 μ l auf 37°C vorgewärmte Resazurin-Lösung zugefügt und sofort im Plattenfluorimeter *Infinite F200* ein Nullwert gemessen (t_0 ; Ex: 540 nm; Em: 590 nm). Die Mikroplatte wurde weitere drei Stunden inkubiert und stündlich die Fluoreszenz gemessen (t_x).

Tabelle 17: Tabellarische Übersicht über den Versuchsaufbau des Alamar Blue Assays zur Quantifizierung des Einflusses von 10 % (v/v) Erguss auf das Wachstum und das Ansprechen von THP-1 Zellen auf Zytostatika.

Ohne Ergussfluid (je n=3 Ansätze)					
Medium	Medium Zellen	Medium Carboplatin	Medium Zellen Carboplatin	Medium Doxorubicin	Medium Zellen Doxorubicin
Mit 10 % (v/v) Ergussfluid (je n=3 Ansätze)					
Medium	Medium Zellen	Medium Carboplatin	Medium Zellen Carboplatin	Medium Doxorubicin	Medium Zellen Doxorubicin
Zellwachstum		Ansprechen auf Carboplatin		Ansprechen auf Doxorubicin	

Die Nullwerte (t_0) wurden mittels *MS Excel 2003* vom Messwert (t_x) subtrahiert und die Ergebnisse der Ansätze ($n=3$) gemittelt. Der Einfluss des Mediums wurde durch Subtraktion der zellfreien Ansätze von den Ansätzen mit Zellen eliminiert. Aus dem ergussfreien Ansatz ohne Zytostatikum ergab sich so die Kontrolle (100 %). Darauf bezogen sollte der Einfluss der Zytostatika bei ca. 50 % der Kontrolle messbar sein. Mit den Ansätzen mit Erguss wurde gleich verfahren. Der Ansatz ohne Zytostatika wurde auf die Kontrolle ohne Erguss bezogen und stellt den Einfluss des Ergusses auf die Proliferation dar. Der Einfluss des Ergusses auf das Ansprechen der Zellen auf die Zytostatika ergab sich durch Bezug der Werte mit Erguss auf die ergussfreien Ansätze und wurde in den Abbildungen 26 bis 29 (vgl. Kap. 3.2.4.3) ebenfalls als 100 % der Kontrolle ohne Erguss (aber mit Zytostatikum) dargestellt. Anschließend folgte eine statistische Aufarbeitung der Daten durch Klassierung nach Entitäten, Malignität der Primärdiagnose und Sexus in *SigmaPlot*, dargestellt als Box-Plots. Die Berechnung der Signifikanzen ($p < 0,05$) erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test (<http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>).

2.2.4.6.4 Alamar Blue Assay: Einfluss von PAR-Agonisten auf Zellwachstum und Chemosensitivität

Neben einer zellfreien Kontrolle wurden 5.000 PANC-1 oder THP-1 Zellen je Well einer 48 Well Platte in 500 μ l Kulturmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Es erfolgte ein Wechsel auf serumstarviertes Kulturmedium. Anschließend wurden die Zellen ohne oder mit FIIa, FXa, SFLLRN oder SLIGKV in verschiedenen Konzentrationen im Brutschrank inkubiert. Nach 72 Stunden Inkubation wurden je Well 50 μ l 37 °C warme Resazurin-Lösung zugefügt und sofort im Plattenfluorimeter *Infinite F200* ein Nullwert gemessen (t_0 ; Ex: 540 nm; Em: 590 nm). Je nach Zelllinie wurde die Mikroplatte weiter inkubiert und nach ein bis drei Stunden erneut die Fluoreszenz gemessen (t_x). Die Nullwerte (t_0) wurden in *Excel 2003* vom Messwert (t_x) subtrahiert und die Ergebnisse der Ansätze (n=3) gemittelt. Der prozentuale Einfluss der Stimulantien auf die Proliferation ergab sich durch Bezug der Werte auf die zellfreie Kontrolle (100 %). Um den Einfluss der Stimulantien auf das Ansprechen der Zellen auf Zytostatika zu ermitteln, wurden weitere Wells auf der Platte nach dem gleichen Layout wie oben beschrieben pipettiert, und zusätzlich mit Carboplatin oder Doxorubicin versetzt (IC₅₀ laut 2.2.4.6.2). Die Auswertung erfolgte wie zuvor beschrieben.

2.2.4.7 MTS-Proliferationsassay

Die wasserlöslichen Salze des synthetischen Reagenzes MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) können intrazellulär in Gegenwart des Ein-Elektronen-Transporters Phenazinmethosulfat (PMS) um den Faktor 1.000 beschleunigt zum korrespondierenden, wasserlöslichen Formazan reduziert werden (Abb.13) [266, 267]. Die Reaktion ist enzymkatalysiert (Reduktasen) oder findet durch direkte Reaktion von NADH oder NADPH mit MTS statt, vornehmlich im endoplasmatischen Retikulum [267]. Das Tetrazoliumsalz hat ein pH-abhängiges Absorptionsmaximum von 490-500 nm und ist somit einer absorptionsphotometrischen Bestimmung zugänglich [266]. Anwendungsgebiete sind die Bestimmung der Zellviabilität und Zytotoxizitätsstudien. Vor Versuchsbeginn ist eine zelllinienspezifische Kalibrierung unter Versuchsbedingungen durchzuführen, da sich das intrazelluläre Reduktionspotential zellzyklusabhängig, durch äußere Einflüsse (Temperatur, Sauerstoff, etc.) oder in apoptotischen Zellen ändern kann.

Zur Kalibrierung des Assays wurden verschiedene Zellzahlen ($0-1,5 \times 10^4$ Zellen/Well) in die Wells von drei 96 Well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Es erfolgte ein Mediumwechsel zur Serumstarvierung. Ausgehend von diesem Zeitpunkt wurde nach 24, 48 und 72 Stunden Inkubation je eine Platte komplett mit 20 μ l vorgewärmter MTS-Lösung je Well (200 μ l) versetzt und sofort weiter inkubiert. Nach 30, 60, 120 und 180 Minuten wurde die Absorption bei 490 nm gemessen und die gemittelten Werte je Zellzahl gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden geeignete Versuchsbedingungen mit möglichst linearer Abhängigkeit der Substratumsetzung von der Zellzahl ausgewählt und in den nachfolgenden Stimulationsexperimenten angewandt.

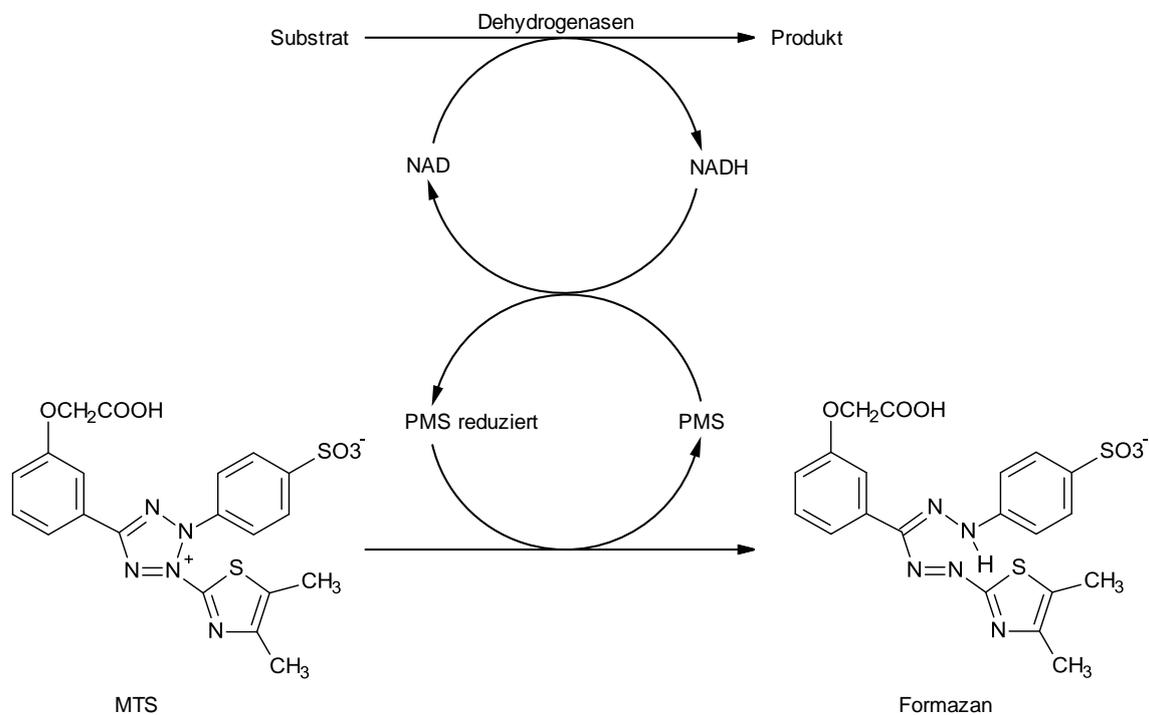


Abbildung 13: Schematische Darstellung des zellulären Metabolismus der Reduktion von MTS zum Formazan. Durch Dehydrogenaseaktivität entstandenes NADH oder NADPH überträgt zwei Elektronen auf das Tetrazoliumsalz. Die Reaktion kann durch den Ein-Elektronentransporter Phenazinmethosulfat (PMS) um den Faktor 1.000 beschleunigt werden.

Zur Messung des Einflusses verschiedener Stimulantien auf das Zellwachstum wurden 1×10^4 Zellen in 200 μ l Kulturmedium je Well einer 96 Well Platte ausgesät. Als Leerwert fungierte ein Well mit zellfreiem Medium. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen serumstarviert und ohne oder mit FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV oder TGF- β 1 stimuliert weitere 48 Stunden inkubiert. Für die Messung wurden die Ansätze mit 10 % (v/v) MTS-Reagenz versetzt und nach 60, 120 und 180 Minuten die Absorption bei 490 nm gemessen. Die Mittelwerte (n=6) wurden als Prozent der unbehandelten Kontrolle (100 %) aufgetragen. Um den Einfluss von Ergüssen auf

das Zellwachstum zu quantifizieren, und eine mögliche Beteiligung von FIIa oder FXa an deren Effekt zu bestimmen, wurden die Zellen wie oben beschrieben serumstarviert mit 10 % (v/v) Erguss supplementiert und je die Hälfte (n=4) der Ansätze mit 32 ATU Lepirudin oder 0,5 µM Rivaroxaban inhibiert. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben. Ausgewertet wurde gegen eine ergussfreie Lösemittel-Kontrolle (100 %) der Inhibitoren, um den Effekt des Ergusses zu bestimmen bzw. gegen den Effekt des ungehemmten Ergusses, um den Einfluss der Inhibitoren zu bestimmen. Alle Ansätze enthielten final die gleiche Konzentration des Lösemittels.

2.2.4.8 Transwell-Migrationsassay

Beim Transwell-Migrationsassay wird die Migration unterschiedlich stimulierter Zellen in Form des Durchtritts durch 8 µm große Poren in einer Polyethylenterephthalat (PET)-Membran quantifiziert (Abb. 15). Die Membran wird zur Simulation einer EZM im Vorfeld auf der Unterseite mit Kollagen beschichtet. Die Quantifizierung erfolgt durch Färbung der Zellen mit Kristallviolett. Verglichen werden migrierte Zellen gegen die Gesamtzellzahl im Ansatz in Form einer Migrationsrate in Prozent. Dazu werden bei einem von zwei Ansätzen je Probe nur die migrierten Zellen auf der Unterseite gefärbt, wogegen beim zweiten Ansatz alle Zellen (oben und unten) gefärbt werden. Die gefärbten Zellen werden mehrfach gespült, der Farbstoff eluiert und das erhaltene Eluat absorptionsphotometrisch (550 nm) vermessen. Die Migrationsrate errechnet sich nach der Formel in Abbildung 14 aus den erhaltenen optischen Dichten (OD).

$$\text{Migrationsrate (\%)} = \frac{\text{OD 500 nm der migrierten Zellen} \cdot 100}{\text{OD 500 nm der gesamten Zellen}}$$

Abbildung 14: Formel zur Berechnung der Migrationsrate im Transwell-Migrationsassay.

Transwell-Einsätze (ThinCert™, Porengröße 8,0 µm) wurden auf der Unterseite der PET-Membran mit 50 µl Kollagen I-Lösung (400 µg/ml) beschichtet. Dazu trocknete die Lösung circa 2 Stunden in der Sterilbank ein. PANC-1 Zellen wurden vor der Aussaat über 24 Stunden serumstarviert, HPDE-Zellen wurden 48 Stunden serumstarviert und mit den jeweiligen Stimulantien vorstimuliert. Die beschichteten Einsätze wurden in 24 Well Platten platziert und mit 5×10^4 Zellen in 500 µl serumstarviertem Medium befüllt. In das untere Kompartiment direkt in das Well der

24 Well Platte wurden weitere 500 µl serumstarviertes Medium gegeben und die Ansätze im Einsatz stimuliert (berechnet auf 1 ml Gesamtvolumen). Alle Ansätze wurden 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Aufarbeitung wurde das Medium vorsichtig entfernt. Je Doppelansatz wurden oben aus einem Einsatz die Zellen mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt, so dass nur migrierte Zellen an der Unterseite der PET-Membran zurückblieben (Abb. 15). Alle Einsätze wurden in eine neue 24 Well Platte transferiert und für 30 Minuten mit 600 µl (200 µl im Einsatz, 400 µl im Well) Kristallviolett-Lösung (Tab. 18) gefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung wurden alle Wells je dreimal für 15 Minuten mit 1.500 µl (500 µl im Einsatz, 1.000 µl im Well) Aqua dest. gespült. Die Entfärbung der Zellen erfolgte mit 500 µl (200 µl im Einsatz, 300 µl im Well) 10-prozentiger (v/v) Essigsäure über 90 Minuten bei Raumtemperatur.

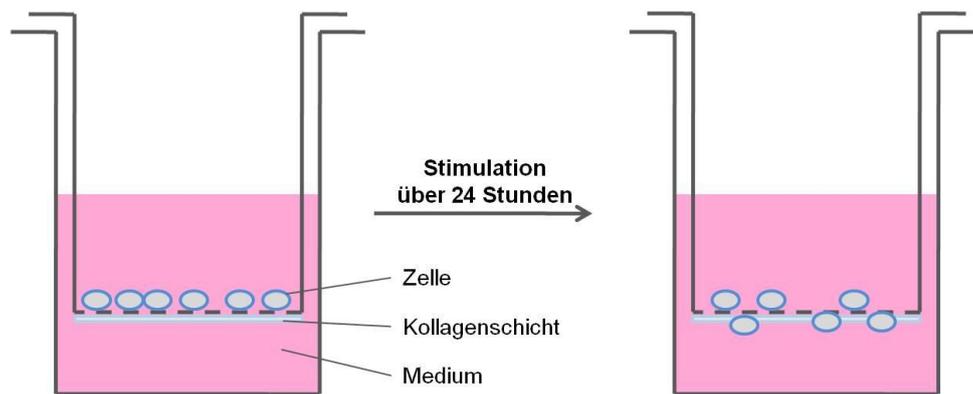


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise des Transwell-Migrationsassays.

Die Lösungen aus Einsatz und Well wurden vereinigt und in Doppelbestimmungen á 100 µl im Plattenphotometer *Opsys MR* bei 550 nm gegen 10-prozentige (v/v) Essigsäure vermessen. Die gemessenen OD-Werte wurden gemittelt und die Migrationsrate errechnet (Abb. 14).

Tabelle 18: Kristallviolett-Lösung zur Färbung der Zellen im Migrations-Assay.

Kristallviolett-Lösung	
300 mg	Kristallviolett
6 ml	Ethanol 2 % (v/v)
ad 300 ml	Boratpuffer 0,1 M (pH 8,5)

2.2.4.9 Wundheilungs-Migrationsassay / *Scratch-Assay*

Dieser Migrationsassay wird besonders für Wundheilungsprozesse herangezogen, aber aufgrund seiner Einfachheit auch gerne für nicht wundheilungsbezogene Fragestellungen eingesetzt. Traditionell wird mittels einer Pipettenspitze eine Wunde in einen Zell(mono)layer gekratzt, deren Verschluss zeitabhängig beobachtet wird. Je nach Aufbau des Assays und Stimulation/Manipulation der untersuchten Zellen können Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten gezogen werden. Vorteilhaft sind bei diesem Assay die direkte mikroskopische Beobachtung der Zellmorphologie und die Möglichkeit, über Mehrfachmessungen zeitabhängige Daten zu erheben. Dem gegenüber steht die Endpunktmethode im Transwell (Kapitel 2.2.4.8) ohne Möglichkeit zur Beobachtung der Zellmorphologie aber mit besserer Quantifizierung. Als Alternative zum schwer reproduzierbaren *Scratch-Assay* können in Petrischalen positionierte Silikoneinsätze (*Culture-Inserts*; Ibidi, Martinsried) verwendet werden. Diese umgrenzen, ähnlich einer liegenden Acht, zwei gleich große Kavitäten mit Kontakt zum Boden der Petrischale, getrennt durch einen $400\ \mu\text{m} \pm 50\ \mu\text{m}$ breiten Silikonsteg. Die Kavitäten werden mit Zellen beimpft und nach Ausbildung einer konfluenten Zellschicht der Silikoneinsatz entfernt. Dadurch entsteht ein besser reproduzierbarer zellfreier Spalt bzw. eine Wunde mit scharf abgegrenzten Rändern ohne Verletzung von Zellen und der damit einhergehenden Beeinflussung der unverletzten Zellen durch Zytokine und/oder Chemokine. Zur Quantifizierung der Migration bieten sich Fotografien der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten an, mit denen die migrierten Zellen manuell oder mit Hilfe von Software ausgezählt werden können.

In ein biokompatibles *Culture-Insert* (Ibidi, Martinsried), positioniert in einer Petrischale, wurden $70\ \mu\text{l}$ Zellsuspension (5×10^5 Zellen/ml) je Kavität ausgesät. Nach Inkubation über Nacht wurde das Medium entfernt, zweimal mit PBS gespült und für 24 Stunden serumstarviert. Das *Culture-Insert* wurde dann vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entfernt, wodurch ein zellfreier Spalt entstand. Abgelöste Zellen wurden durch zweimaliges Spülen mit PBS entfernt, um anschließend 2 ml serumstarviertes Kulturmedium zuzugeben, dem die jeweiligen Stimulantien (FCS, TGF- β 1, FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV oder Erguss) bereits zugesetzt worden waren. Die Petrischalen wurden im Brutschrank inkubiert, und zu den Beobachtungszeitpunkten Fotos mit einer Canon E550 Digitalkamera an einem

Axiovert 25 Mikroskop aufgenommen. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen ausschließlich der migrierten, nicht aber der proliferierten Zellen. Dazu wurde eine geschlossene, nicht spindelförmige Proliferationsfront als Ausschlussgrenze festgelegt. Innerhalb des Spaltes wurden nur spindelförmige Zellen als migriert bewertet.

2.2.5 Immunologische Untersuchungen

Immunologische Färbungen von Zellen mit Fluorophoren erlauben durch die gute Selektivität der Antigen-Antikörper-Bindung eine relative Quantifizierung von Antigenen. Quantifiziert wird meist gegen eine Kontrolle mit einem unspezifischen Antikörper (Isotypkontrolle). Zusätzlich bietet sich eine Kernfärbung mit interkalierenden Farbstoffen, wie dem lipophilen Hoechst Dye 33342, an. Die gefärbten Zellen können fluoreszenzmikroskopisch fotografiert werden, wobei verschiedene Ebenen der Färbung oder Markierungen mehrerer Antigene überlagert werden können, um die Aussagekraft der Daten zu erhöhen.

Fluorochrom-markierte Zellen können auch durchflusszytometrisch vermessen werden. Die Aussagekraft zur Lokalisation der Antigene in der Zelle ist der Mikroskopie hierbei unterlegen, die Quantifizierung jedoch überlegen.

2.2.5.1 Immunfluoreszenzfärbung auf Deckgläschen

Es wurden 1×10^5 Zellen (HPDE, PANC-1) je Well einer 12 Well Platte auf sterilen Deckgläschen in Kulturmedium ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach 24 Stunden Serumstarvierung wurden die Zellen stimuliert und nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden Inkubation gefärbt. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 % (v/v) Formaldehyd in PBS überschichtet. Nach 15 Minuten Fixierung bei Raumtemperatur wurde das Fixierungsreagenz durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Eine zweite Fixierung wurde für 10 Minuten mit eiskaltem Methanol im Gefrierschrank durchgeführt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Oberfläche bei Raumtemperatur mit BSA abgesättigt und mittels Triton X-100 permeabilisiert. Dazu wurden die Deckgläschen in einer feuchten Kammer mit der zellbehafteten Seite nach unten auf 100 µl Blockierungspuffer gelegt (Tab. 19). Nach 60 Minuten wurde der Blockierungspuffer gegen den Primärantikörper (E-Cadherin, PAR-1/2) in Antikörperpuffer (Tab. 19) ausgetauscht. Nach Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Antikörperlösung durch dreimaliges

Spülen mit PBS entfernt. Anschließend wurde der Alexa Fluor 555-gekoppelte Sekundärantikörper 1:1000 verdünnt zusammen mit Hoechst Dye 33342 in Antikörperpuffer eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit den Präparaten inkubiert, um anschließend durch dreimaliges Waschen mit PBS ungebundene Antikörper und überschüssigen Kernfarbstoff zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit *Fluor Safe* unterschichtet, welches durch erhöhte Viskosität ein Ausbleichen der Fluorophore verzögert, und mit der gefärbten Seite nach unten mit Nagellack auf Objektträgern fixiert. Die Präparate wurden zügig mikroskopiert. Die Aufbewahrung erfolgte lichtgeschützt im Kühlschrank (5-8 °C).

Die Auswertung erfolgte am Axioplan 2 Fluoreszenzmikroskop, bestückt mit einer Axio Cam HR und einem Plan Neofluar 40x/1.3 Oil DIC Objektiv (Zeiss, Jena). Die Präparate wurden dazu gesichtet und mehrere repräsentative Ausschnitte fotografiert. Dabei wurde je eine getrennte Aufnahme der Kernfärbung mit Hoechst Dye und der Antikörperfärbung mit Alexa Fluor 555 erstellt und als AxioVs40.Image (.zvi) sowie Tagged Image File Format (.tif) gespeichert.

Tabelle 19: Zusammensetzung der Puffer für die Immunfluoreszenzfärbung von E-Cadherin und PAR-1/2.

Blockierungspuffer		Antikörperpuffer	
4 % (w/v)	BSA	1 % (w/v)	BSA
0,3 % (w/v)	Triton X-100	0,3 % (w/v)	Triton X-100
ad 100 ml	PBS	ad 100 ml	PBS

2.2.5.2 Immunfluoreszenzfärbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie

Die Zellen wurden mit Accutase aus den Kulturflaschen abgelöst, 5 Minuten bei 1.200 U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Etwa 2×10^5 Zellen wurden in eine 96 Well Platte überführt und 4 Minuten mit 1.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit kaltem Waschpuffer (Tab. 20) gewaschen. Dazu wurde es in 100 µl Puffer resuspendiert, 4 Minuten mit 1.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde anschließend in 10 µl Antikörperlösung (10 µg/ml Antikörper in Waschpuffer) oder Isotypkontrolle (10 µg/ml) resuspendiert und 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde erneut 4 Minuten bei 1.000 U/min und 4 °C zentrifugiert und anschließend das Pellet zweimal gewaschen.

Das Zellpellet wurde mit 10 µl FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper (25 µg/ml in Waschpuffer) resuspendiert und erneut 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 150 µl Paraformaldehyd-Lösung 4 % (w/v) resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Proben wurden in einem BD FACS Canto vermessen (λ_{EX} : 488 nm; λ_{EM} FITC: 525 nm; λ_{EM} PE: 575 nm) und mittels *CellQuest Software* (BD Biosciences) ausgewertet.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Waschpuffers für die Zellfärbung zur Durchflusszytometrie.

Waschpuffer (FACS); 4 °C	
1 % (w/v)	BSA
0,1 % (w/v)	NaN ₃
ad 100 ml	PBS

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis eines aktivierten Gerinnungssystems im Ergussmilieu

3.1.1 Charakterisierung der verwendeten Ergüsse

Die 107 im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ergüsse sind in Tabelle 21 nach laborintern fortlaufender Nummer aufgelistet und nach Sexus (m: männlich; w: weiblich) sowie Diagnose laut Arztbrief zum Zeitpunkt der Punktion charakterisiert. Eine nicht gesicherte Diagnose wurde mit V. a. (Verdacht auf) gekennzeichnet. Ergüsse mit lückenhaften Patientendaten wurden nicht weiter berücksichtigt. Aus der Diagnose abgeleitet wurde eine Klassierung in maligne Ergüsse (m) oder benigne bzw. nicht-maligne Ergüsse (b). Aufgrund der geringen Fallzahlen der gestellten Diagnosen wurde zur statistischen Aufarbeitung eine Klassierung (Klasse) in drei größere Gruppen vorgenommen, die nur die im Rahmen des Alamar Blue Assays eingesetzten Ergüsse betraf:

- Benigne: Ergüsse mit einer benignen/nicht malignen Diagnose
- Gastro: Ergüsse mit einer Krebsdiagnose im Gastrointestinaltrakt
- Gyn: Ergüsse mit einer gynäkologischen Krebsdiagnose
- Lunge: Ergüsse mit einer Krebsdiagnose in der Lunge

Anschließend sind die Ergebnisse des Alamar Blue Assays als Einfluss der Ergüsse auf das Zellwachstum und die Chemosensitivität gegenüber Carboplatin bzw. Doxorubicin aufgeführt (vgl. Kap. 3.2.4.3). Die angegebenen Werte beziehen sich auf die Kontrolle ohne Erguss (100 %). Die letzten vier Spalten zeigen eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der Koagulometrie gegenüber dem chromogenen Assay für FIIa und FXa in U/ml (vgl. Kap. 3.1.3 und 3.1.4). Eine Auflistung aller Daten der Koagulometrie ist in der Arbeit nicht enthalten, die gemittelten Daten werden in Kapitel 3.1.3 gezeigt.

Sofern ausreichend Ergussmaterial zur Verfügung stand, wurden die Ergüsse in möglichst vielen Versuchen eingesetzt. Teilweise war das Ergussmaterial aufgrund von Materialmangel, Ausfällungen, bakterieller Kontamination oder Eigenfärbung für bestimmte Versuche nicht zugänglich, wodurch Abweichungen in der Anzahl der untersuchten Ergüsse je Methode in den nachfolgenden Kapiteln begründet sind.

Ergebnisse

Tabelle 21: Tabellarische Auflistung aller 107 im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ergüsse. Es sind Angaben zu Geschlecht (Sexus: männlich (m), weiblich (w)), Malignität laut Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion (maligne (m) oder nicht-maligne/benigne (b)), Klassierung nach Diagnose (Benigne, Lungenkrebs (Lunge), Gastrointestinalkrebs (Gastro) oder gynäkologische Krebserkrankungen (Gyn)). Die Ergebnisse des Alamar Blue Assays zu Zellwachstum und Chemosensitivität gegenüber Carboplatin und Doxorubicin von THP-1 Zellen sind bezogen auf die Kontrolle ohne Erguss (100 %). Weiterhin ist eine Gegenüberstellung der koagulometrisch (TPZ) und chromogen (chrom.) bestimmten Aktivitäten für FIIa und FXa enthalten. Fortsetzung auf der nächsten Seite.

Erguss	Sexus	Malignität	Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion	Klasse	Alamar Blue Assay (THP-1)			FIIa U/ml		FXa U/ml	
					Zellwachstum	Carboplatin	Doxorubicin	TPZ	chrom.	TPZ	chrom.
463	m	m	NSCLC	Lunge	61	71	47	0,49	0,023	0,05	
468	m	m	SCLC					0,34	0,000	0,05	
469	m	m	NSCLC					0,35		0,05	
470	m	m	NSCLC					0,31		0,05	
476	w	m	NSCLC	Lunge	23	30	20	0,50	0,000	0,05	
480	w	b	Leberzirrhose	Benigne	64	60	43		0,015		
484	m	b	Ischäm. Kardiomyopathie	Benigne	99	67	72	0,16	0,015	0,05	
489	w	m	NSCLC					0,42		0,05	
492	w	m	Magen-Ca.	Gastro	239	160	252	0,22		0,05	
493	m	m	NSCLC	Lunge	100	110	75	0,34	0,050	0,05	
497	m	m	SCLC	Lunge	69	67	54		0,010		
498	w	m	Magen-Ca.	Gastro	58	36	35		0,073		
500	w	b	Pankreatitis	Benigne	143	100	130	0,17	0,000	0,05	
508	m	m	Pleuramesotheliom	Lunge	87	99	77				
514	m	b	Kardiomyopathie	Benigne	40	42	34	0,36		0,05	
515	w	b	Pneumonie	Benigne	76	76	54	0,32		0,05	
516	m	b	Dekomp. Herzinsuffizienz	Benigne	54	55	37				
517	m	b	Dekomp. Herzinsuffizienz	Benigne	56	53	42	0,32	0,541	0,05	
520	w	b	Pneumonie	Benigne	124	155	94	0,32	0,021	0,05	
523	w	m	Magen-Ca.	Gastro	77	81	64		0,017		
524	w	m	NSCLC	Lunge	66	82	57	0,32	0,000	0,07	
526	m	m	Pleuramesotheliom	Lunge	55	56	42				
529	w	b	Herzinsuffizienz	Benigne	116	115	83		0,000		
544	w	m	Pankreas-Ca.	Gastro	70	63	63	0,27	0,008	0,05	
545	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	70	57	63	0,35	0,031	0,05	
567	w	m	Magen-Ca.	Gastro	33	30	33		0,288		
568	m	m	Rektum-Ca.	Gastro	72	65	74	0,33	0,019	0,05	
570	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	67	56	68		0,149		
575	w	m	SCLC	Lunge	100	92	97	0,11	0,037	0,15	
576	m	b	Reizerguss					0,37		0,05	
579	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	38	32	29	0,41	0,000	0,05	
583	w	m	Kolon-Ca.	Gastro	76	86	83	0,31	0,000	0,05	
585	m	m	Ösophagus-Ca.	Gastro	82	80	88	0,18	0,021	0,05	
596	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	71	71	62	0,30	0,002	0,05	
597	w	m	SCLC	Lunge	56	64	64		0,000		
599	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	62	47	68	0,29	0,000	0,05	
600	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	30	41	44				
602	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	64	61	54		0,000		
609	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	69	68	60	0,27		0,05	
610	w	m	Uterus-Ca.	Gyn	87	69	76		0,002		
611	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	61	58	65		0,021		
612	w	m	Kolon-Ca.	Gastro	76	55	79	0,23	0,012	0,05	0,0000
613	w	m	Ovarial-Ca.	Gyn	60	50	64		0,000		0,0000
615	m	b	Nierentransplantation	Benigne	95	57	110		0,015		0,0067
618	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	55	41	56		0,004		0,0057
619	m		V. a. Bronchial-Ca.								0,0000
620	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	49	38	54	0,23	0,000	0,05	0,0000
623	m	m	Pankreas-Ca.	Gastro	92	58	95		0,015		0,0000
627	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	69	59	77	0,34	0,015	0,05	0,0003
628	m	m	NSCLC	Lunge	74	77	98				
631	m	b	Leberzirrhose	Benigne	110	74	87		0,000		0,0000
632	m	m	Pankreas-Ca.	Gastro	94	70	81		0,044		0,0011
633	w	b	Hyperthyreose	Benigne	91	66	69	0,10	0,015	0,05	
634	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	41	50	51	0,27	0,000	0,05	0,0000
635	m	b	COPD	Benigne	66	74	59		0,032		0,0021

Fortsetzung Tabelle 21: Tabellarische Auflistung aller 107 im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Ergüsse. Es sind Angaben zu Geschlecht (Sexus: männlich (m), weiblich (w)), Malignität laut Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion (maligne (m) oder nicht-maligne/benigne (b)), Klassierung nach Diagnose (Benigne, Lungenkrebs (Lunge), Gastrointestinalkrebs (Gastro) oder gynäkologische Krebserkrankungen (Gyn)). Die Ergebnisse des Alamar Blue Assays zu Zellwachstum und Chemosensitivität von THP-1 Zellen gegenüber Carboplatin und Doxorubicin sind bezogen auf die Kontrolle ohne Erguss (100 %). Weiterhin ist eine Gegenüberstellung der koagulometrisch (TPZ) und chromogen (chrom.) bestimmten Aktivitäten für FIIa und FXa enthalten.

Erguss	Sexus	Malignität	Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion	Gruppe	Alamar Blue Assay (THP-1)			FIIa U/ml		FXa U/ml	
					Zellwachstum	Carboplatin	Doxorubicin	TPZ	chrom.	TPZ	chrom.
639	m	m	Rektum-Ca.	Gastro	92	107	99		0,000		0,0000
640	m	b	Dekomp. Herzinsuff.	Benigne	86	85	79				
645	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	70	73	98				
646	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	119	119	110	0,22	0,012	0,05	0,0100
649	w	m	Cardia-Ca.	Gastro	123	122	164		0,000		0,0003
660	w	m	Ovarial-Ca.	Gyn	60	65	56		0,004		0,0000
661	w	m	Mamma-Ca.	Gyn	92	90	92		0,000		0,0000
665	m	b	Pneumonie						0,000		0,0023
670	w	b	Reizerguss	Benigne	136	147	155	0,27	0,012	0,05	0,0012
673	w	m	Ösophagus-Ca.	Gastro	107	81	101		0,000		
674	m	b	Pankreatitis	Benigne	71	67	76		0,046		
682	m	m	Bronchial-Ca.						0,089		0,0204
688	w	b	Pneumonie	Benigne	59	64	66		0,000		
715	m	b	Dekomp. Herzinsuffizienz					0,36		0,05	
718	m	m	Bronchial-Ca.					0,30		0,05	
734	w	m	Ovarial-Ca.					0,36		0,05	
743	m	m	Non-Hodgkin-Lymphom					0,10		0,05	
744	w	m	Mamma-Ca.					0,29		0,05	
749	m	m	Pankreas-Ca.					0,18		0,05	
753	w	m	Mamma-Ca.					0,27		0,05	
755	w	m	Ovarial-Ca.					0,37		0,05	
756	w		V. a. Bronchial-Ca.					0,36		0,05	
757	w	m	Magen-Ca.					0,18		0,05	
758	w	b	Dekomp. Herzinsuffizienz					0,11		0,05	
759	w	m	Ovarial-Ca.					0,51		0,05	
760	m	m	Bronchial-Ca.					0,21		0,14	
761	w	m	Mamma-Ca.					0,29		0,05	
762	m	m	Ösophagus-Ca.					0,06		0,05	
763	m	b	Koronare Herzkrankheit					0,08		0,05	
766	m	b	Koronare Herzkrankheit					0,26		0,05	
767	m	b	Koronare Herzkrankheit					0,12		0,05	
769	m		V. a. Malignom					0,06		0,05	
771	m	b	Perimyokarditis					0,27		0,05	
773	w	b	Dekomp. Herzinsuffizienz					0,11		0,05	
775	m	b	Dekomp. Herzinsuffizienz					0,23		0,05	
780	m	b	Dekomp. Herzinsuffizienz					0,27		0,05	
781	w	m	Ovarial-Ca.					0,11		0,05	
782	m	b	Dekomp. Herzinsuffizienz					0,15		0,05	
788	w	m	Mamma-Ca.					0,38		0,05	
803	w	m	Ovarial-Ca.					0,24		0,05	
804	w	m	Mamma-Ca.					0,28		0,05	
805	w	m	Ovarial-Ca.					0,41		0,06	
808	w	m	Ovarial-Ca.					0,34		0,05	
811	w	m	Ovarial-Ca.					0,32		0,05	
812	w	m	Ovarial-Ca.					0,37		0,05	
813	w	m	Ovarial-Ca.					0,48		0,05	
814	w	m	Mamma-Ca.					0,37		0,05	
817	w	b	Morbus Wegener					0,06		0,05	
819	m	m	Pankreas-Ca.					0,33		0,05	
822	w	m	Endometrium-Ca.					0,40		0,05	
823	w	m	Magen-Ca.					0,39		0,05	
831	w	m	Bronchial-Ca.					0,33		0,05	

3.1.2 Spontane Fibrinogenese im frischen Ergussmaterial

Um zu überprüfen, ob in punktierten Ergüssen Gerinnungsfaktoren aktiv sind, wurde der exemplarische Nachweis von Fibrin im Erguss erbracht. Im frisch punktierten Ergussmaterial konnte regelmäßig das spontane Ausfallen von gallertartig-soliden Proteinklumpen unabhängig von Sexus, Diagnose oder Klassen der Tabelle 21 beobachtet werden (Abb. 16, links). Diese Beobachtung konnte auch nach dem Auftauen tiefgekühlter Ergüssen bestätigt werden: Zuvor klare, sterilfiltrierte (0,2 µm) Aliquots wurden binnen Minuten zunehmend flockig trüb. Die solide, gallertartige Ausfällung eines Pleuraergusses mit zum Zeitpunkt der Punktion diagnostiziertem Kolonkarzinom konnte in der Fibrin-Färbung nach Weigert exemplarisch als Fibrin identifiziert werden (Abb. 16, rechts).

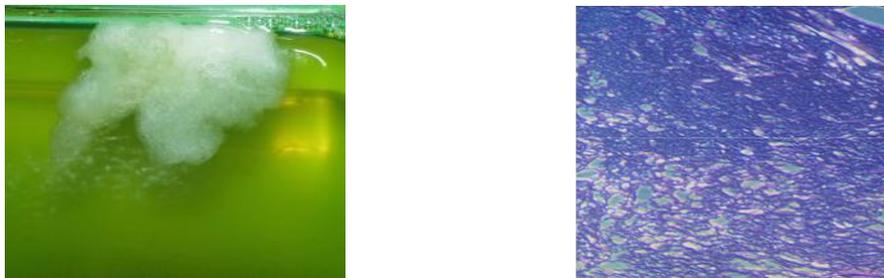


Abbildung 16: Spontane Fibrinogenese im frisch punktierten Pleuraerguss mit zugrunde liegendem Kolonkarzinom: Native Fibringerinnsel im Erguss nach dem Auftauen (links, makroskopisch) und positive Fibrinfärbung nach Weigert (rechts, mikroskopisch, 40-fach vergrößert).

3.1.3 Ergüsse enthalten Gerinnungsfaktoren der extrinsischen Kaskade

Die gallertartigen Ausfällungen eines malignen Pleuraergusses konnten als Fibringerinnsel identifiziert werden. Um die zugrundeliegende Gerinnungsaktivität im Erguss nachzuweisen, wurde eine koagulometrische Gerinnungsanalytik der Faktoren der extrinsischen Kaskade an 26 männlichen und 46 weiblichen, sterilfiltrierten (0,2 µm) Ergüssen unterschiedlicher Diagnose (20 benigne; 52 maligne) im Zentrallabor des UK-SH, Campus Kiel, durchgeführt und diese mit der literaturbekannten Norm im Plasma gesunder Probanden verglichen [268]. Alle Faktoren der extrinsischen Kaskade (Fibrinogen, Faktor II, V, VII, X) sowie die intrinsischen Inhibitoren PC und AT III konnten nachgewiesen werden, zeigten sich aber im Mittel deutlich erniedrigt gegenüber der Referenz (Tab. 22). Die ermittelten Werte lagen im Falle von FV, FVII und FX an der unteren Nachweisgrenze. Einzig die klinischen Parameter für ein aktiviertes Gerinnungssystem, F1+2 Fragmente und D-Dimere, wiesen teilweise deutlich erhöhte Aktivitätswerte gegenüber der Norm auf. Während der Spiegel der F1+2 Fragmente nur leicht über dem Referenzwert lag,

zeigte sich der Spiegel der D-Dimere im Mittel 29-fach erhöht gegenüber der Referenz im Plasma Gesunder.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Ergüssen männlicher Patienten und weiblicher Patientinnen festgestellt werden, während maligne Ergüsse signifikant leicht höhere Spiegel für FII, FV und AT III gegenüber benignen Ergüssen aufwiesen, die aber alle noch deutlich unterhalb der Norm lagen.

Tabelle 22: Die untersuchten Ergüsse enthielten alle Gerinnungsfaktoren der extrinsischen Kaskade: Faktor II, V, VII, X und Fibrinogen konnten nachgewiesen werden, wenn auch mit erniedrigten Aktivitäten gegenüber der Norm im Plasma Gesunder [268]. Gleiches galt für die inhibitorischen Proteine AT III und Protein C. D-Dimere (Fibrinogen-Äquivalenz Einheiten; FEU) und F1+2-Fragmente, klinische Kenngrößen einer aktivierten Gerinnung, waren erhöht gegenüber der Norm. Die Ergüsse wurden nach Geschlecht (Tabelle A) oder Malignität (Tabelle B) klassiert und auf signifikante Unterschiede zwischen den Klassen geprüft. Ergüsse männlicher (M) und weiblicher (W) Patienten unterschieden sich nicht signifikant, jedoch zeigten maligne Ergüsse (m) gegenüber benignen Ergüssen (b) signifikant höhere Spiegel für Faktor II, VII und AT III; n=3 Versuche; MW \pm SA; $p < 0,05$.

A	Ergüsse (TPZ)						Referenz Plasma [268]
	Männlich (M)		Weiblich (W)		p-Wert M vs. W	gesamt m + w n=72	
	n	Wert	n	Wert			
Faktor II U/ml	26	0,25 \pm 0,11	46	0,30 \pm 0,11	0,11	0,28 \pm 0,11	0,7 – 1,2
Faktor V U/ml	26	0,05 \pm 0,00	46	0,05 \pm 0,00	0,46	0,05 \pm 0,00	0,7 – 1,2
Faktor VII U/ml	26	0,11 \pm 0,05	46	0,15 \pm 0,10	0,07	0,14 \pm 0,09	0,7 – 1,2
Faktor X U/ml	26	0,05 \pm 0,02	46	0,05 \pm 0,02	0,87	0,05 \pm 0,02	0,7 – 1,2
F1+2 nmol/l	26	\uparrow 1,3 \pm 0,4	46	\uparrow 1,3 \pm 0,4	0,63	\uparrow 1,3 \pm 0,4	0,4 – 1,1
Fibrinogen mg/dl	26	\downarrow 60 \pm 2	46	\downarrow 60 \pm 0	0,19	\downarrow 60 \pm 1	80 – 350
D-Dimere mg/l FEU	26	\uparrow 30 \pm 10	46	\uparrow 32 \pm 7	0,39	\uparrow 32 \pm 8	< 1
Protein C %	26	22 \pm 12	46	22 \pm 10	0,89	22 \pm 10	70 – 140
AT III %	26	32 \pm 16	46	34 \pm 11	0,45	33 \pm 13	80 – 120
B	Benigne (b)		Maligne (m)		p-Wert b vs. m		
Faktor II U/ml	20	0,22 \pm 0,10	52	0,30 \pm 0,10	0,004	0,28 \pm 0,11	0,7 – 1,2
Faktor V U/ml	20	0,05 \pm 0,00	52	0,05 \pm 0,00	0,46	0,05 \pm 0,00	0,7 – 1,2
Faktor VII U/ml	20	0,09 \pm 0,04	52	0,16 \pm 0,09	0,007	0,14 \pm 0,09	0,7 – 1,2
Faktor X U/ml	20	0,05 \pm 0,00	52	0,05 \pm 0,02	0,31	0,05 \pm 0,02	0,7 – 1,2
F1+2 nmol/l	20	\uparrow 1,3 \pm 0,4	52	\uparrow 1,3 \pm 0,4	0,48	\uparrow 1,3 \pm 0,4	0,4 – 1,1
Fibrinogen mg/dl	20	\downarrow 60 \pm 2	52	\downarrow 60 \pm 0	0,11	\downarrow 60 \pm 1	80 – 350
D-Dimere mg/l FEU	20	\uparrow 29 \pm 12	52	\uparrow 33 \pm 6	0,12	\uparrow 32 \pm 8	< 1
Protein C %	20	18 \pm 12	52	23 \pm 10	0,80	22 \pm 10	70 – 140
AT III %	20	25 \pm 13	52	36 \pm 12	0,002	33 \pm 13	80 – 120

Da hier vermutlich das Endergebnis einer aktivierten Gerinnung im Erguss vor der Punktion beobachtet wurde, die wesentlich von den essentiellen Serinproteasen FIIa und FXa abhängt, wurden die nachfolgenden Untersuchungen zum Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf die Zellbiologie auf FIIa und FXa beschränkt, da für diese beiden Proteasen in der klinischen Praxis gut bekannte Inhibitoren zugelassen sind. Damit stehen im Falle einer nachgewiesenen tumorprogressiven Wirkung von FIIa und FXa mögliche Therapieoptionen zur Verfügung.

Da über die TPZ neben den aktiv vorliegenden Gerinnungsproteasen FIIa und FXa auch deren Zymogene Prothrombin (FII) und Faktor X (FX) in die aktiven Formen überführt und im Ergebnis berücksichtigt wurden, wurde ein chromogener Assay etabliert, der bei der Aktivitätsmessung die Zymogene nicht aktivierte und damit nicht erfasste.

3.1.4 FIIa und FXa liegen im punktierten Erguss inaktiv vor

Ziel dieses Versuches war die Bestimmung der tatsächlich vorliegenden Aktivitäten von FIIa und FXa im Erguss, ohne deren Zymogene zu aktivieren und mit zu erfassen. Ziel war es, die in den Ergüssen ermittelten Aktivitäten in den nachfolgenden Versuchen so verwenden zu können, wie sie im Erguss vorkommen. In weiterführenden *in-vitro* Untersuchungen wurden die Gerinnungsfaktoren mit einer entsprechenden Aktivität zur Stimulation von Zelllinien eingesetzt werden.

Mittels eines chromogenen Enzymaktivitäts-Assays konnte eine Gesamtaktivität ermittelt werden, die durch den Einsatz selektiver Inhibitoren von den Einflüssen anderer Proteasen des Ergusses bereinigt wurde. FIIa wurde mit dem rekombinanten, selektiven Inhibitor Lepirudin gehemmt, Faktor Xa wurde mit dem niedermolekularen Inhibitor Rivaroxaban gehemmt. Zusätzlich wurde bei jeder Kinetik parallel eine turbidimetrische Messung bei 562 nm durchgeführt, um den Einfluss einer sich im Laufe der Messung einstellenden Trübung der Messlösung zu eliminieren.

Für die Kalibrierung des Assays für FIIa wurde der *WHO 2nd International Standard for Thrombin 01/580* eingesetzt (Abb. 17). Der *3rd International Standard for Factors II and X 98/590* war zum Zeitpunkt der Etablierung nicht verfügbar. Daher wurde zur Kalibrierung des FXa-Assays auf ein Produkt des Herstellers American Diagnostica ausgewichen, und die angegebene Aktivität der Charge als Richtgröße verwendet (Abb. 18). Für die Bestimmung der FIIa-Aktivität in den Ergüssen wurden 2.000

ATU/ml je Ansatz eingesetzt (1 ATU hemmt 1 U FIIa der WHO Präparation 89/588). Diese Konzentration entspricht dem 2,5-fachen der titrierten Konzentration von 800 ATU/ml (Abb. 19), mit der 3 U/ml FIIa zuverlässig gehemmt werden konnten. Für die Untersuchung einiger Ergüsse wurde die Konzentration auf 3.500 ATU/ml Lepirudin erhöht, da mit 2.000 ATU/ml keine ausreichende Hemmung erzielt werden konnte. Trotzdem zeigten diese Ergüsse keine erhöhte FIIa-Aktivität. Die Titration von 1,0 U/ml FXa mit Rivaroxaban ergab eine sichere Hemmung der Aktivität ab 0,5 μ M Rivaroxaban (Abb. 20), weshalb für die Bestimmung der FXa-Aktivität in den Ergüssen Rivaroxaban mit 1,0 μ M eingesetzt wurde.

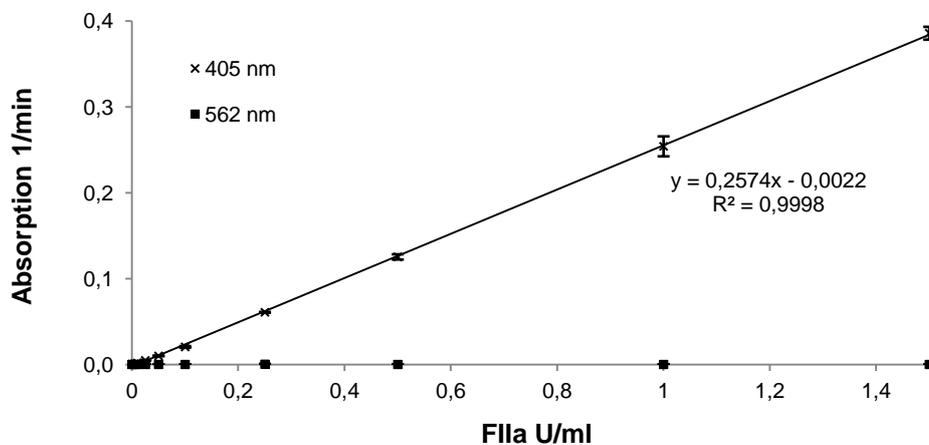


Abbildung 17: Darstellung einer repräsentativen Kalibrierung des chromogenen Assays zur Bestimmung der FIIa-Aktivität; $n=3$ Versuche; $MW \pm SA$.

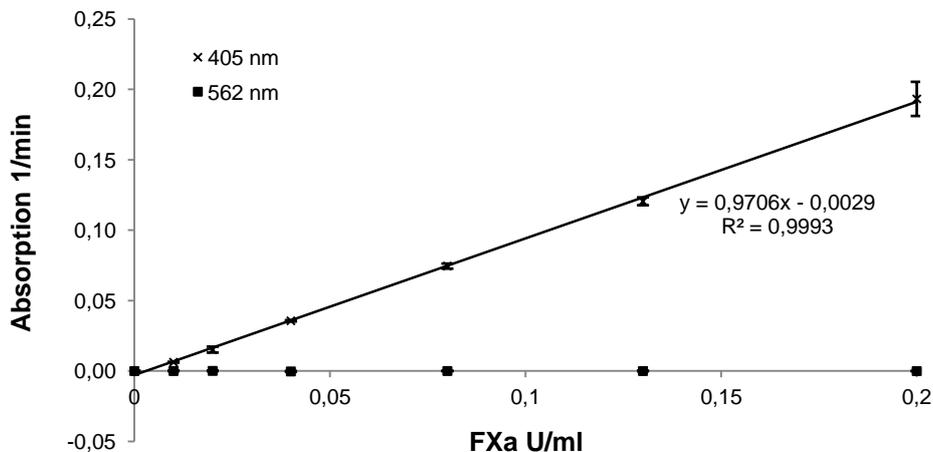


Abbildung 18: Darstellung einer repräsentativen Kalibrierung des chromogenen Assays zur Bestimmung der FXa-Aktivität; $n=3$ Versuche; $MW \pm SA$.

Einflüsse durch Trübung der Messlösung konnten bei der Etablierung beider chromogener Methoden nicht festgestellt werden. Bei der Vermessung der verdünnten Ergüsse kam es dagegen bei einigen Proben zu erheblichen Trübungen.

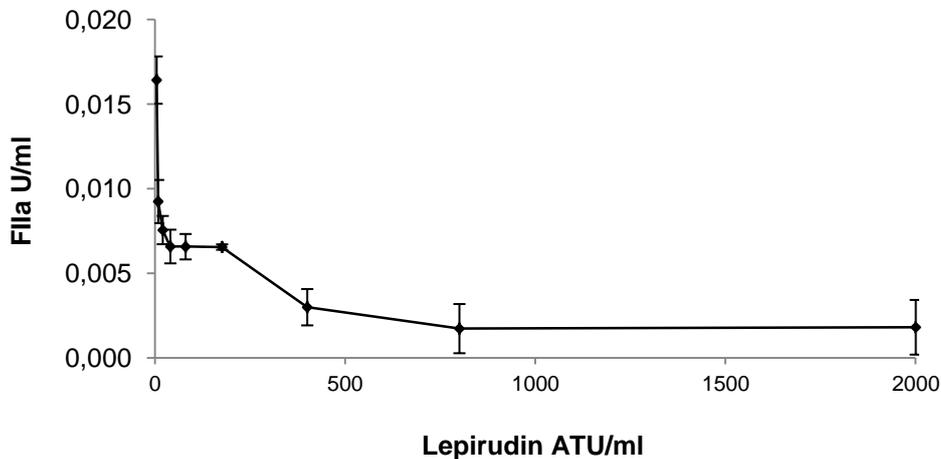


Abbildung 19: Titration von FIIa mit Lepirudin: 800 ATU/ml Lepirudin hemmen 3 U/ml FIIa (vergrößerter Teilausschnitt); n=3 Versuche; MW \pm SA.

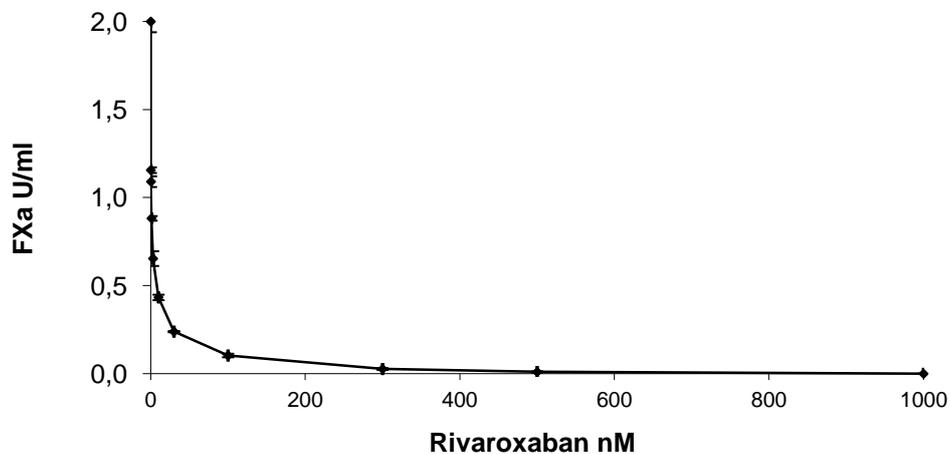


Abbildung 20: Titration von FXa mit Rivaroxaban: 500 nM (0,5 μ M) Rivaroxaban hemmen 1 U/ml Faktor Xa; n=3 Versuche; MW \pm SA.

Im Mittel fand sich in den 52 mittels chromogenem Assay untersuchten Ergüssen eine kaum messbare FIIa-Aktivität von 0,03 U/ml (Tab. 23). Diese entsprach rund 11 % der mittels TPZ bestimmten Gesamtaktivität von 0,28 U/ml in den 72 Ergüssen der Tabelle 22. Die FXa-Aktivität in weiteren 20 untersuchten Ergüssen betrug mit

0,003 U/ml nur 6 % der mittels TPZ untersuchten 72 Ergüsse in Tabelle 22. Beide Gerinnungsfaktoren liegen somit nur zu rund einem Zehntel aktiviert im Ergussmaterial vor, wenn ihre Zymogene nicht mit erfasst werden. Es konnte kein signifikanter ($p < 0,05$) Unterscheid zwischen Ergüssen männlicher Patienten gegenüber Ergüssen weiblichen Patientinnen festgestellt werden. Ebenso unterschieden sich die Ergüssen benigner Diagnose gegenüber Ergüssen maligner Diagnose nicht signifikant ($p < 0,05$; Tab. 23).

Tabelle 23: Im Erguss lagen FIIa und FXa weitgehend inaktiv vor. Eine Gegenüberstellung von Ergüssen aus männlichen vs. weiblichen Patienten bzw. von malignen vs. benignen Erkrankungen zeigte keine signifikanten Unterschiede. Photometrische Messung der Umsetzung chromogener Substrate und Hemmung mit selektiven Inhibitoren; $n=3$ je Erguss; $MW \pm SA$; $p < 0,05$.

	Ergüsse (chromogener Assay)						Referenz Plasma [268]
	männlich (m)		weiblich (w)		p-Wert m vs. w	gesamt m + w FIIa n = 52 FXa n = 20	
	n	Wert	n	Wert			
FIIa U/ml	17	0,054 ± 0,128	35	0,021 ± 0,054	0,20	0,032 ± 0,086	0,7 – 1,2
FXa U/ml	9	0,004 ± 0,007	11	0,002 ± 0,003	0,39	0,003 ± 0,005	0,7 – 1,2
	Ergüsse (chromogener Assay)						Referenz Plasma [268]
	benigne (b)		maligne (m)		p-Wert b vs. m	gesamt b + m FIIa n = 52 FXa n = 20	
	n	Wert	n	Wert			
FIIa U/ml	14	0,051 ± 0,142	38	0,025 ± 0,053	0,34	0,032 ± 0,086	0,7 – 1,2
FXa U/ml	5	0,002 ± 0,003	15	0,003 ± 0,006	0,98	0,003 ± 0,005	0,7 – 1,2

FIIa und FXa katalysieren im chromogenen Assay nur je einen Anteil von ca. 5 % der mit den beiden Substraten im Erguss ermittelten proteolytischen Gesamtaktivität (Tab. 24). Diese restlichen 95 % der Gesamtaktivität werden von anderen Enzymen katalysiert.

Tabelle 24: FIIa und FXa katalysierten mit 4,9 % bzw. 5,2 % nur einen geringen Anteil der mit dem jeweiligen Substrat ermittelten Gesamtaktivität im Erguss: Photometrische Messung der Umsetzung chromogener Substrate und Hemmung mit selektiven Inhibitoren; $n=3$ je Erguss; $MW \pm S.A.$

	n	Gesamtaktivität Chromogener Assay	Aktivität Protein Chromogener Assay
		U/ml	U/ml %
FIIa (S-2238)	52	0,653 ± 0,875	0,032 ± 0,086 4,9
FXa (S-2765)	20	0,058 ± 0,045	0,003 ± 0,005 5,2

3.2 *In-vitro* Untersuchungen an Zelllinien und Zellen aus Ergüssen

Die Beobachtung eines aktivierten Gerinnungssystems im Erguss warf die Frage nach einem pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Ergussumilieu und Tumorbiologie auf und welche Rolle speziell die Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa dabei spielen. Die Proteasen FIIa und FXa sind bekannte Aktivatoren der PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren, deren Einfluss auf zellbiologische Effekte in der Progression maligner Erkrankungen bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte [134, 172, 174, 200, 269]. Dabei ist u. a. die Modulation der Proliferation und Migration von Tumorzellen sowie deren verringertes Ansprechen auf Zytostatika beschrieben worden [134, 163, 177, 178, 269]. Um den Zusammenhang zwischen dem bereits nachgewiesenen aktivierten Gerinnungssystem im Erguss und zellbiologischen Effekten im Rahmen einer möglichen Tumorprogression herzustellen, wurden zunächst die Patientenzellen aus malignen Ergüssen hinsichtlich ihrer PAR-1 und PAR-2 Expression untersucht.

3.2.1 Zellen aus malignen Ergüssen exprimieren PAR-1/2 Rezeptoren

Die Hypothese eines rezeptorvermittelten Einflusses der aktivierten Gerinnungsfaktoren auf die Zellbiologie setzt die Expression membranständiger PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren voraus. Bei den mittels Durchflusszytometrie untersuchten, oberflächengefärbten Zellen aus malignen Ergüssen zeigten sich 78 % der Kulturen (n=18) positiv für PAR-1 und 17 % der Kulturen (n=12) positiv für PAR-2 (Tab. 25).

Tabelle 25: Patientenzellen exprimierten mehrheitlich membranständige PAR-1, aber kaum PAR-2 Rezeptoren: Durchflusszytometrische Untersuchung oberflächengefärbter Zellen. Es wurden je Patientenzellkultur eines Patienten 3 separate Färbungen durchgeführt.

	PAR-1		PAR-2	
	n	%	n	%
positiv	14/18	78	2/12	17

Da die Patientenzellen eine sehr langsame Proliferation aufwiesen sowie häufig mit Fibroblasten verunreinigt waren, konnten sie nicht für die weiteren umfangreichen Versuche eingesetzt werden. Daher wurde auf die Zelllinien HPDE, PANC-1 und THP-1 als Modellzelllinien ausgewichen, mit deren Auswahl sowohl Karzinomzellen (PANC-1), monozytäre Tumorzellen (THP-1) als auch nicht-tumorigene Zellen (HPDE) Verwendung fanden. Weiterhin stand mit PANC-1 eine Zelllinie mit weit fortgeschrittener EMT zur Verfügung, während HPDE Zellen kaum Anzeichen einer

EMT zeigen, so dass sich diese beiden Zelllinien vor allem für die Untersuchung zur EMT und Zellmigration eignen (s. ab Kap 3.2.5). Zunächst wurden alle Zelllinien hinsichtlich der Expression und Lokalisation von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren überprüft, um anschließend den Einfluss einer Stimulation mit FIIa, FXa, SFLLRN (PAR-1 Agonist), SLIGKV (PAR-2 Agonist) oder 10 % (v/v) Erguss auf Zellwachstum, Chemosensitivität, EMT-assoziierte Markerproteine sowie das Migrationsverhalten zu untersuchen.

3.2.2 Fötale Kälberserum enthält aktive Gerinnungsfaktoren

Im Rahmen der Zellkultur wird fötales Kälberserum (FCS) als Wachstumsstimulus und Nährstoffquelle eingesetzt. Das FCS enthält neben weiteren Wachstumsfaktoren auch die Gerinnungsproteasen FIIa und FXa sowie deren physiologische Inhibitoren PC und AT III. Die bovinen Gerinnungsfaktoren FIIa, FXa, AT III und PC weisen hohe strukturelle und funktionelle Homologie zu den humanen Faktoren auf, und werden aufgrund ihrer speziesübergreifenden Reaktivität teilweise intensivmedizinisch am Menschen eingesetzt [270-275]. Um den Einfluss dieser Proteasen und Inhibitoren auf geplante *in-vitro* Studien an Zellkulturmodellen kalkulieren zu können, wurde eine routinemäßige Gerinnungsanalytik an FCS-Proben mittels TPZ durchgeführt. Untersucht wurden fünf FCS-Proben verschiedener Hersteller im Zentrallabor des UK-SH, Campus Kiel, mit human-spezifischen Reagenzien, wodurch die ermittelten Aktivitäten der bovinen Proben aufgrund der nicht ganz 100-prozentigen Homologie zwischen humanen und bovinen Gerinnungsfaktoren leicht abweichen dürften (Tab. 26). Die ermittelte Aktivität für FII beläuft sich auf $0,12 \pm 0,04$ U/ml. Für FX ergibt sich im Mittel eine Aktivität von $0,28 \pm 0,07$ U/ml im FCS. Die Aktivitäten der physiologischen Inhibitoren AT III und PC waren deutlich höher als die von FII und FX. Die erniedrigten Fibrinogenspiegel sprachen zusammen mit den erhöhten F1+2 Fragmenten für eine aktivierte Fibrinogenese. Die Fibrinolyse des gebildeten Fibrins hatte aufgrund der niedrigen Spiegel der D-Dimere bisher nicht eingesetzt. Eine weiterführende chromogene Bestimmung der tatsächlichen Aktivitäten von FIIa und FXa im chromogenen Assay erfolgte nicht. Aufgrund dieser Befunde wurden alle Versuche mit Zelllinien unter Serumstarvierung (0,5 oder 1 % (v/v) FCS) durchgeführt, um einen Einfluss der im FCS befindlichen Gerinnungsfaktoren auf die zu untersuchenden zellbiologischen Effekte in den Zelllinien zu vermeiden.

Tabelle 26: FCS-Proben fünf verschiedener Hersteller enthielten deutliche Mengen Faktor II, V und X sowie deren physiologische Inhibitoren Protein C und AT III: Die Spiegel lagen unterhalb der Referenz im Plasma Gesunder [268]. Der prokoagulatorische Marker F1+2 war deutlich erhöht und wies auf eine aktivierte Gerinnung hin. Dagegen zeigte sich der Fibrinolysemarker D-Dimere erniedrigt; n=3; MW ± SA.

	FCS		Referenz Plasma [268]
	n	Wert	Wert
Faktor II U/ml	5	0,12 ± 0,04	0,7 – 1,2
Faktor V U/ml	5	> 2,0	0,7 – 1,2
Faktor X U/ml	5	0,28 ± 0,07	0,7 – 1,2
F1+2 nmol/l	5	21,6 ± 0,4	0,4 – 1,1
Fibrinogen mg/dl	5	< 60,0	80 – 350
D-Dimere mg/l FEU	5	< 0,2	< 1
Protein C %	5	40 ± 6	70 – 140
AT III %	5	48 ± 9	80 – 120

3.2.3 Expression und Lokalisation von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren in den Modellzelllinien

Um zunächst die Oberflächenexpression von PAR-1 und PAR-1 in den Modellzelllinien zu untersuchen, wurden nicht permeabilisierte Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen PAR-1 oder PAR-2 markiert und die markierten Zellen durchflusszytometrisch vermessen. Abbildung 21 zeigt mit Zellzahl gegen die Fluoreszenzintensität (FL1 oder FL2) graphisch dargestellt eine Rechtsverschiebung der mit anti-PAR-1/-2 markierten Zellen (schwarz) gegenüber dem unspezifischen Isotypenantikörper (grau). Dies entsprach einer intensiveren Fluoreszenzmarkierung der Population, die durch Bindung des spezifischen Antikörpers an membranständige PAR-Rezeptoren zustande kam. Je stärker die Rechtsverschiebung ausgeprägt ist, desto mehr Rezeptoren werden exprimiert.

Die Zelllinien PANC-1 und THP-1 zeigten sich in der Durchflusszytometrie deutlich positiv für PAR-1, auf HPDE Zellen konnten nur wenige membranständige Rezeptoren nachgewiesen werden. PANC-1 und HPDE Zellen exprimierten membranständige PAR-2 Rezeptoren, wohingegen auf THP-1 Zellen nur eine minimale Rechtsverschiebung zu detektieren war.

Die Expression der PAR Rezeptoren kann sowohl membranständig als auch endosomal dominiert sein, was vom Rezeptor (PAR-1, PAR-2) und dem Aktivierungszustand abhängig ist. Daher wurden die beiden Zelllinien HPDE und PANC-1 auf Deckgläschen ausgesät und nach Permeabilisierung der Zellen die

intrazelluläre Expression der PAR-1 und PAR-2 überprüft. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop nach Markierung mit fluoreszierenden Sekundärantikörpern sowie einer Kernfärbung im Vergleich zur jeweiligen Isotypenkontrolle.

Für THP-1 Zellen wurden bereits in diversen Studien indirekt PAR-2 Rezeptoren mittels selektiver Hexapeptide, blockierender Antikörper und PAR-2 siRNA durch Beeinflussung der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel, der Phosphorylierung von ERK1/2, der Expression entzündungsassoziierter Proteine wie u.a. TNF- α , IL-6 und NF- κB , nachgewiesen [276-280]. Daher erfolgte keine weitere Färbung der zytosolisch lokalisierten Rezeptoren.

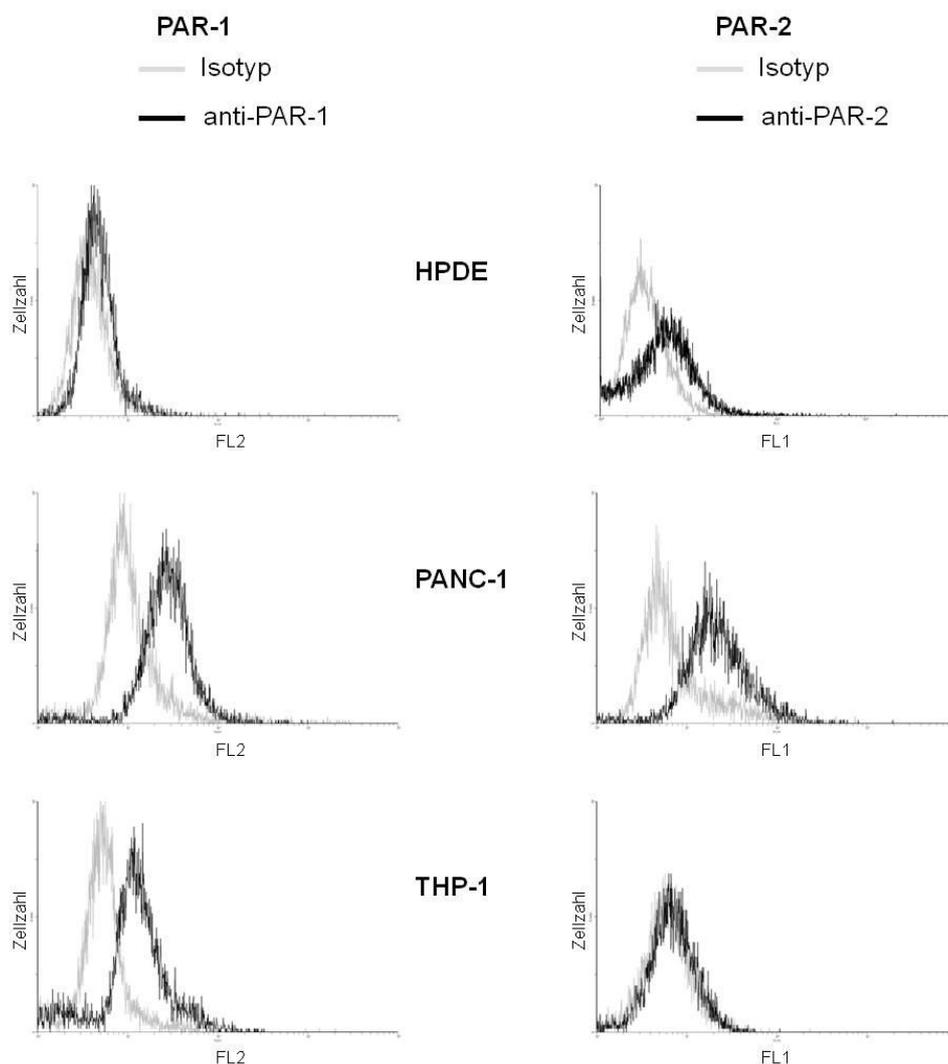


Abbildung 21: PANC-1 und THP-1 Zellen exprimieren deutlich mehr membranständigen PAR-1 Rezeptor als HPDE Zellen. HPDE und PANC-1 Zellen exprimieren deutlich mehr membranständigen PAR-2 Rezeptor als THP-1 Zellen: Exemplarische Histogramme (Zellzahl gegen Fluoreszenzintensität) durchflusszytometrischer Untersuchungen nach Färbung mit PAR-1 und PAR-2-spezifischen Antikörpern (schwarz) verglichen mit einer unspezifischen Isotypenkontrolle (grau).

Wie mittels Durchflusszytometrie detektiert wurde, konnte auch mit dieser Färbemethode eine membranständige PAR-1/2 Expression für PANC-1 Zellen nachgewiesen werden (Abb. 22 C, 23 C), wogegen HPDE Zellen nur PAR-2 membranständig exprimierten (Abb. 22 A, 23 A). In beiden Zelllinien war jedoch eine Expression von PAR-1/2 Rezeptoren vesikulär und perinukleär dominiert zu detektieren. Die Färbung mit der Isotypenkontrolle war in beiden Zelllinien negativ (Abb. 22 B/D, 23 B/D).

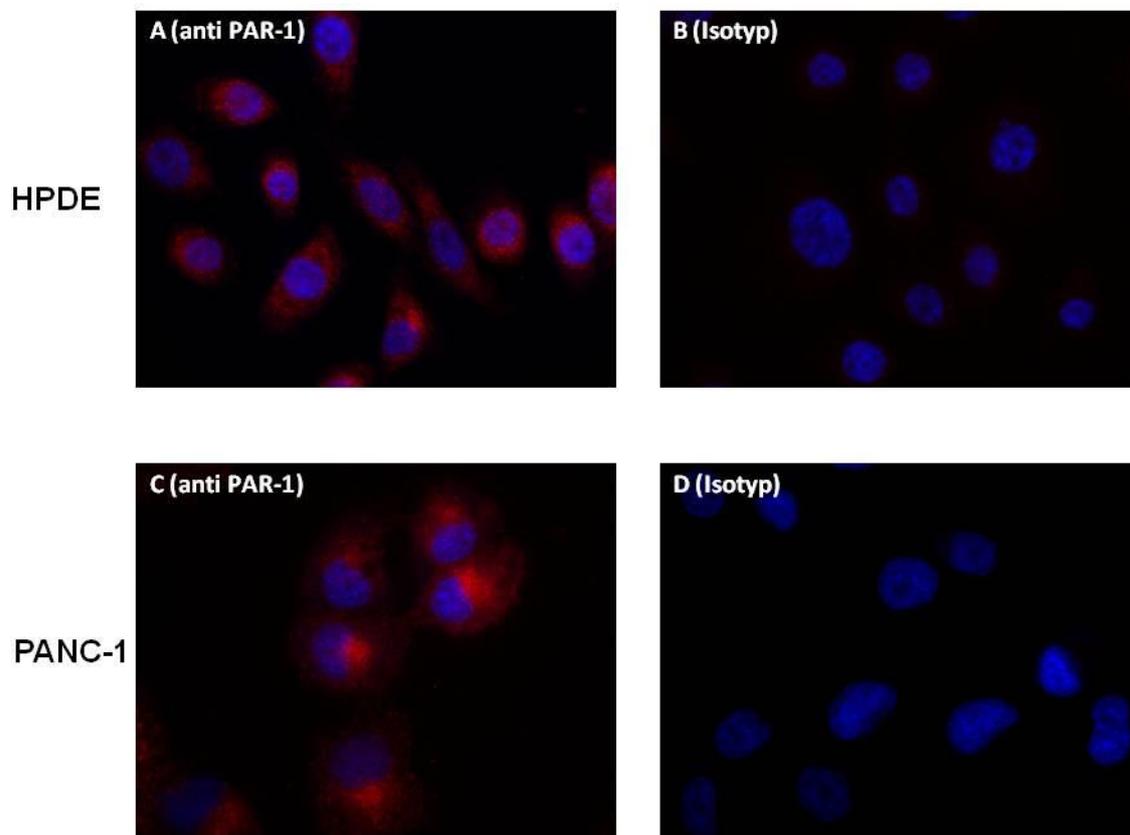


Abbildung 22: HPDE und PANC-1 Zellen zeigten eine deutliche perinukleäre, vesikuläre Expression von PAR-1 Rezeptoren: Die Zellen wurden 24 Stunden serumstarviert kultiviert, fixiert, permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PAR-1 Antikörpern (A, C) oder einer Isotypenkontrolle (B, D) sowie eine Kernfärbung (blau) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (rot) am Fluoreszenzmikroskop (exemplarische Abbildungen, 40-fach vergrößert).

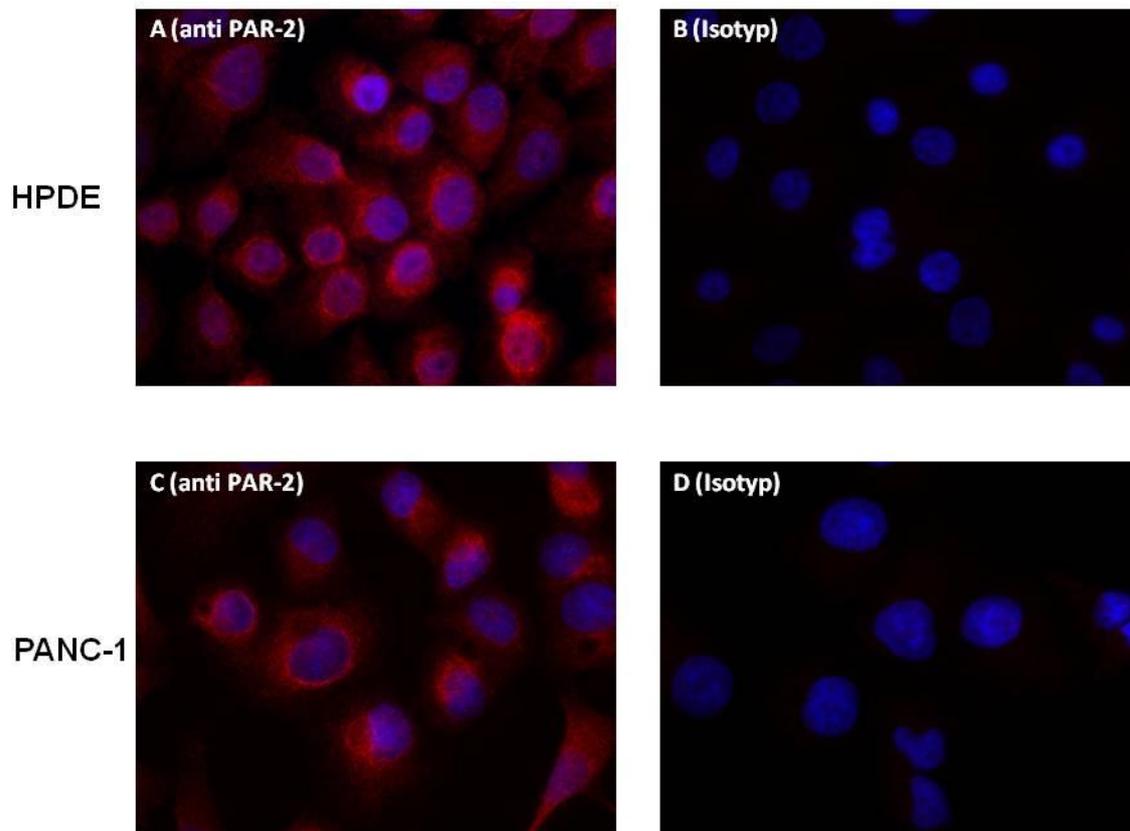


Abbildung 23: HPDE und PANC-1 Zellen zeigten eine deutliche perinukleäre, vesikuläre Expression von PAR-2 Rezeptoren: Die Zellen wurden 24 Stunden serumstarviert kultiviert, fixiert, permeabilisiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit anti-PAR-2 Antikörpern (A, C) oder einer Isotypenkontrolle (B, D) sowie eine Kernfärbung (blau) durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte nach Inkubation mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (rot) am Fluoreszenzmikroskop (exemplarische Abbildungen, 40-fach vergrößert).

Zusammenfassend exprimierten die drei Zelllinien HPDE, PANC-1 und THP-1 je beide Rezeptoren, PAR-1 und PAR-2, mit unterschiedlicher membranärer und zytoplasmatischer Verteilung. Bevor der Einfluss von FIIa, FXa und der hexapeptidischen PAR-Agonisten auf die Zellbiologie der genannten Zelllinien untersucht wurde, erfolgte der Nachweis einer PAR-Aktivierung durch die eingesetzten Stimulantien. Da FIIa und FXa jeweils beide Rezeptoren, PAR-1 und PAR-2, aktivieren, könnten bei vorliegendem Effekt die selektiven, hexapeptidischen PAR-Agonisten SFLLRN (PAR-1) und SLIGKV (PAR-2) eingesetzt werden, um den vermittelnden Rezeptor zu identifizieren.

3.2.4 Zellwachstums- und Zytotoxizitätsstudien

Zur Überprüfung des Einflusses von Erguss und Gerinnungsfaktoren auf das Zellwachstum und das Ansprechen auf Zytostatika in den Modellzelllinien wurde der Alamar Blue Assay an PANC-1 und THP-1 Zellen etabliert. Damit konnten sowohl Daten zu einer Karzinomzelllinie (PANC-1) als auch einer monozytären Tumorzelllinie (THP-1) erhoben werden.

3.2.4.1 Etablierung des Alamar Blue Assays

Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung des linearen Bereichs der Umsetzung von Resazurins zum fluoreszierenden Resorufin in Abhängigkeit von Zellzahl und Inkubationszeit. Verschiedene Zellzahlen wurden in 48 Well Platten ausgesät ($n=6$) und nach Adhärenz serumstarviert für 72 Stunden inkubiert. Die Ansätze wurden mit 10 % (v/v) Resazurin-Lösung versetzt und über mehrere Stunden die Entwicklung der Fluoreszenz beobachtet. Die Zellen wurden abgelöst und die im Durchflusszytometer bestimmte Zellzahl gegen die relative Fluoreszenz aufgetragen. Lineare Abhängigkeit der Substratumsetzung wurden für PANC-1 Zellen bis $5,5 \times 10^5$ und für THP-1 Zellen bis $1,2 \times 10^6$ Zellen gefunden, wobei die Inkubationszeit mit Substrat so kurz wie möglich gewählt wurde (Abb. 24).

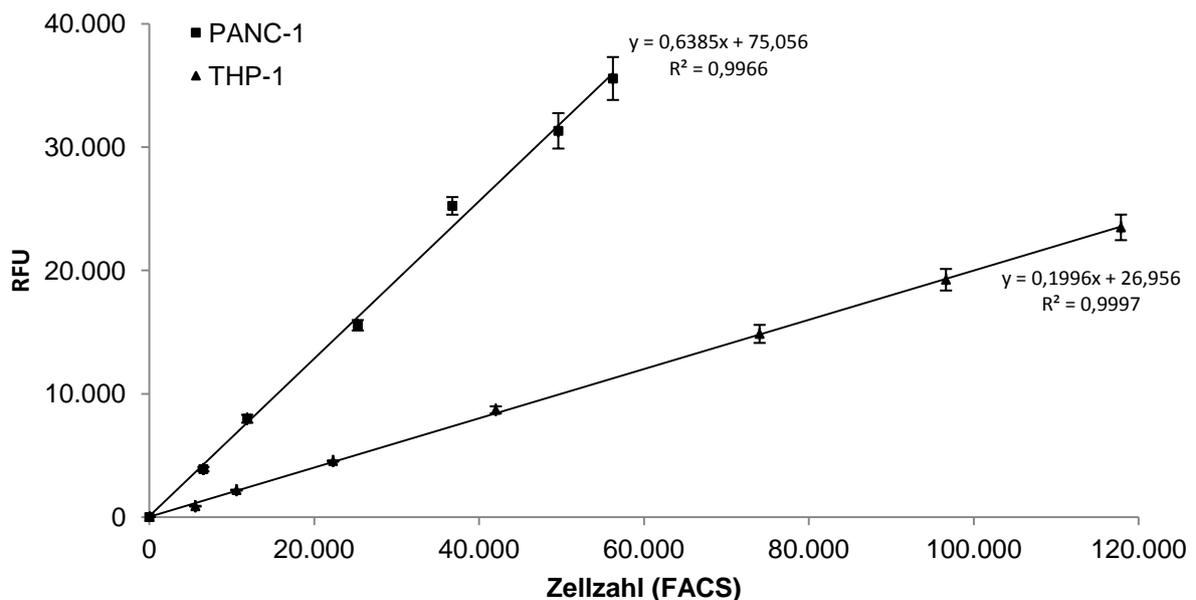


Abbildung 24: Kalibrierung des Alamar Blue Assays: Lineare Abhängigkeit der relativen Fluoreszenzintensität (RFU) von der Zellzahl für PANC-1 und THP-1 Zellen; Exemplarische Abbildung; $n=6$; $MW \pm SA$.

3.2.4.2 Titration der IC₅₀ für Carboplatin und Doxorubicin

Um den Einfluss von Ergüssen sowie der PAR-Agonisten auf die Chemosensitivität der Modellzelllinien quantifizieren zu können, wurde zunächst die IC₅₀ der Zytostatika Carboplatin und Doxorubicin an den Zelllinien PANC-1 und THP-1 durch Titration der Zytostatika in serumstarviertem Medium bestimmt. Dazu wurden die Zellen über 72 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen Carboplatin oder Doxorubicin inkubiert. Anschließend wurde mittels Resazurin über die Fluoreszenz die Zellzahl bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Die ermittelten IC₅₀-Werte können der Tabelle 27 entnommen werden.

Tabelle 27: Mittels Alamar Blue Assay bestimmte IC₅₀ der verwendeten Zelllinien; n. b. = nicht bestimmbar aufgrund von Löslichkeitsproblemen und geringem Ansprechen der Zelllinie; n=3; MW ± SA.

	Carboplatin IC ₅₀	Doxorubicin IC ₅₀
PANC-1	n. b.	3,0 µM
THP-1	20,0 ± 0,9 µM	184,7 ± 11,7 nM

Beispielhaft zeigt Abbildung 25 halblogarithmisch eine Titration mit Carboplatin an THP-1 Zellen, mittels derer die IC₅₀-Werte bestimmt wurden. Aufgrund des zu geringen Ansprechens und der nicht ausreichenden Löslichkeit von Carboplatin konnte an PANC-1 Zellen keine IC₅₀ bestimmt werden. Daher konnte im Verlauf der Arbeit der Einfluss der eingesetzten Stimulantien (FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV) auf das Ansprechen von PANC-1 Zellen auf Carboplatin nicht untersucht werden.

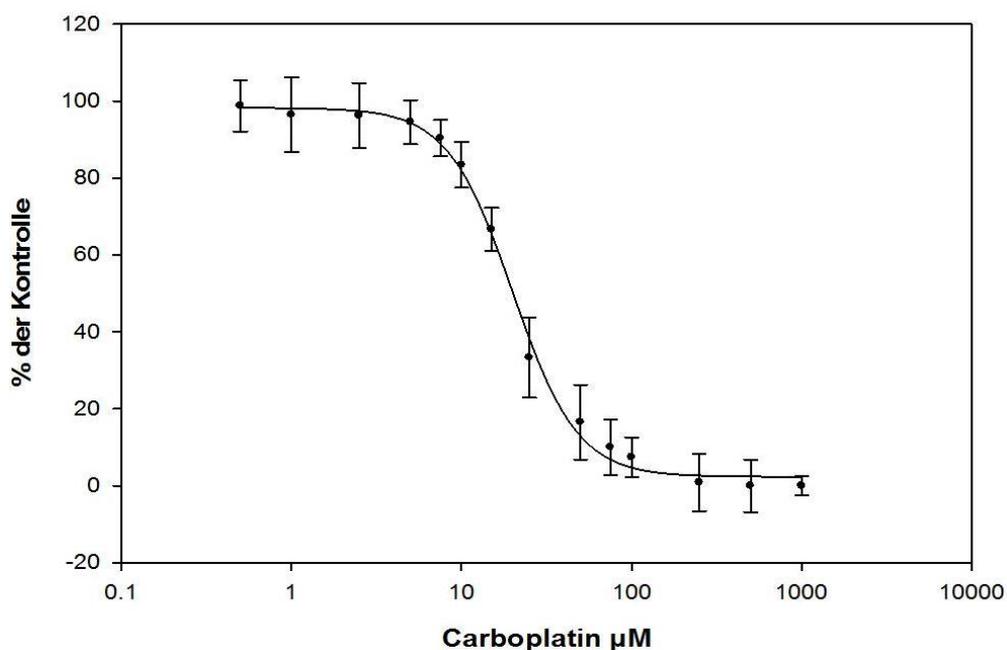


Abbildung 25: Titration von Carboplatin an THP-1 Zellen zur Bestimmung der IC₅₀; n=3; MW ± SA.

3.2.4.3 Ergüsse beeinflussen Zellwachstum und Chemosensitivität von THP-1 Zellen uneinheitlich

In diesem Versuch sollte der Einfluss von verschiedenen benignen und malignen Ergüssen auf Zellwachstum und Chemosensitivität von Tumorzellen quantifiziert werden. Eingesetzt wurden THP-1 Zellen, da diese aufgrund ihres suspensiven Wachstums nicht mit Trypsin von der Kulturflasche gelöst werden mussten, und somit eine Verfälschung des Ergebnisses durch PAR-Aktivierung mittels Trypsin vermieden werden konnte. Die THP-1 Zellen wurden in Kulturmedium versetzt mit 10 % (v/v) Erguss über 72 Stunden mit Carboplatin oder Doxorubicin (je IC_{50}) behandelt. Die Auswertung erfolgte gegen ergussfreie, serumstarvierte Ansätze. Zusätzlich wurden zytostatikumfreie, serumstarvierte Ansätze mit und ohne 10 % (v/v) Erguss inkubiert, sodass der Einfluss der Ergüsse auf das Zellwachstum ermittelt werden konnte. Es wurden 60 Ergüsse von Patienten mit sowohl benigner als auch maligner Diagnose verwendet, wobei maligne Ergüsse von Patienten mit unterschiedlichen Tumorerkrankungen zum Einsatz kamen. Dabei wurde differenziert zwischen dem Geschlecht der Patienten, Benignität oder Malignität des Ergusses aufgrund der Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion, sowie den klassierten Entitäten der Tumorerkrankungen (Lunge, Gastrointestinaltrakt und gynäkologische Tumoren; s. Tab. 21). Die Daten sind in Boxplots dargestellt. Innerhalb der Box liegen 50 % der Werte, begrenzt durch unteres und oberes Quartil und getrennt durch den Median. Die Whisker entsprechen maximal dem 1,5-fachen Interquartilsabstand, außerhalb liegende Werte gelten als ausreißerverdächtig. Bei Fallzahlen < 9 entfallen die Whisker.

Die durchgezogenen senkrechten Kontrolllinien bei der 100 % Markierung in den Abbildungen 26 bis 29 entsprechen den Kontrollen ohne Erguss. Dabei ist zwischen Ansätzen ohne (Zellwachstum) und mit Zytostatikum (Carboplatin, Doxorubicin) zu unterscheiden. Bei allen Ansätzen mit Zytostatikum bezieht sich diese Kontrolle ohne Erguss auf die bereits durch Zugabe des Zytostatikums reduzierte Zellzahl. Leichte Schwankungen im Effekte der konstanten Menge der zugegebenen Zytostatika durch Veränderung der IC_{50} mit fortschreitender Passagierung der Zellen wurden so mit berücksichtigt. Ein Vergleich zwischen den Ansätzen mit und ohne Zytostatikum ist somit in diesen Abbildung nicht möglich.

Die Inkubation von THP-1 Zellen mit den untersuchten Ergüssen führte im Mittel zu einer um 22 % reduzierten Zellzahl gegenüber der Kontrolle ohne Erguss (Tab. 28).

Tabelle 28: Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss führte nach 72-stündiger Inkubation zu erniedrigten Zellzahlen in unbehandelten und mit Carboplatin oder Doxorubicin behandelten Ansätzen gegenüber der Kontrolle ohne Erguss; n=3 je Erguss; MW ± SA.

	n	Zellwachstum	Chemosensitivität	
			Carboplatin	Doxorubicin
Ohne Erguss	60	100 % (Kontrolle)	100 % (Kontrolle)	100 % (Kontrolle)
10 % (v/v) Erguss	60	78 ± 33 % d. K.	72 ± 28 % d. K.	75 ± 36 % d. K.

Auch die Zellzahl der mit Carboplatin bzw. Doxorubicin behandelten THP-1 Zellen wurde durch Inkubation mit den Ergüssen im Mittel um weitere 28 % bzw. 25 % gegenüber der Kontrolle ohne Erguss reduziert. Da diese gemittelte Auswertung der deutlich streuenden Effekte der Ergüsse das Ergebnis zu stark vereinfachte, wurden die Ergüsse wie bereits oben erwähnt klassiert.

Zuerst erfolgte eine Klassierung der Ergebnisse nach Benignität und Malignität der Ergüsse sowie als zweites Merkmalspaar unterschieden nach dem Geschlecht der Patienten (Abb. 26). Signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede im zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test ergaben sich für die Merkmale Zellwachstum und Sensitivität gegenüber Carboplatin. THP-1 Zellen, die mit malignen Ergüssen weiblicher Patientinnen kultiviert wurden, zeigten ein im Mittel um 27 % reduziertes Zellwachstum (73 ± 38 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=32$) gegenüber einer Reduktion der Zellwachstums um 20 % durch Inkubation der Zellen mit malignen Ergüssen männlicher Patienten (80 ± 15 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=11$) bzw. einem um 1 % gesteigerten Zellwachstum durch Inkubation mit benignen Ergüssen weiblicher Patientinnen (101 ± 33 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=8$). Mit Carboplatin behandelte THP-1 Zellen, die mit benignen Ergüssen männlicher Patienten (64 ± 13 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=9$) inkubiert wurden, zeigten eine deutlichere Reduktion der Zellzahl gegenüber einer Inkubation der Zellen mit malignen Ergüssen männlicher Patienten (78 ± 19 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=11$) und benignen Ergüssen weiblicher Patientinnen (98 ± 38 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=8$). Die Inkubation von Carboplatin behandelten THP-1 Zellen mit malignen Ergüssen weiblicher Patientinnen (66 ± 29 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=32$) führte zu einer signifikant ($p < 0,05$) niedrigeren Zellzahl gegenüber einer Inkubation mit malignen

Ergüssen männlicher Patienten (78 ± 19 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=11$) und gegenüber einer Inkubation mit benignen Ergüssen weiblicher Patientinnen (98 ± 38 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=8$).

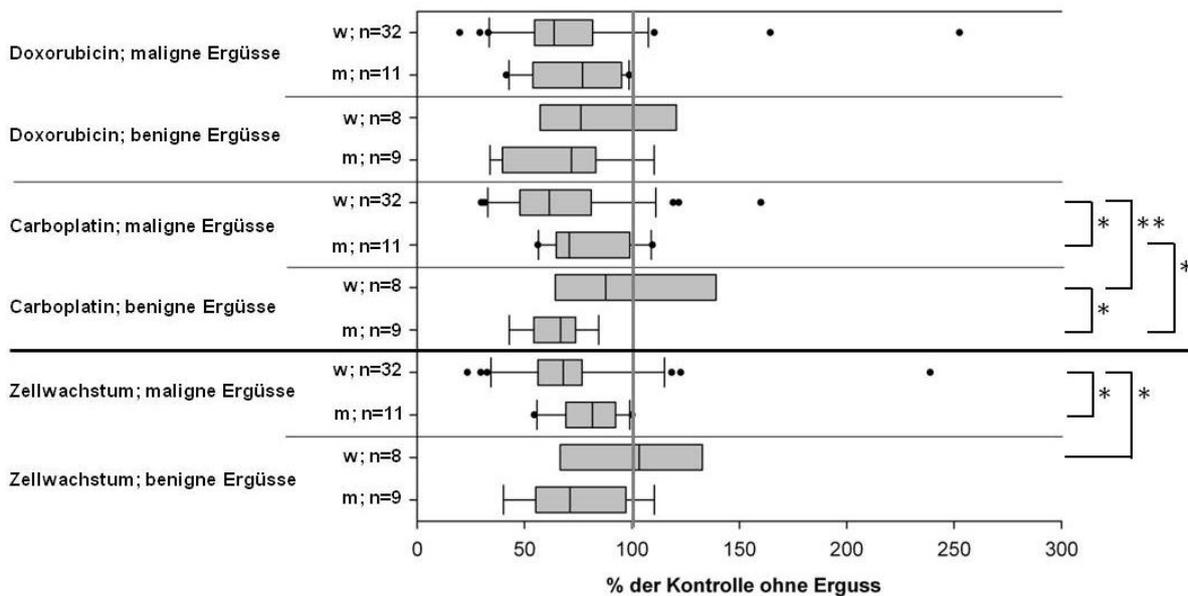


Abbildung 26: Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss beeinflusste das Zellwachstum von THP-1 Zellen sowie deren Ansprechen auf Carboplatin und Doxorubicin: THP-1 Zellen wurden mit und ohne 10 % (v/v) Erguss verschiedener Patienten ($n=60$; w: weiblich; m: männlich) und mit und ohne Zytostatikum (IC_{50}) kultiviert, nach 72 Stunden im Alamar Blue Assay vermessen und die prozentuale Änderung gegenüber der Kontrolle ohne Erguss (100 %) in Boxplots dargestellt. Klassierung nach Benignität/Malignität der Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion sowie Sexus der Patienten; $n=3$ je Erguss, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Da die nach Sexus klassierten Ergüsse mit unterschiedlichen Primärtumoren verschiedener Entitäten einhergingen, erfolgte eine weitere Unterteilung der malignen Ergüsse nach Entitäten, um eventuelle Einflussfaktoren der zugrunde liegenden Tumorerkrankungen aufdecken zu können. Es wurde in gastrointestinale (Ösophagus, Kardia, Magen, Kolon, Rektum, Pankreas), gynäkologische (Mamma, Ovar, Uterus) und Lungentumoren (NSCLC, SCLC, Pleuramesotheliom) klassiert, da so bei den schon geringen Fallzahlen keine Klasse unter vier Fälle sank und eine statistische Auswertung möglich war.

Der in Abbildung 26 beobachtete Unterschied zwischen einer verglichen mit der Kontrolle kaum veränderten Zellzahl von THP-1 Zellen durch benigne Ergüsse weiblicher Patientinnen (101 ± 33 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=8$) gegenüber der signifikant ($p < 0,05$) verringerten Zellzahl durch maligne Ergüsse weiblicher Patientinnen konnte stark signifikant ($p < 0,01$) den Ergüssen gynäkologischer Tumoren (65 ± 20 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=11$) zugeordnet werden, und war tendenziell auch nach Kultur mit Ergüssen weiblicher Patientinnen gegenüber anderen Tumorentitäten zu beobachten (Abb. 27). Signifikant ($p < 0,05$) war ebenfalls der Unterschied zwischen der leicht erniedrigten Zellzahl der THP-1 Zellen als Effekt maligner Ergüsse männlicher Patienten mit Lungentumoren gegenüber der stärker erniedrigten Zellzahl durch benigne Ergüsse männlicher Patienten, obwohl alle Ergüsse männlicher Patienten tendenziell gleichermaßen zu einer reduzierten Zellzahl führten.

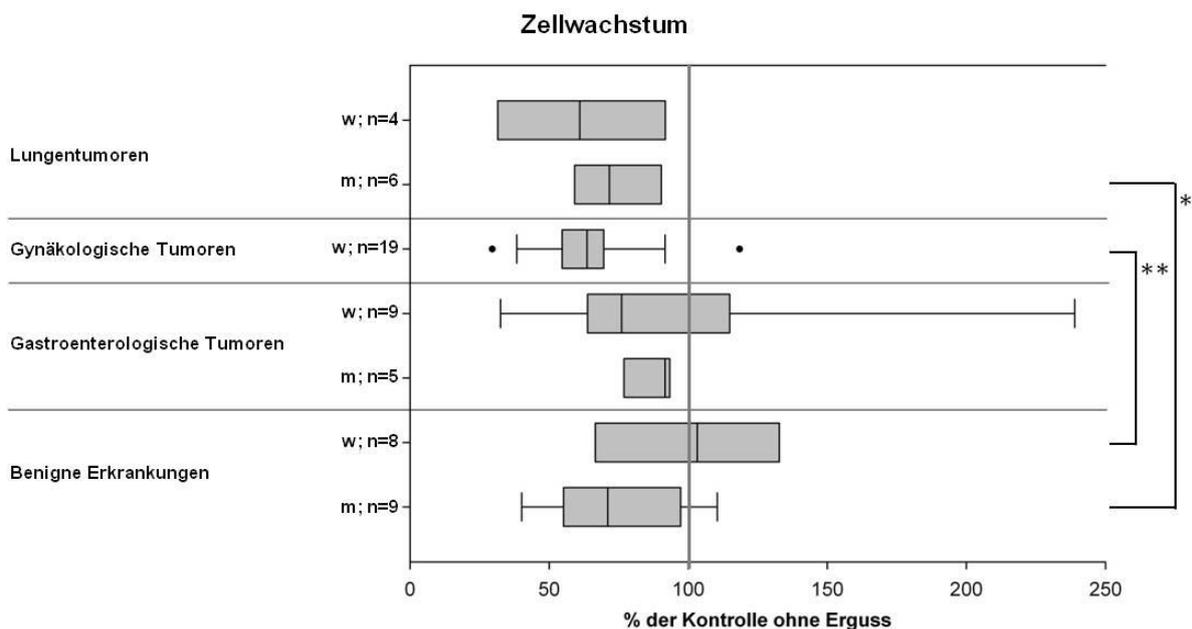


Abbildung 27: Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss beeinflusste das Zellwachstum: THP-1 Zellen wurden mit und ohne 10 % (v/v) Erguss verschiedener Patienten ($n=60$; w: weiblich; m: männlich) kultiviert, nach 72 Stunden im Alamar Blue Assay vermessen und die prozentuale Änderung gegenüber der Kontrolle ohne Erguss (100 %) in Boxplots dargestellt. Klassierung nach Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion sowie Sexus der Patienten; $n=3$ je Erguss, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

Die in Abbildung 26 hochsignifikante ($p < 0,01$) Reduktion der Zellzahl Carboplatin behandelter THP-1 Zellen durch Supplementierung des Kulturmediums mit malignen Ergüssen weiblicher Patientinnen gegenüber benignen Ergüssen weiblicher Patientinnen (98 ± 38 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=8$) konnte in Abbildung 28 ebenfalls hochsignifikant ($p < 0,01$) den Ergüssen gynäkologischer Tumoren zugeordnet werden (60 ± 20 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=8$). Es konnten weder Unterschiede zwischen benignen und malignen Ergüssen noch den Ergüssen unterschiedlicher Tumorentitäten männlicher Patienten festgestellt werden.

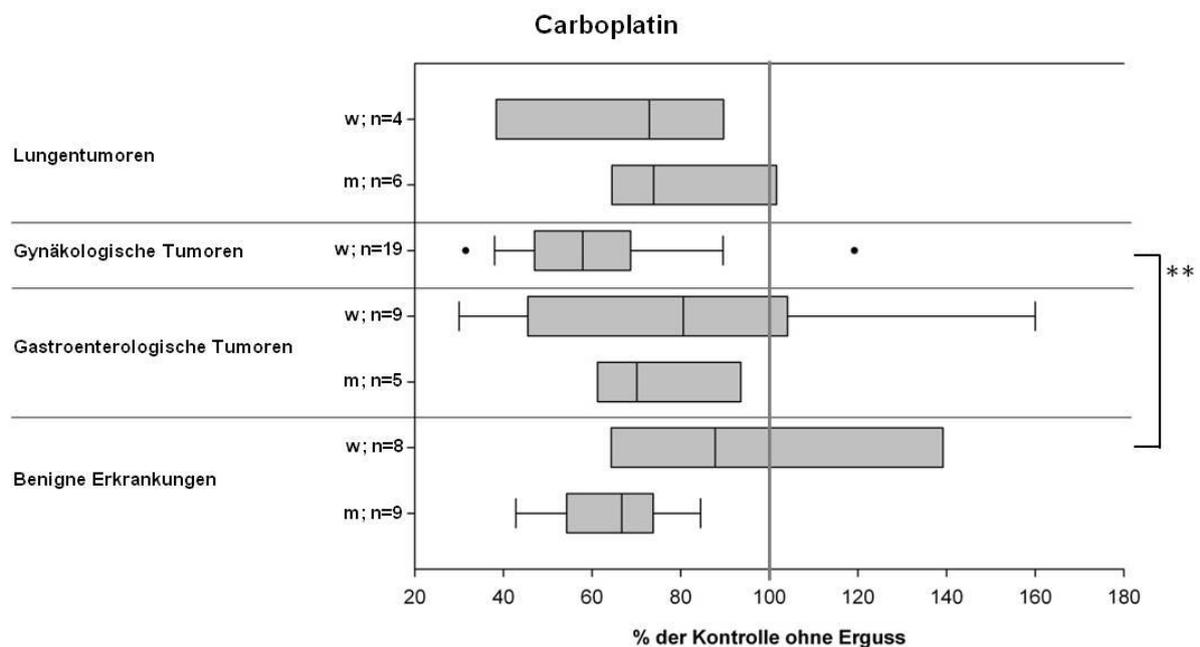


Abbildung 28: Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss beeinflusst das Ansprechen der Zellen auf Carboplatin: THP-1 Zellen wurden mit und ohne 10 % (v/v) Erguss verschiedener Patienten ($n=60$; w: weiblich; m: männlich) sowie Carboplatin (IC_{50}) kultiviert, nach 72 Stunden im Alamar Blue Assay vermessen und die prozentuale Änderung gegenüber der behandelten Kontrolle ohne Erguss (100 %) in Boxplots dargestellt. Klassierung nach Benignität bzw. Tumorentität der Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion sowie Sexus der Patienten; $n=3$ je Erguss, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die signifikante ($p < 0,05$) Reduktion der Zellzahl Doxorubicin behandelter THP-1 Zellen durch eine Supplementierung des Kulturmediums mit benignen Ergüssen männlicher Patienten (66 ± 25 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=9$) gegenüber den Ergüssen gastroenterologischer Tumoren männlicher Patienten (87 ± 10 % d. Kontrolle ohne Erguss, $n=5$) tritt erst durch die Klassierung in Entitätengruppen auf (Abb. 29). Benigne und maligne Ergüsse weiblicher Patientinnen führten tendenziell zu einer reduzierten Zellzahl gegenüber der Kontrolle, ohne signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede im Ausmaß des Effektes zu zeigen.

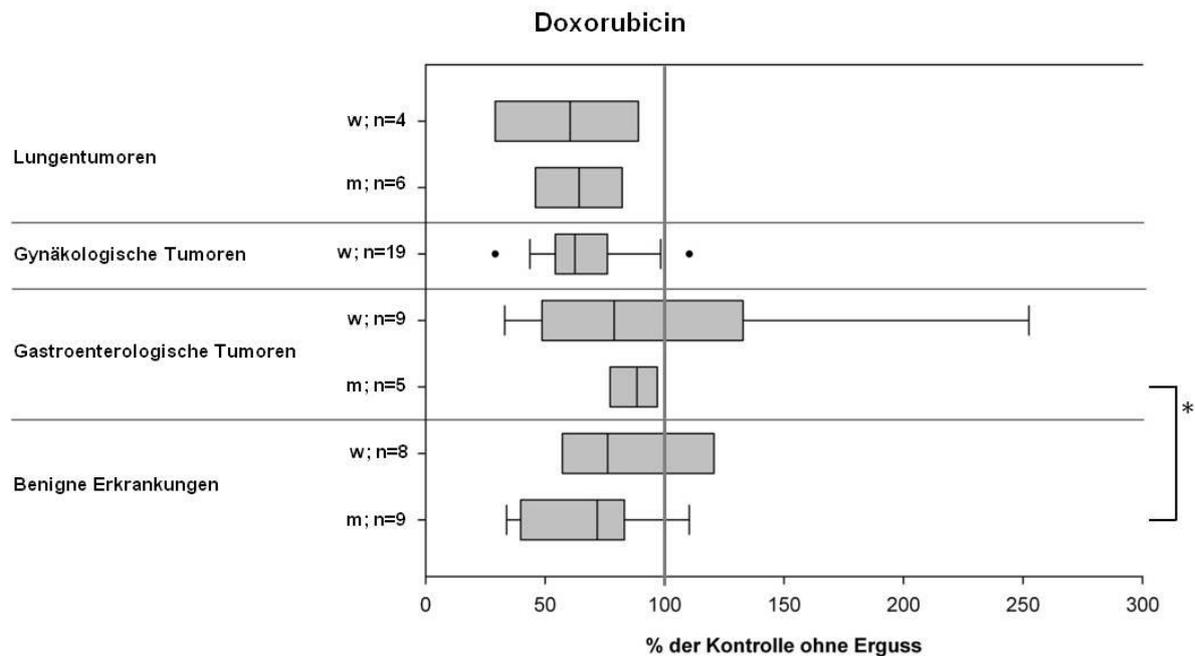


Abbildung 29: Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss beeinflusst das Ansprechen der Zellen auf Doxorubicin: THP-1 Zellen wurden mit und ohne 10 % (v/v) Erguss verschiedener Patienten (n=60; w: weiblich; m: männlich) sowie Doxorubicin (IC_{50}) kultiviert, nach 72 Stunden im Alamar Blue Assay vermessen und die prozentuale Änderung gegenüber der behandelten Kontrolle ohne Erguss (100 %) in Boxplots dargestellt. Klassierung nach Benignität bzw. Tumorentität der Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion sowie Sexus der Patienten; n=3 je Erguss, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Auch nach Klassierung der Ergüsse zeigten alle Klassen tendenziell eine gesenkte Zellzahl gegenüber den ohne Erguss kultivierten THP-1 Zellen, also schienen Ergüsse wachstumsinhibierend zu wirken. Demgegenüber stand ein verglichen mit der unbehandelten Kontrolle teilweise deutlich erhöhtes Zellwachstum durch Supplementierung des Kulturmediums mit Ergüssen von einigen Patientinnen mit gastroenterologischer Tumordiagnose sowie mit Ergüssen weiblicher Patientinnen mit benigner Diagnose (Abb. 26 bis 29). Die Zellen wurden durch Supplementierung des Kulturmediums mit diesen Ergüssen teilweise resistenter gegenüber Carboplatin und Doxorubicin und zeigten ein gesteigertes Zellwachstum. Mehrheitlich resultierte die Supplementierung des Kulturmediums der mit Carboplatin oder Doxorubicin behandelten Zellen jedoch in einer gesenkten Zellzahl gegenüber den ergussfreien Kontrollen.

Zusammenfassend resultierte die Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit Ergüssen verschiedener Genese nach Behandlung mit und ohne Carboplatin oder Doxorubicin in einer im Mittel erniedrigten Zellzahl gegenüber der Kontrolle ohne Erguss, also einem dominierenden Zellwachstum inhibierenden Effekt. Dem gegenüber führten besonders einige Ergüsse weiblicher Patientinnen mit

benigner Diagnose sowie noch deutlicher ausgeprägt Ergüsse von Patientinnen mit gastroenterologischen Tumoren zu einer teilweise deutlich erhöhten Zellzahl THP-1 Zellen nach 72-stündiger Inkubation (Abb. 26 bis 29).

3.2.4.4 Der Einfluss der Ergüsse auf Zellwachstum und Ansprechen auf Carboplatin korreliert mit der enthaltenen FII-Aktivität

Da gezeigt werden konnte, dass eine Supplementierung des Kulturmediums mit Ergüssen zu einer im Mittel gesenkten Zellzahl in unbehandelten sowie mit Carboplatin oder Doxorubicin behandelten THP-1 Zellen gegenüber der ergussfreien Mediumkontrolle führte, sollte als nächstes untersucht werden, ob der beobachtete Effekt der Ergüsse mit den mittels Koagulometrie bestimmten Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren FII und FX korreliert. Dazu wurden die Aktivitäten von FII und FX je Erguss gegen die Zellzahl als Prozent der Kontrolle ohne Erguss aufgetragen, sofern die Daten für die Ergüsse vorlagen. Laut Tabelle 21 liegen für 29 der in Kapitel 3.2.4.3 untersuchten Ergüsse Daten zur FII-Aktivität im Erguss vor. Für FX liegen Daten zu 28 untersuchten Ergüssen vor. Da die FX-Aktivitäten aller Ergüsse an der unteren Nachweisgrenze lagen, entfällt die Korrelation für FX aufgrund mangelnder Unterschiede der FX-Aktivitäten in den einzelnen Ergüssen.

FII Aktivitäten im Erguss oberhalb von ca. 0,3 U/ml korrelierten schwach mit einem gehemmten Zellwachstum (Abb. 30) sowie einem verbesserten Ansprechen der THP-1 Zellen auf Carboplatin (Abb. 31) gegenüber den Kontrollen ohne Erguss (100 %). Das Ansprechen auf Doxorubicin war nicht von der FII-Aktivität im Erguss abhängig (Abb. 32). Unterschiede zwischen benignen und malignen Ergüssen weiblicher Patientinnen konnten hier aufgrund der geringen Fallzahl nicht festgestellt werden.

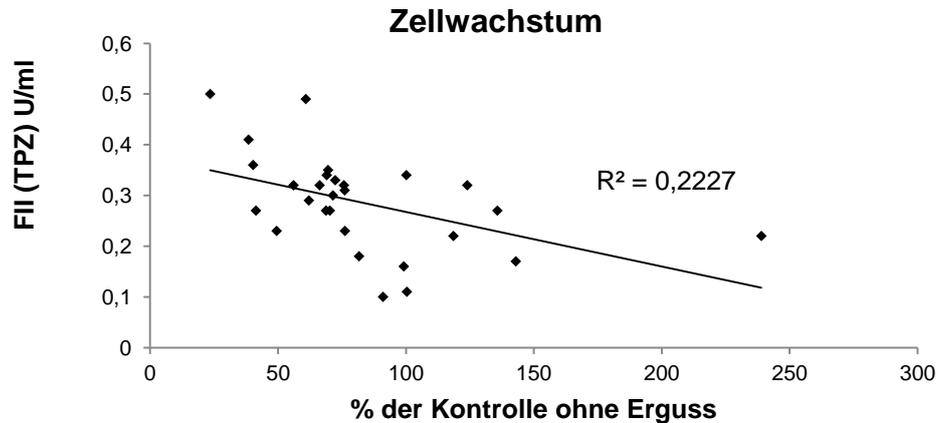


Abbildung 30: Höhere FII-Aktivität im Erguss resultierten tendenziell in einer leichten Hemmung des Zellwachstums von THP-1 Zellen: Das Kulturmedium von unbehandelten THP-1 Zellen wurde mit 10 % (v/v) Erguss supplementiert und der Einfluss auf die Zellzahl nach 72 Stunden gegenüber der Kontrolle ohne Erguss bestimmt (Alamar Blue Assay; n=3; MW ohne SA). Das Ergebnis wurde mit der koagulometrisch ermittelten FII-Aktivität (TPZ; n=3; MW ohne SA) der jeweiligen Ergüsse korreliert.

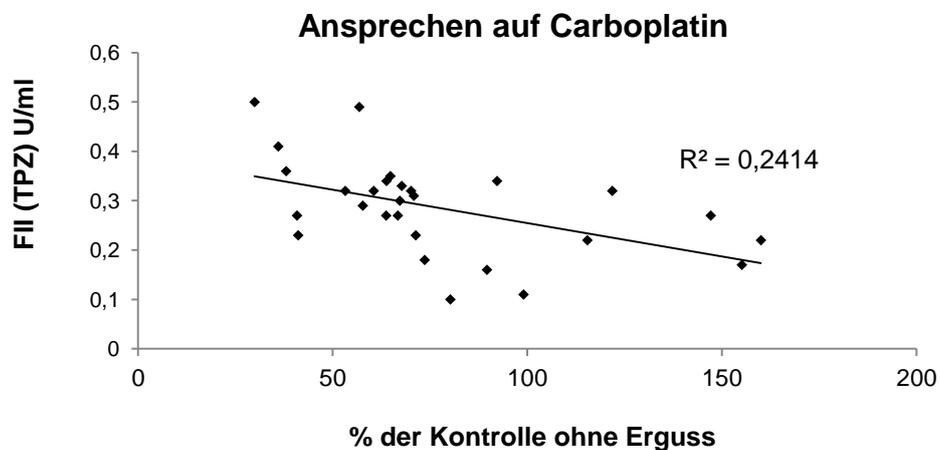


Abbildung 31: Höhere FII-Aktivität im Erguss resultierte tendenziell in einem leicht verbesserten Ansprechen von THP-1 Zellen auf Carboplatin: Das Kulturmedium der mit Carboplatin behandelten THP-1 Zellen wurde mit 10 % (v/v) Erguss supplementiert und der Einfluss auf die Zellzahl nach 72 Stunden gegenüber der Kontrolle ohne Erguss bestimmt (Alamar Blue Assay; n=3; MW ohne SA). Das Ergebnis wurde mit der koagulometrisch ermittelten FII-Aktivität (TPZ; n=3; MW ohne SA) der jeweiligen Ergüsse korreliert.

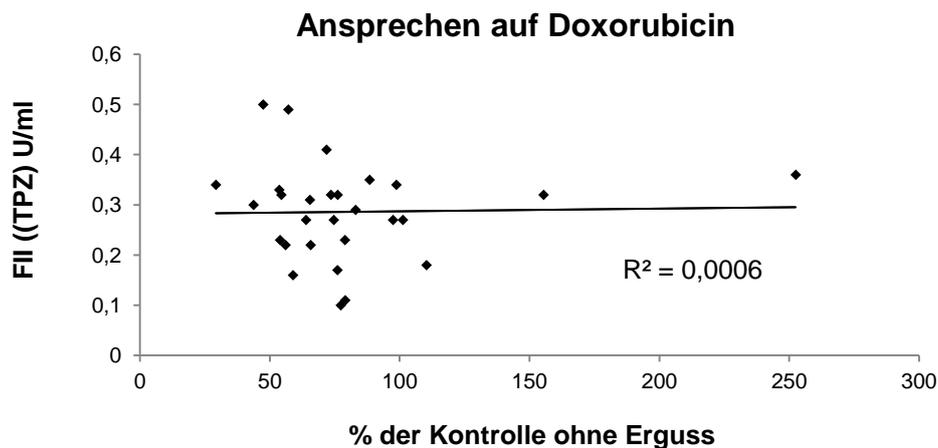


Abbildung 32: Höhere FII-Aktivität im Erguss resultierte nicht in einem veränderten Ansprechen von THP-1 Zellen auf Doxorubicin: Das Kulturmedium der mit Doxorubicin behandelten THP-1 Zellen wurde mit 10 % (v/v) Erguss supplementiert und der Einfluss auf die Zellzahl nach 72 Stunden gegenüber der Kontrolle ohne Erguss bestimmt (Alamar Blue Assay; n=3; MW ohne SA). Das Ergebnis wurde mit der koagulometrisch ermittelten FII-Aktivität (TPZ; n=3; MW ohne SA) der jeweiligen Ergüsse korreliert.

Wenn die Ergüsse einen Einfluss auf das Zellwachstum haben, kann daraus auch ein Einfluss auf das Ansprechen auf Carboplatin und Doxorubicin resultieren, da diese Zytostatika zellzyklusabhängig wirken. Es könnte sich beispielsweise hinter der erniedrigten Zellzahl durch Inkubation Carboplatin behandelter THP-1 Zellen mit Ergüssen weiblicher Patientinnen mit Lungentumoren (Abb. 28) der Einfluss derselben Ergüsse auf das Zellwachstum verbergen (Abb. 27), da sich die Effekte innerhalb der Klasse stark ähneln. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden das Ansprechen der THP-1 Zellen unter Einfluss der Ergüsse auf Carboplatin bzw. Doxorubicin gegen den Einfluss derselben Ergüsse auf das Zellwachstum der THP-1 Zellen aufgetragen und ausgewertet. Die Abbildungen 33 und 34 zeigen tatsächlich eine deutliche Abhängigkeit zwischen dem Ansprechen der THP-1 Zellen auf Zytostatika und den Effekten derselben Ergüsse auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen.

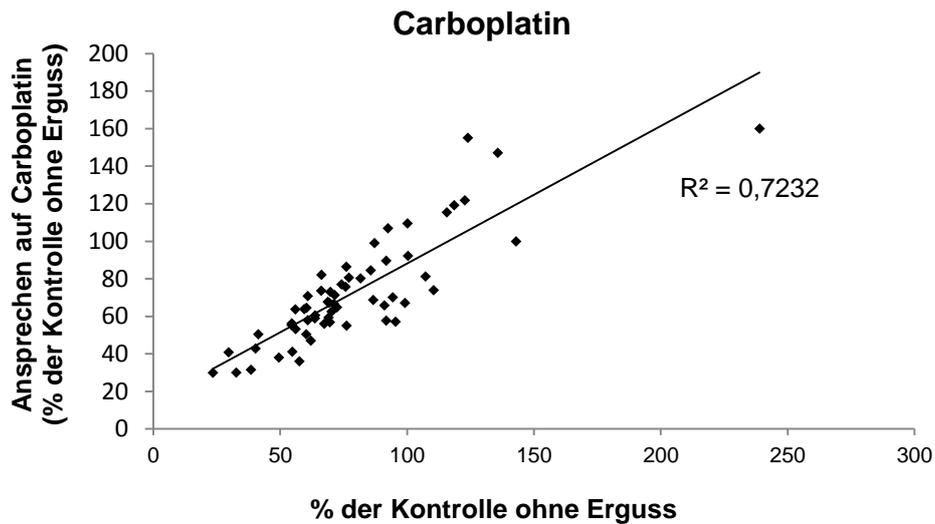


Abbildung 33: Der Einfluss der Ergüsse auf das Ansprechen von THP-1 Zellen auf Carboplatin korreliert mit dem Einfluss auf die Proliferation: THP-1 Zellen wurden mit 10 % (v/v) Erguss und mit und ohne Carboplatin (IC_{50}) inkubiert. Nach 72 Stunden wurden das Zellwachstum und das Ansprechen auf Carboplatin im Alamar Blue Assay bestimmt; $n=3$; MW ohne SA.

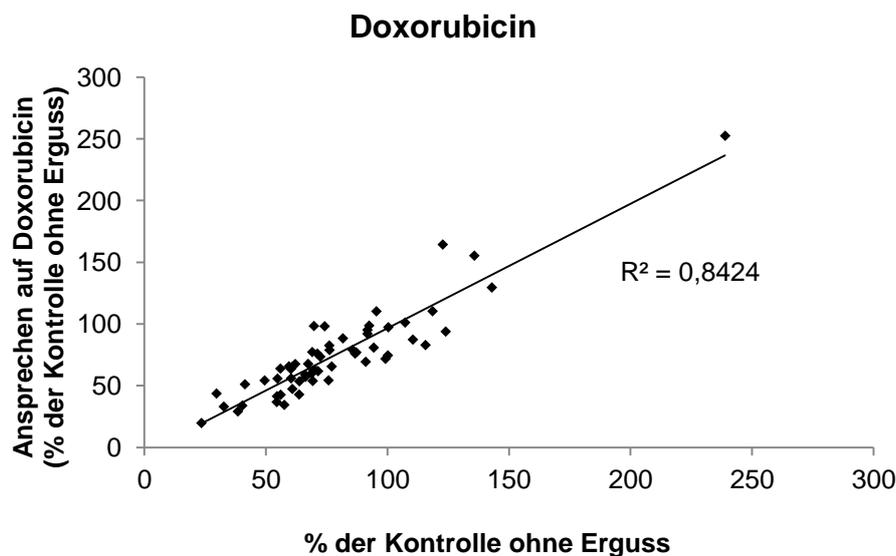


Abbildung 34: Der Einfluss der Ergüsse auf das Ansprechen von THP-1 Zellen auf Doxorubicin korreliert mit dem Einfluss auf die Proliferation: THP-1 Zellen wurden mit 10 % (v/v) Erguss und mit und ohne Doxorubicin (IC_{50}) inkubiert. Nach 72 Stunden wurden das Zellwachstum und das Ansprechen auf Carboplatin im Alamar Blue Assay bestimmt; $n=3$; MW ohne SA.

Zusammenfassend korrelierte der Effekt einer Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit Ergüssen auf das Zellwachstum und das Ansprechen auf Carboplatin negativ mit der FII-Aktivität im Erguss, während das Ansprechen auf Doxorubicin nicht FII-abhängig ist. Der Effekt einer Supplementierung von THP-1 Zellen mit Ergüssen auf das Ansprechen auf Carboplatin und Doxorubicin korreliert darüber hinaus mit dem Einfluss derselben Ergüsse auf das Zellwachstum. Ein Einfluss der Ergüsse auf die Chemosensitivität der THP-1 Zellen unabhängig von der Teilungsrate scheint damit unwahrscheinlich.

3.2.4.5 Einfluss von PAR-Agonisten auf das Zellwachstum und die Chemosensitivität von PANC-1 und THP-1 Zellen

Abbildung 30 und 31 zeigen eine schwache Korrelation zwischen dem hemmenden Effekt oberhalb von 0,3 U/ml FII auf das Zellwachstum bzw. das Ansprechen auf Carboplatin von THP-1 Zellen, deren Kulturmedium mit Ergüssen supplementiert wurde. Um die Kausalität dieses Zusammenhangs zu überprüfen, wurden mittels des Alamar Blue Assays *in-vitro* Studien mit aufgereinigtem FIIa an PANC-1 und THP-1 Zellen durchgeführt. Der Versuchsumfang wurde um FXa und die hexapeptidischen PAR-Agonisten SFLLRN und SLIGKV erweitert. Mit diesen Zelllinien sollte die Fragestellung geklärt werden, ob die Gerinnungsproteasen über eine Aktivierung von PAR-1/2 Rezeptoren das Zellwachstum und/oder die Chemosensitivität der Zellen beeinflussen. Dazu wurden die serumstarvierten Zellen über 72 Stunden unbehandelt belassen oder mit Zytostatikum sowie einem der oben erwähnten Stimulantien inkubiert und gegen eine unstimulierte Kontrolle ausgewertet.

PANC-1 Zellen, die nicht mit Zytostatikum behandelt worden waren, zeigten nach Stimulation mit dem PAR-1 Agonisten SFLLRN und dem PAR-2 Agonisten SLIGKV ein nicht signifikant ($p > 0,05$) teilweise konzentrationsabhängig leicht gehemmtes Zellwachstum (Tab. 29). Mit SFLLRN bzw. SLIGKV behandelte PANC-1 Zellen sprachen tendenziell etwas schlechter auf Doxorubicin an als die Zellen der unbehandelten Kontrolle. Die Werte sind jedoch bis auf zwei signifikante Ergebnisse ebenfalls statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Inkubation von PANC-1 Zellen mit FIIa und FXa blieb sowohl an den unbehandelten sowie an den mit Doxorubicin behandelten Zellen ohne signifikante ($p < 0,05$) oder eindeutige konzentrationsabhängige Effekte.

Die Stimulation von THP-1 Zellen mit steigenden Aktivitäten FIIa, FXa oder SLIGKV führte zu einer nicht signifikant ($p < 0,05$) reduzierten Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle, während die Stimulation mit SFLLRN ohne Effekt auf die THP-1 Zellen blieb. Das Ansprechen der THP-1 Zellen auf Carboplatin und Doxorubicin verschlechterte sich durch Inkubation mit FIIa hochsignifikant ($p < 0,01$) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation mit den PAR-Agonisten SFLLRN und SLIGKV führte ebenfalls zu einem signifikant ($p < 0,05$) verschlechterten Ansprechen auf Doxorubicin, nicht jedoch auf Carboplatin. Eine Stimulation von THP-1 Zellen mit FXa führte zu keiner Änderung des Ansprechens der Zellen auf Doxorubicin oder Carboplatin. Die Effekte von SLIGKV auf das

Ansprechen der THP-1 Zellen auf Carboplatin waren nicht dosisabhängig und schwankten leicht um den Wert der unbehandelten Kontrolle.

Tabelle 29: FIIa hemmte konzentrationsunabhängig das Ansprechen von THP-1 Zellen auf Carboplatin und Doxorubicin; der PAR-1 Agonist SFLLRN zeigte diesen Effekt nur bezüglich Doxorubicin. Alle weiteren Ansätze zeigten keine Konzentrationsabhängigkeit: Zellen wurden mit FIIa, SFLLRN, Faktor Xa, SLIGKV oder Erguss inkubiert und der Einfluss auf das Zellwachstum (Zellw.) sowie das Ansprechen auf Carboplatin (Carbo.) und Doxorubicin (Doxo.) nach 72 Stunden im Alamar Blue Assay bestimmt. Die angegebenen Mittelwerte je Zelllinie und Stimulans beziehen sich auf den unbehandelten (ub) Zellwachstumswert (100 %); - wurde nicht bestimmt; n=3 ± SA; *p < 0,05; **p < 0,01.

		PANC-1			THP-1		
		Zellw.	Carbo.	Doxo.	Zellw.	Carbo.	Doxo.
FIIa U/ml	ub	100±2	-	51±6	100±8	30±3	27±6
	0,1	101±4	-	54±9	-	**48±6	**33±6
	0,5	100±3	-	53±5	97±9	**45±6	**32±6
	1,0	99±5	-	51±1	97±7	**43±6	**32±3
	5,0	101±4	-	51±3	98±6	**42±5	**36±3
	10,0	102±5	-	48±3	94±4	**43±6	27±5
SFLLRN µM	ub	100±3	-	48±4	100±7	77±7	22±6
	0,1	*98±3	-	48±7	106±6	70±7	*26±2
	1,0	98±4	-	49±4	97±3	74±4	*26±5
	10	95±7	-	50±7	100±9	70±4	*27±7
	100	95±5	-	53±6	100±7	73±9	*30±5
FXa U/ml	ub	100±1	-	54±3	100±6	71±2	24±8
	0,1	101±3	-	51±3	-	68±10	22±13
	0,5	104±8	-	53±1	101±4	72±9	25±7
	1,0	98±2	-	51±3	96±5	67±6	24±6
	5,0	102±4	-	54±2	*90±4	74±4	25±5
	10,0	104±4	-	52±4	94±4	*78±3	24±7
SLIGKV µM	ub	100±3	-	49±2	100±8	69±7	21±9
	0,1	98±3	-	48±6	105±5	67±7	23±4
	1	99±5	-	48±4	99±4	68±6	*25±3
	10	101±5	-	51±2	94±6	64±11	*26±3
	100	*93±6	-	52±6	97±7	73±9	*29±3
Erguss 10 % (v/v)	-	-	-	78±33	72±28	75±36	

Bei der Durchführung dieses Versuches fiel auf, dass sich die in Kapitel 3.2.4.2 bestimmte IC₅₀ mit jeder weiteren Passagierung der THP-1 Zellen änderte, so dass

die Kontrollwerte teilweise deutlich vom titrierten 50 % Wert, bezogen auf die zytostatikumfreie Kontrolle, abwichen.

Zusammenfassend zeigten die eingesetzten Stimulantien keinen Einfluss auf das Zellwachstum bzw. das Ansprechen der Zelllinie PANC-1 auf die eingesetzten Zytostatika. In THP-1 Zellen konnte mit FIIa eine deutliche Resistenz gegenüber Carboplatin und Doxorubicin induziert werden, die für Doxorubicin auch durch Stimulation mit den PAR-Agonisten SFLLRN und SLIGKV erzielt wurde. Der hemmende Effekt von FIIa, FXa und SLIGKV auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen ähnelte dem gemittelten Einfluss einer Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit Ergussfluid (vgl. Kap. 3.2.4.3 und 3.2.4.4). Alle weiteren Stimulationen blieben ohne Einfluss auf das Zellwachstum oder das Ansprechen der THP-1 Zellen auf die beiden Zytostatika Carboplatin und Doxorubicin.

Die ausbleibenden Effekte der Stimulation von PANC-1 Zellen mit SLIGKV deckten sich nicht mit der Literatur. Iwaki et al. (2008) konnten nach 48-stündiger Stimulation von serumstarvierten PANC-1 Zellen mit 1-100 μM SLIGKV konzentrationsabhängig eine Proliferationsinduktion im Tetrazolium basierten WST-1 Assays detektieren [281]. Um die im Alamar Blue Assay erhobenen Befunde zu überprüfen und den Einfluss einer Stimulation mit den eingesetzten PAR-Agonisten zu validieren, wurde der ebenfalls Tetrazolium basierte MTS-Assay mit PANC-1 Zellen durchgeführt.

3.2.4.6 Einfluss von PAR-Agonisten auf die Proliferation von PANC-1 Zellen (MTS-Assay)

Der MTS-Assay ähnelt dem Alamar Blue Assay, denn beide Assays messen die Reduktionskapazität viabler Zellen und damit indirekt die Zellzahl. Trotzdem sind sie aufgrund der unterschiedlichen Lokalisierung der Reduktionsprozesse (Tetrazolium wird im endoplasmatischen Retikulum und weniger in den Mitochondrien reduziert; Resazurin wird hauptsächlich durch mitochondriale Reduktasen reduziert) keine Alternativen zueinander, sondern ergänzen die Aussage zum Einfluss der eingesetzten Stimulantien auf das Zellwachstum.

Zunächst wurde das Versuchssystem kalibriert. PANC-1 Zellen wurden in 96 Well Platten ausgesät (0 bis $1,5 \times 10^5$ Zellen/Well, $n=6$), und nach 24, 48 und 72 Stunden Kultivierung mit 10 % (v/v) MTS-Reagenz versetzt. Die Auswertung erfolgte durch Auftragen der Absorption (590 nm) nach 30, 60, 120 und 180 Minuten gegen die Inkubationszeit mit MTS-Reagenz. Für weitere Inkubationen erwies sich eine ausgesäte Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Well und eine Kulturzeit von 48 Stunden aufgrund des linearen Zusammenhangs als geeignet (Abb. 35). Es wurde eine Messung 120 Minuten nach Substratzugabe durchgeführt. Alle weiteren MTS-Experimente wurden unter diesen Bedingungen durchgeführt.

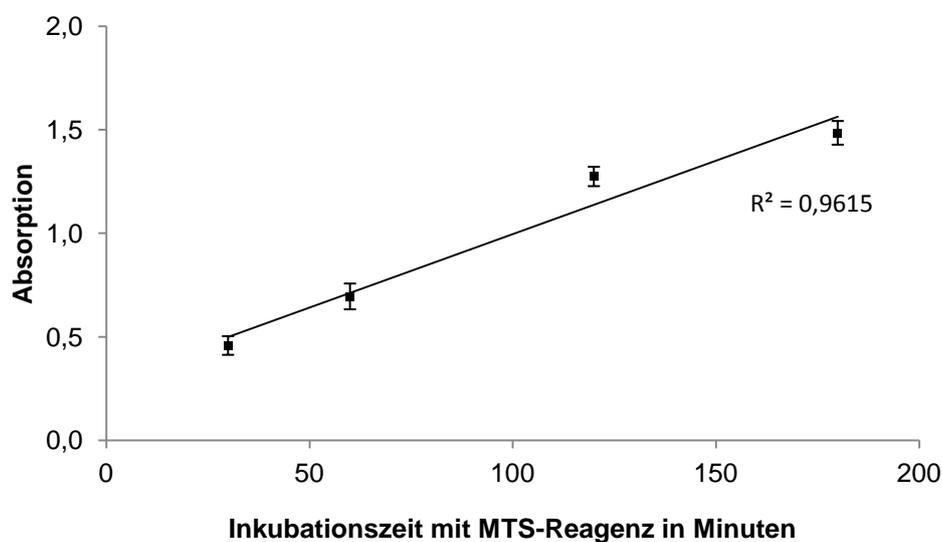


Abbildung 35: Kalibrierung MTS-Assay: Lineare Abhängigkeit der Absorption von der Zellzahl und Inkubationszeit mit Substrat (PANC-1): 1×10^4 PANC-1 Zellen/Well wurden serumstarviert in 96 Well Platten ausgesät und nach 48 Stunden mit 10 % (v/v) MTS-Lösung versetzt. Die Absorption (590 nm) wurde gegen die Inkubationszeit in Minuten aufgetragen; $n=6$; $MW \pm SA$.

Ziel dieses Versuches war die Messung des konzentrationsabhängigen Einflusses einer 48-stündigen Stimulation mit FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV auf serumstarvierte PANC-1 Zellen, um das nicht der Literatur entsprechende Ergebnis des Alamar Blue Assays zu validieren. FIIa und FXa wurden in Aktivitäten von 0,1 bis 1,0 U/ml eingesetzt, wogegen die mit 5 und 10 U/ml unphysiologisch hohen Aktivitäten aus dem Alamar Blue Assay nicht weiter berücksichtigt wurden. Die PAR-Agonisten SFLLRN und SLIGKV wurden im Bereich von 50-300 μM eingesetzt. Zusätzlich wurde als Kontrolle der Proliferationsinhibitor TGF- β 1 (10 ng/ml) eingesetzt. Abbildung 36 zeigt das nach 120-minütiger Substratinkubation ermittelte Ergebnis als Prozent der unbehandelten Kontrolle (ub; 100 %).

Die Stimulation mit 0,5 U/ml FXa resultierte analog dem Ergebnis im Alamar Blue Assay in einer leicht erhöhten Zellzahl von PANC-1 Zellen gegenüber der

unbehandelten Kontrolle. Eine Stimulation mit 300 μM SLIGKV bzw. 10 ng/ml TGF- β 1 führte hingegen zu einer signifikant ($p < 0,05$) um 20 % gesenkten Zellzahl, während niedrigere Konzentrationen an SLIGKV ohne Einfluss blieben. In allen weiteren Ansätzen konnte kein signifikanter ($p > 0,05$) Einfluss der Stimulantien auf die Zellzahl beobachtet werden.

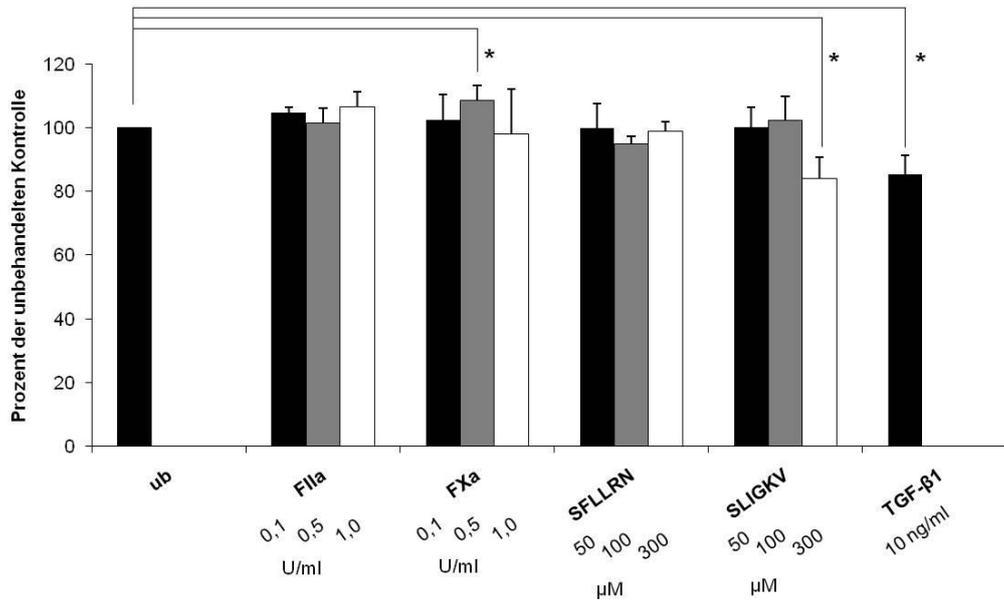


Abbildung 36: SLIGKV und TGF- β 1 wirkten proliferationshemmend, FXa leicht stimulierend auf PANC-1 Zellen. Serumstarvierte PANC-1 Zellen wurden mit FIIa, FXa, SLIGKV, SFLLRN oder TGF- β 1 für 48 Stunden stimuliert und die ermittelten Effekte auf die Proliferation gegen eine unbehandelte Kontrolle (ub; 100 %) aufgetragen; $n=6$; $MW \pm SA$; $*p < 0,05$.

Die von Iwaki et al. (2008) publizierte Proliferationssteigerung von PANC-1 Zellen durch Stimulation mit 100 μM PAR-2 Agonist SLIGKV konnte folglich nicht bestätigt werden. Dagegen führte eine Stimulation von PANC-1 Zellen mit 300 μM SLIGKV bzw. 10 ng/ml TGF- β 1 zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl. Alle weiteren PAR-Agonisten führten zu einem Ergebnis, das dem des Alamar Blue Assays ähnlich war.

3.2.4.7 Lepirudin und Rivaroxaban haben keinen Einfluss auf den proliferationsmodulierenden Effekt von Ergüssen auf PANC-1 Zellen

Als nächstes sollte der Einfluss einer Supplementierung des Kulturmediums mit 10 % (v/v) Erguss auf das Zellwachstum von PANC-1 Zellen mittels MTS-Assay bestimmt werden, um zu überprüfen, ob mögliche proliferationsmodulierende Effekte durch FIIa- oder FXa-Inhibitoren aufgehoben werden können. Daher wurden 10 noch ausreichend verfügbare Ergüsse ausgewählt, die jedoch keine Gegenüberstellung von Stichproben unterschiedlicher Merkmale erlaubten (vgl. Tab. 21). Die serumstarvierten Zellen wurden über 48 Stunden in Kulturmedium supplementiert mit

10 % (v/v) Erguss inkubiert und nach 120-minütiger Substratinkubation die Absorption gemessen. Alle Ansätze wurden ohne und mit 32 ATU Lepirudin oder 0,5 μ M Rivaroxaban je 6-fach inkubiert und gegen die Lösemittelkontrolle der Inhibitoren (entspricht 100 %; Lepirudin: Wasser; Rivaroxaban: DMSO) aufgetragen, um den Anteil von FIIa und FXa am Effekt der Ergüsse quantifizieren zu können.

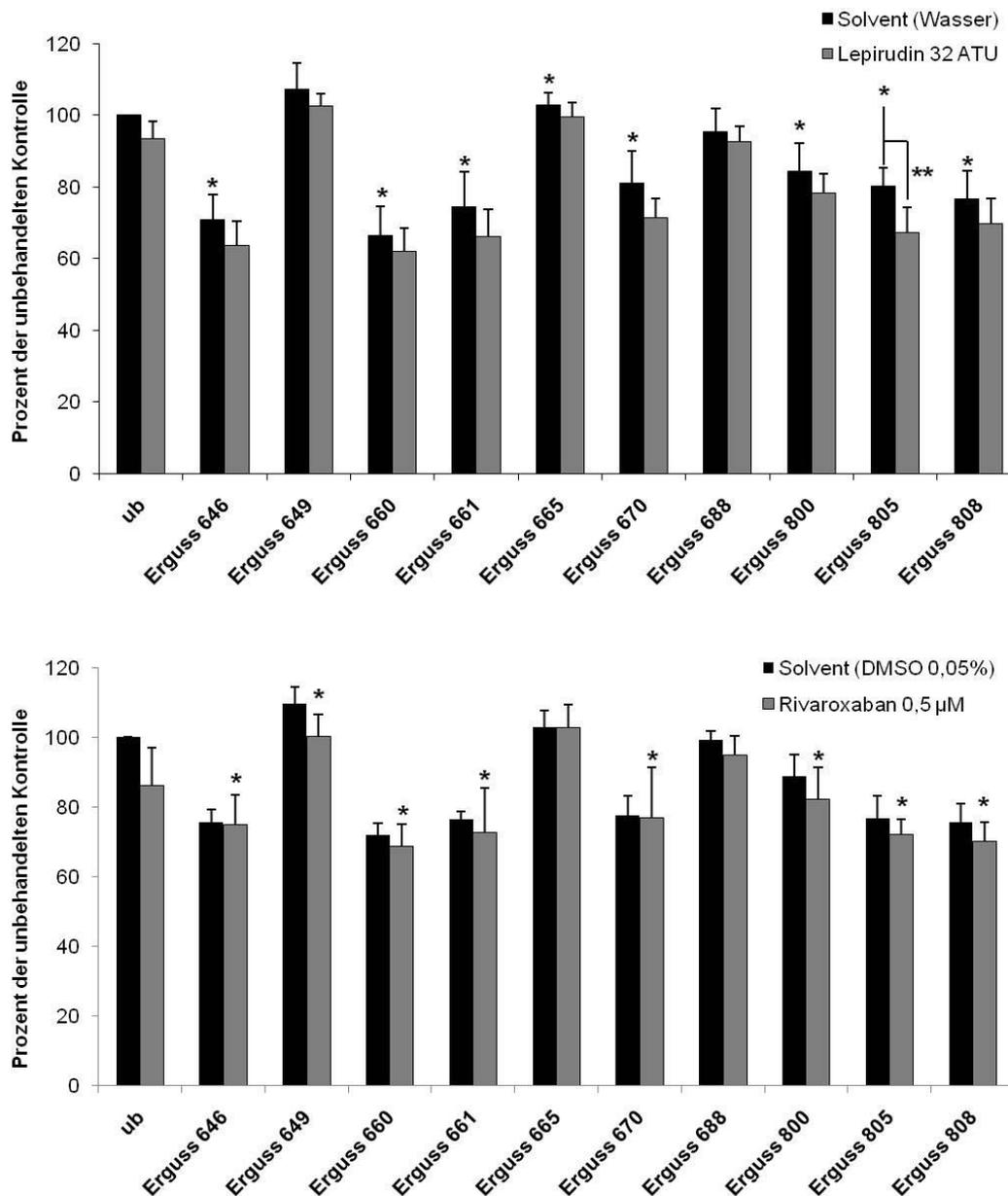


Abbildung 37: Die Supplementierung von Kulturmedium mit 10 % (v/v) Erguss führte in PANC-1 Zellen tendenziell zu einer verringerten Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle (ub); 32 ATU Lepirudin (oben) führten nur bei Erguss 805 zu einer weiteren Abnahme der Zellzahl, während 0,5 μ M Rivaroxaban (unten) keinen Einfluss auf den Effekt der Ergüsse hatte. Serumstarvierte PANC-1 Zellen wurden mit 10 % (v/v) Erguss verschiedener Patienten (Erguss Nr.) stimuliert sowie ohne (Solvent) oder mit 32 ATU/ml Lepirudin oder 0,5 μ M Rivaroxaban inkubiert (48 Stunden) und die mittels MTS-Assay gemessenen Effekte auf das Zellwachstum gegen eine unbehandelte Kontrolle (ub; 100 %) aufgetragen; n=4; MW \pm SA; *p < 0,05; **p < 0,01).

Die Supplementierung des Kulturmediums von serumstarvierten PANC-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss verschiedener Patienten resultierte im Mittel in einer signifikant ($p < 0,05$) gesenkten Zellzahl (84 ± 14 %) im Vergleich zur Kontrolle ohne Erguss (ub; 100%; vgl. Abb. 37) und ähnelte damit den Ergebnissen an THP-1 Zellen (vgl. Tab. 28). Die Co-Inkubation mit 32 ATU/ml Lepirudin oder 0,5 μ M Rivaroxaban hatte dabei jedoch keinen signifikanten Einfluss auf den modulierenden Effekt der einzelnen Ergüsse. Nur Erguss 805 zeigte nach Behandlung mit 32 ATU Lepirudin eine hochsignifikante ($p < 0,01$) Reduktion der Zellzahl um weitere 10 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Zusammenfassend konnte eine gegenüber ergussfreien Kontrolle im Mittel um 15 % verminderte Zellzahl von PANC-1 Zellen nach Kultur mit 10 % (v/v) Erguss beobachtet werden. FIIa und FXa schienen jedoch nicht die Ursache dieser Inhibition des Zellwachstums zu sein, was sich mit den Beobachtungen an PANC-1 Zellen unter Stimulation mit FIIa oder FXa im MTS-Assay sowie im Alamar Blue Assay deckt. Als nächstes sollte der Einfluss der Ergüsse sowie von Gerinnungsfaktoren auf die EMT und das Migrationsverhalten von epithelialen Zellen untersucht werden. Zuvor wurde die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 durch die eingesetzten Stimulantien anhand einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2 im Western-Blot überprüft.

3.2.5 FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV aktivieren PAR-1/2 Rezeptoren

Um die Aktivierung der PAR-1/2 Rezeptoren durch die eingesetzten Agonisten zu überprüfen, wurden serumstarvierte HPDE und PANC-1 Zellen für 15 Minuten mit FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV stimuliert, Ganzzelllysate gewonnen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot die Phosphorylierung (Aktivierung) der PAR-assoziierten MAP-Kinasen ERK1/2 quantifiziert. Der niedermolekulare Inhibitor PD98056 hemmt die Aktivierung von ERK1/2 und wurde als Kontrolle eingesetzt.

Abbildung 38 zeigt für HPDE und PANC-1 Zellen eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2 gegenüber der unbehandelten Kontrolle nach PAR-Aktivierung durch FIIa, FXa sowie die hexapeptidischen PAR-Agonisten SFLLRN und SLIGKV. Die Aktivierung konnte durch 30-minütige Vorinkubation mit dem ERK1/2-Inhibitor PD98056 gehemmt werden wobei die Gesamtmenge an ERK1/2 konstant blieb. Der

Proteingehalt je Probe war laut der Ladekontrolle HSP 90 in allen Ansätzen je Zelllinie gleich.

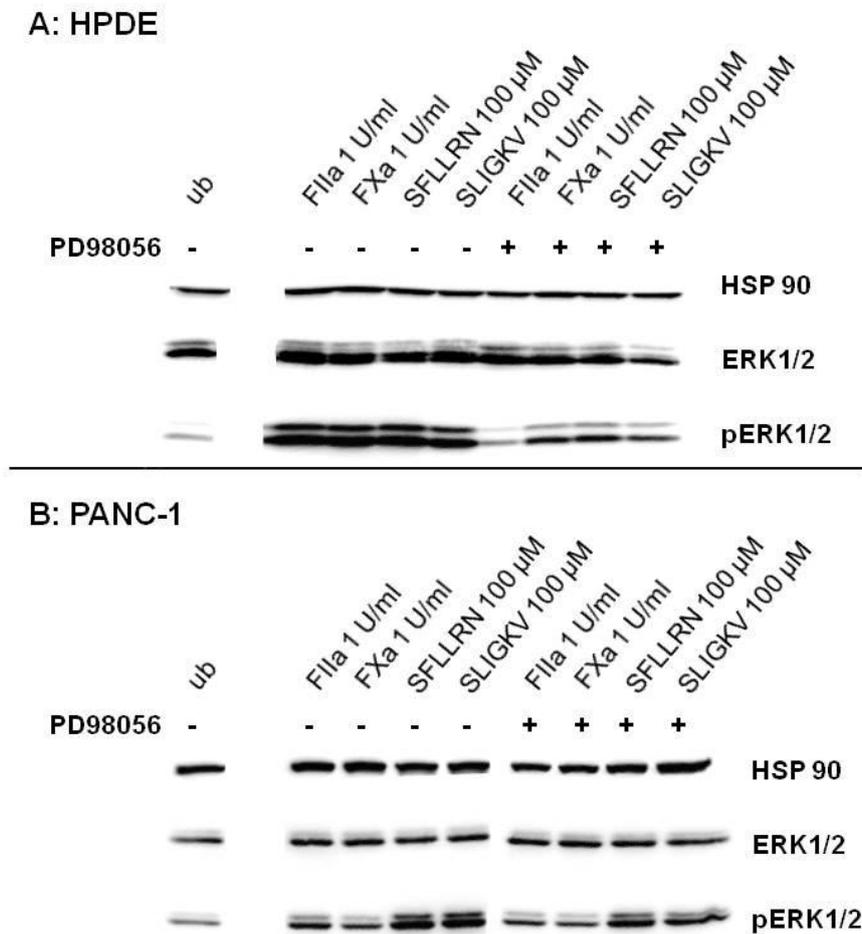


Abbildung 38: Die PAR-Agonisten FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV führten zu einer Phosphorylierung (Aktivierung) von ERK: Exemplarischer Western-Blot der ERK1/2-Aktivierung in serumstarvierten HPDE (A) und PANC-1 (B) Zellen nach 15 Minuten Stimulation mit verschiedenen PAR-Agonisten. Die ERK-Aktivierung ist durch 30-minütige Vorbehandlung mit dem ERK-Inhibitor PD98056 hemmbar.

Zusammenfassend zeigte dieser Versuch eine Aktivierung der PAR-1/2 Rezeptoren in HPDE und PANC-1 Zellen durch Stimulation mit den PAR-Agonisten FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV im Bereich der in der Literatur verwendeten Konzentrationen bzw. Aktivitäten anhand einer ERK1/2 Phosphorylierung [168, 177, 178, 185, 219, 282, 283].

3.2.6 Stimulation von PANC-1 Zellen mit PAR-Agonisten induziert eine spindelförmige Morphologie und ein verändertes Migrationsverhalten

Die EMT ist ein wichtiger Promotor der Tumorigenese epithelialer Zellen. Epitheliale Zellen zeigen mikroskopisch eine prismatische Morphologie, die im Rahmen der EMT in eine spindelförmige, fibroblastoide Morphologie von mesenchymalen Zellen

übergeht, was ein Charakteristikum von vielen hoch-malignen Tumorzellen darstellt. Daher bietet sich für die Untersuchung des Einflusses von Gerinnungsfaktoren auf EMT-assoziierten Veränderungen in Zelllinien der Vergleich zwischen der nicht tumorigenen, epithelialen, prä-EMT Zelllinie HPDE mit der Tumorzelllinie PANC-1 an, die bereits deutliche mesenchymale Charakteristika aufweist, welche jedoch durch den bekannten EMT-Induktor TGF- β 1 noch verstärkt werden können [284-286]. Laut Literatur können PAR-1/2 Agonisten wie FIIa, FXa, SFLLRN oder SLIGKV die Migrationsfähigkeit in einigen Zelllinien hemmen aber auch induzieren. Ziel dieses Versuchs war also die Überprüfung, ob und welchen Effekt PAR-Agonisten auf die Morphologie und das Migrationsverhalten von PANC-1 Zellen haben.

Dazu wurden PANC-1 Zellen im sogenannten „Wundheilungs-Assay“ untersucht, einem zweidimensionalen Migrations-Assay, der neben dem Einfluss der Stimulantien auf das Migrationsverhalten die gleichzeitige Beurteilung der Zellmorphologie erlaubte. Die Zellen wurden in die beiden Kavitäten eines Petrischalen-Zellkultureinsatzes aus Silikon ausgesät und serumstarviert. Nach erreichter Konfluenz wurde der Einsatz entfernt, wodurch ein 0,5 mm breiter, reproduzierbarer, zellfreier Spalt entstand. Zeitabhängig können Zellen 1. durch Proliferation (runde, prismatische Zellen, die im Zellverband liegen) oder 2. durch Migration (einzelne, spindelförmige Zellen) in den zellfreien Spalt eindringen, und dort mikroskopisch beobachtet werden. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend hinsichtlich der Proliferationsfront, Zellmorphologie und migrierter Zellen ausgewertet.

Abbildung 39 zeigt nach Inkubation der PANC-1 Zellen mit 10 % (v/v) FCS, was den normalen Kulturbedingungen der Zellen entsprach und als Kontrolle diente, eine geschlossene Proliferationsfront primatischer Zellen im Zellverband (Foto 1, Pfeil), die den ehemals zellfreien Spalt weitgehend bedeckten. Dagegen führte die Serumstarvierung (ub, Foto 2, Pfeil) zu einer gegenüber Foto 1 verlangsamten Proliferation, einhergehend mit einer aufgelockerten Proliferationsfront, aus der einzelne, spindelförmige Zellen sichtbar hinaus migriert waren. Der Großteil des Spaltes blieb jedoch weiterhin zellfrei. Die Supplementierung der serumstarvierten Ansätze mit 1 U/ml FIIa (Foto 3), 1 U/ml FXa (Foto 4), 100 μ M SFLLRN (Foto 5), 100 μ M SLIGKV (Foto 6) oder 10 % (v/v) Erguss 860 führte zu größeren zellfreien Arealen und einer verstärkten Migration sowie deutlicher ausgeprägten morphologischen Änderungen hin zur Spindelform der überwiegend vereinzelt

liegenden Zellen (Pfeile). Die Supplementierung der Zellen mit 10 ng/ml des als Positivkontrolle eingesetzten EMT-Induktors TGF- β 1 induzierte gegenüber den anderen Ansätzen die am stärksten ausgeprägte spindelförmige bis fädig ausgezogene Morphologie der Zellen, die mit der größten Anzahl migrierter Zellen auf dem Foto sowie einer scharfen, an den Bildrändern zurückgebliebenen Proliferationsfront einherging.

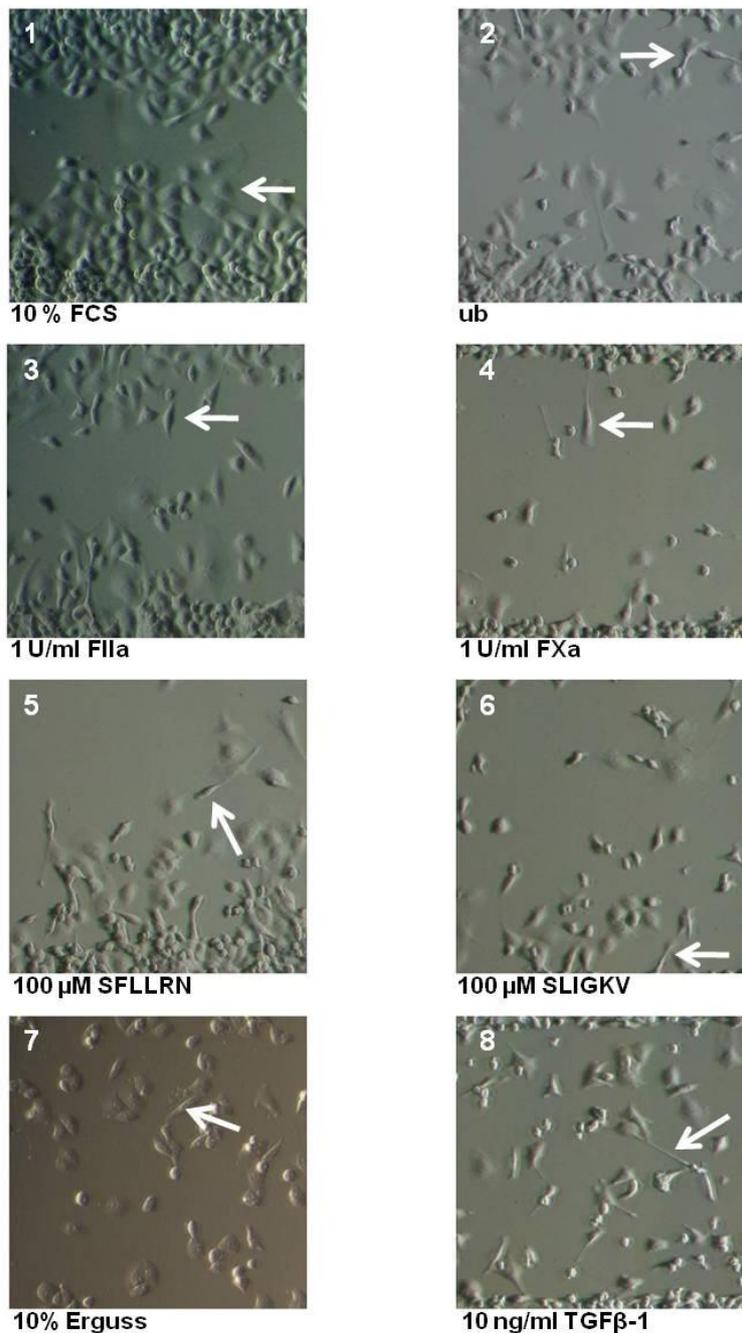


Abbildung 39: Serumstarvierung sowie zusätzliche Stimulation von PANC-1 Zellen mit FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV, Erguss oder TGF- β 1 führte zu zunehmender spindelförmiger Zellmorphologie sowie erhöhter Zellmigration einzelner Zellen. PANC-1 Zellen wurden serumstarviert (0,5 % (v/v) FCS) ohne (2) oder mit 10 % (v/v) FCS (1), 1 U/ml FIIa (3), 1 U/ml FXa (4), 100 μ M SFLLRN (5), 100 μ M SLIGKV (6), 10 % (v/v) Erguss 670 oder 10 ng/ml TGF- β 1 (8) bis zur Konfluenz kultiviert, und konnten weitere 24 Stunden lang in einen zellfreien Spalt einwandern. Exemplarische Abbildungen der Mikroskopie mit 20-facher Vergrößerung.

Die Stimulation von PANC-1 Zellen mit den PAR-Agonisten führte zu einer deutlich spindelförmigen Morphologie. Da eine exakte Quantifizierung der Zellen in diesem Test schwierig war, wurde als weitere Messmethode zur Quantifizierung der Zellmigration ein Transwell-Migrationsassay durchgeführt.

3.2.7 Erhöhte Migrationsfähigkeit von HPDE und PANC-1 Zellen durch Stimulation mit PAR-Agonisten

Ziel dieses Versuches war die Quantifizierung des in Kapitel 3.2.6 beobachteten Einflusses der verwendeten PAR-Agonisten auf das Migrationsverhalten von HPDE und PANC-1 Zellen im Transwell-Migrationsassay. Dazu wurden PANC-1 Zellen 24 Stunden lang serumstarviert und anschließend in Kollagen I-beschichteten Transwell-Einsätzen mit 8 μm Porengröße ausgesät und stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit Kristallviolett angefärbt und die migrierten Zellen gegenüber der Gesamtzellzahl im Ansatz als Migrationsrate bestimmt (Abb. 40). HPDE Zellen wurden abweichend davon 48 Stunden serumstarviert sowie bereits 24 Stunden vor der Aussaat in Transwell-Einsätze mit den entsprechenden Stimulantien (FIIa, FXa, SLLRN, SLIGKV, Erguss 660, 670 und 688) vorstimuliert. Als Positivkontrolle dienten Ansätze, die mit TGF- β 1, einem bekannten Induktor der Zellmigration von epithelialen Zellen, behandelt worden waren [287].

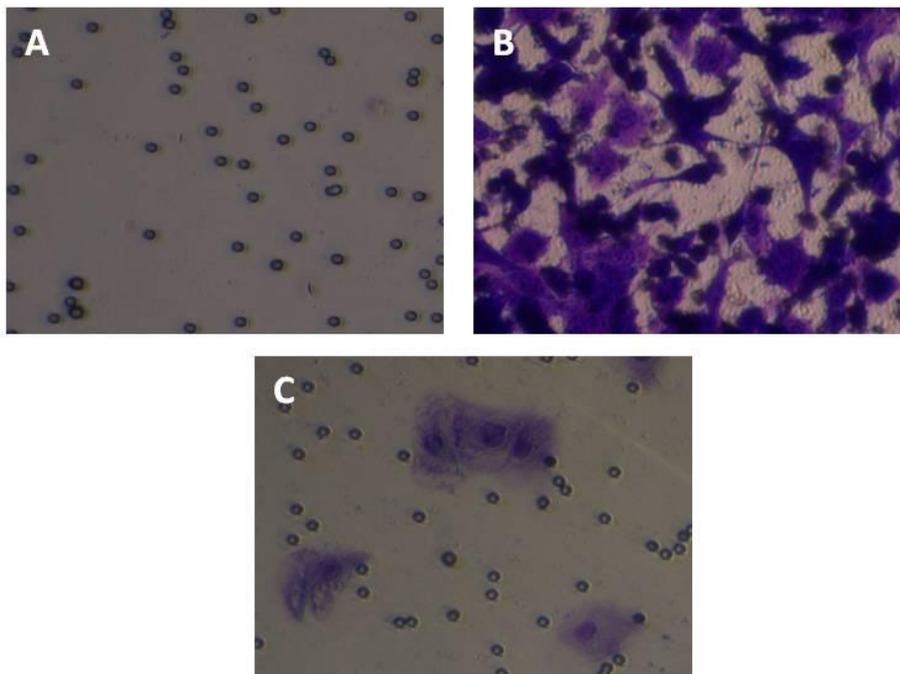


Abbildung 40: Exemplarische Aufsicht auf die PET-Membran der Transwell-Einsätze. A: Die 8 μm großen Poren in der Membran ohne Zellen. B: Mit Kristallviolett gefärbter Kontrollansatz mit migrierten und nicht migrierten PANC-1 Zellen. C: Migrierte PANC-1 Zellen sind nach Entfernung der nicht migrierten Zellen und Anfärben mit Kristallviolett an der Unterseite der Membran sichtbar.

HPDE Zellen zeigten ein signifikant ($p < 0,05$) gesteigertes Migrationsverhalten sowohl durch Stimulation mit 100 μM SFLLRN als auch 100 μM SLIGKV, welches im Ausmaß vergleichbar war mit der durch 10 ng/ml TGF- β 1 induzierten Migration (Abb. 41). Dieser Effekt konnte ebenfalls durch 10 % (v/v) Erguss 670 erzielt werden. FIIa, FXa sowie die Ergüsse 660 und 688 konnten hingegen keine signifikante ($p < 0,05$) Veränderung der Migrationsrate gegenüber unbehandelten Zellen herbeiführen.

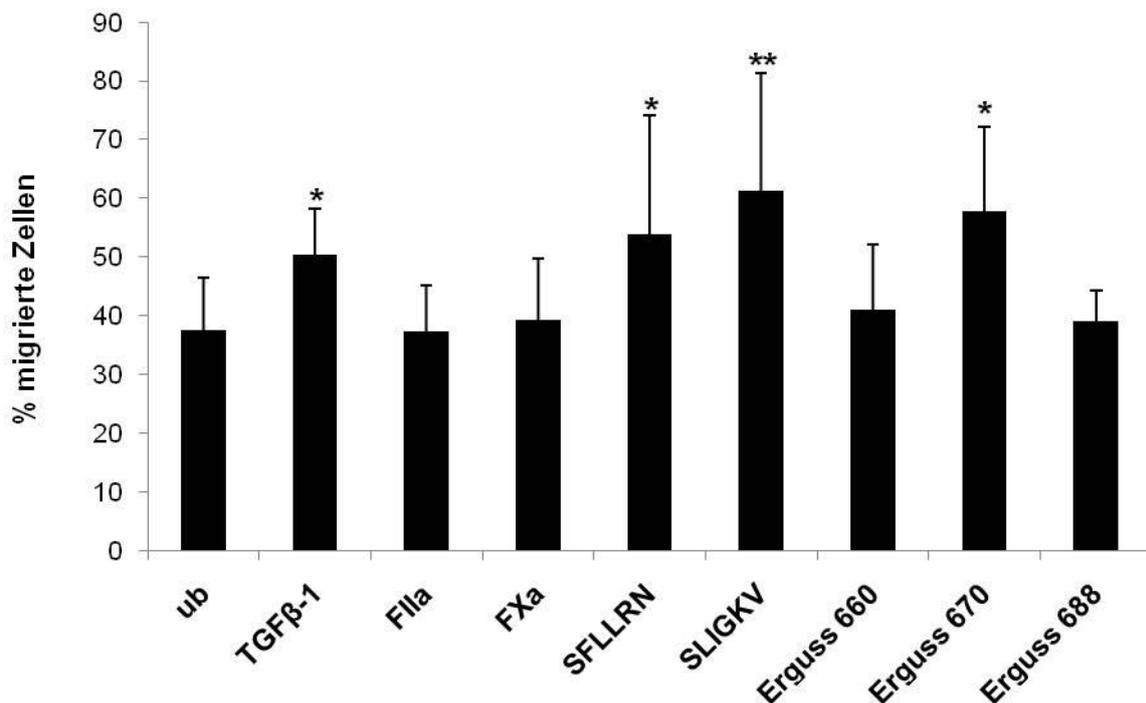
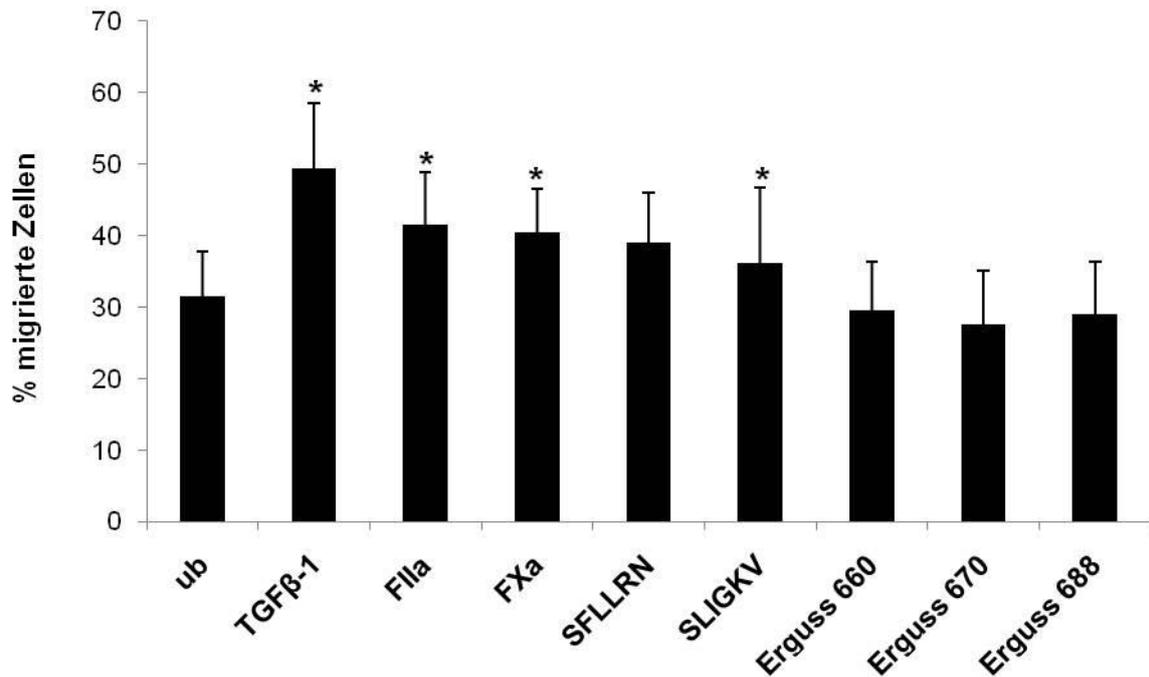


Abbildung 41: SFLLRN, SLIGKV und Erguss 670 führten in HPDE Zellen zu einer signifikant erhöhten Migrationsrate im Transwell-Migrationsassay: Serumstarvierte HPDE Zellen wurden ohne (ub) oder mit 10 ng/ml TGF- β 1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μM SFLLRN, 100 μM SLIGKV, 10 % (v/v) Erguss 660, 670 oder 688 vorstimuliert. Die Balken zeigen den Anteil migrierter Zellen nach 24-stündiger Stimulation im Transwell-Assay und photometrischer Auswertung nach Färbung mit Kristallviolett; $n=6$; $MW \pm SA$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

PANC-1 Zellen zeigten nach Stimulation mit je 1 U/ml FIIa oder FXa sowie 100 μM SLIGKV ein im Ausmaß zwar nicht mit TGF- β 1 vergleichbares, aber dennoch signifikant ($p < 0,05$) gesteigertes Migrationsverhalten gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 42). Dieser Effekt konnte mit SFLLRN und SLIGKV vergleichbar erzielt werden, war jedoch nur nach Stimulation mit SLIGKV statistisch signifikant. Die Ergüsse 660, 670 und 688 hatten hingegen keinen Einfluss auf die Migrationsfähigkeit der PANC-1 Zellen.



*Abbildung 42: FIIa, FXa und SLIGKV führten in PANC-1 Zellen zu einer signifikant erhöhten Migrationsrate: Serumstarvierte PANC-1 Zellen wurden ohne (ub) oder mit 10 ng/ml TGF-β1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μM SFLLRN, 100 μM SLIGKV, 10 % (v/v) Erguss 660, 670 oder 688 im Transwell-Assay inkubiert. Die Balken zeigen den Anteil migrierter Zellen nach 24-stündiger Stimulation und photometrischer Auswertung nach Färbung mit Kristallviolett; n=6; MW ± SA; *p < 0,05.*

In diesem Versuch konnten induzierende Effekte von PAR-Agonisten und Ergüssen auf die Migration von nicht-tumorigenen Epithelzellen sowie Tumorzellen beobachtet werden. Als nächstes sollte untersucht werden, ob diesem gesteigerten Migrationsvermögen EMT-assoziierte Veränderungen zugrunde lagen. Dazu wurden zunächst transkriptionelle Veränderungen von EMT-assoziierten Proteinen nach Stimulation mit PAR-Agonisten untersucht.

3.2.8 PAR-Agonisten beeinflussen die Expression von EMT-assoziierten Markerproteinen in HPDE und PANC-1 Zellen nicht

Eine erhöhte Migrationsfähigkeit von HPDE und PANC-1 Zellen durch TGF-β1 wird einer reduzierten Expression epithelialer Markerproteine (E-Cadherin) zugunsten einer Induktion mesenchymaler Markerproteine (N-Cadherin, Vimentin) sowie der Transkriptionsfaktoren Slug und Snail zugeschrieben [94, 288]. Darüber hinaus konnte in diesen Zellen eine erhöhte Migrationsfähigkeit der TGF-β1 induzierten Expression des Adhäsionsmoleküls L1CAM zugeordnet werden [287]. Zur Messung des Einflusses einer PAR-Aktivierung auf die Expression der EMT-assoziierten

Markerproteine E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, Slug, Snail sowie L1CAM wurde eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression der jeweiligen Gene herangezogen. Dazu wurden serumstarvierte HPDE und PANC-1 Zellen ohne oder mit 10 ng/ml TGF- β 1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μ M SFLLRN oder 100 μ M SLIGKV inkubiert, nach 24, 48 und 72 Stunden die RNA aus den lysierten Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression der betreffenden Gene mittels Realtime-PCR quantifiziert. Zur Auswertung wurden die gemessenen PCR-Zyklen bis zum Erreichen eines Schwellenwertes in der exponentiellen Phase auf das Haushaltsgen TBP bezogen und auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert.

Der bekannte EMT-Induktor TGF- β 1 hatte gegenüber unbehandelten (ub) HPDE Zellen keinen signifikanten ($p < 0,05$) Einfluss auf die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin (Abb. 43 A), wogegen die mesenchymalen Marker Vimentin (Abb. 43 B), N-Cadherin (Abb. 43 C) sowie L1CAM (Abb. 44 A) und die EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Slug (Abb. 44 B) und Snail (Abb. 44 C) deutlich induziert wurden. Jedoch war nur die Induktion von L1CAM, Slug und Snail statistisch signifikant ($p < 0,05$), da die gemittelten Daten aus drei separaten Ansätzen generell sehr stark streuten. Die PAR-Agonisten hatten gegenüber den unbehandelten HPDE Zellen im wesentlichen keinen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin (Abb. 43 A), Vimentin (Abb. 43 B), N-Cadherin (Abb. 43 C), L1CAM (Abb. 44 A), Slug (Abb. 44 B) und Snail (Abb. 44 C), jedoch waren einige signifikante Einzelergebnisse zu beobachten: FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV zeigten nach einer anfänglichen Reduktion eine tendenziell über 72 Stunden zunehmende Expression von N-Cadherin (Abb. 43 C), die im Ausmaß um die Expression unbehandelter HPDE Zellen schwankte. Die zeitliche Kinetik ähnelte dem Effekt einer Stimulation mit TGF- β 1. SFLLRN (48 Stunden) und SLIGKV (48 und 72 Stunden) führten zeitabhängig zu einer signifikant ($p < 0,05$) leicht gesteigerten Expression von Vimentin (Abb. 43 B).

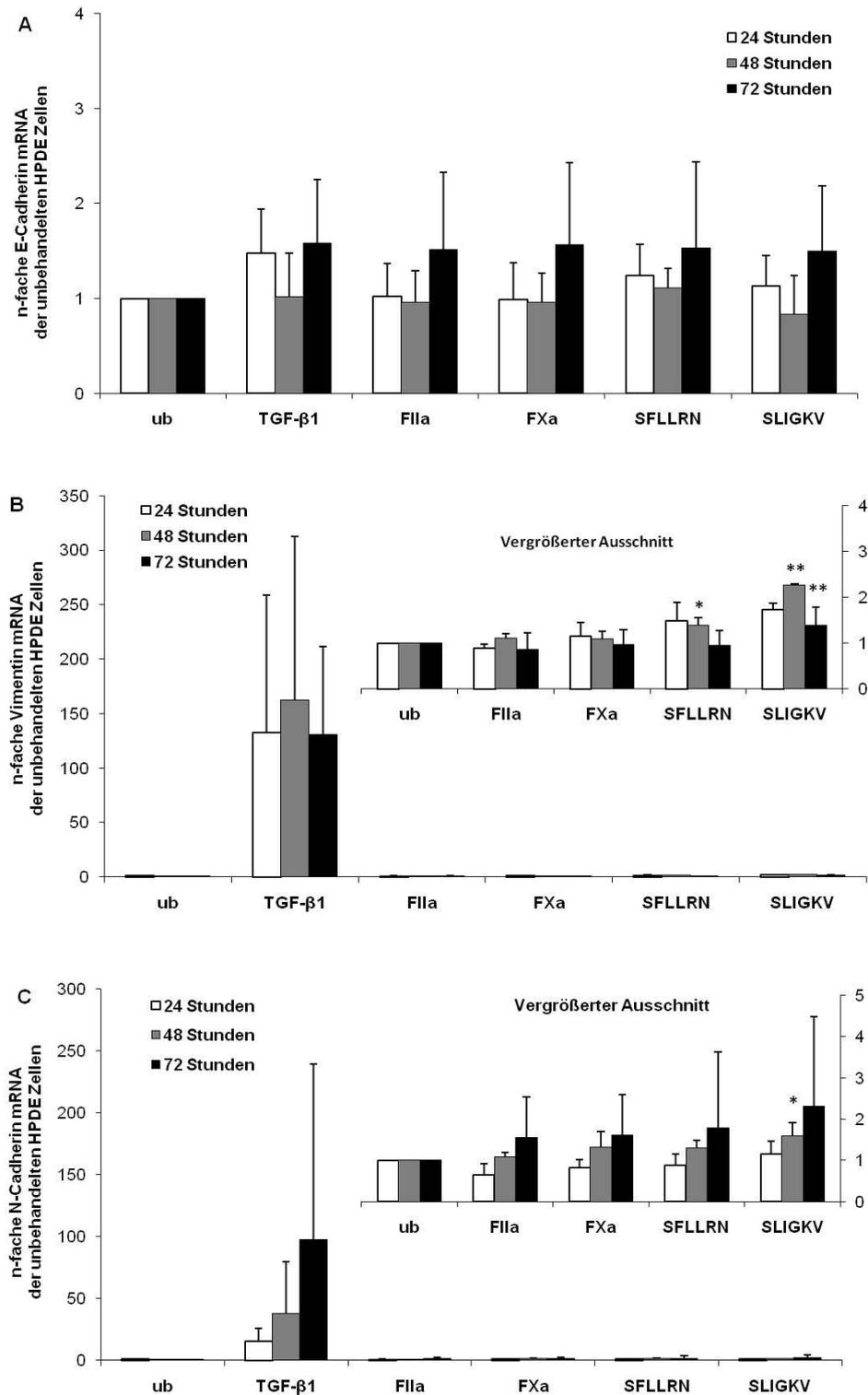


Abbildung 43: Die Stimulation mit TGF-β1 und PAR-Agonisten blieb weitgehend ohne Einfluss auf die Expression von E-Cadherin in HPDE Zellen (A). TGF-β1 induzierte die Expression der mesenchymalen Markerproteins Vimentin (B) und N-Cadherin (C) in HPDE Zellen, wogegen PAR-Agonisten weitgehend ohne Einfluss blieben: HPDE Zellen wurden ohne (ub) oder mit 10 ng/ml TGF-β1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μM SFLLRN oder 100 μM SLIGKV inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die RNA aus den lysierten Zellen extrahiert, in cDNA transkribiert und mittels Realtime-PCR amplifiziert (auf TBP normalisierte Mittelwerte); n=3; MW ± SA; *p < 0,05, **p < 0,01.

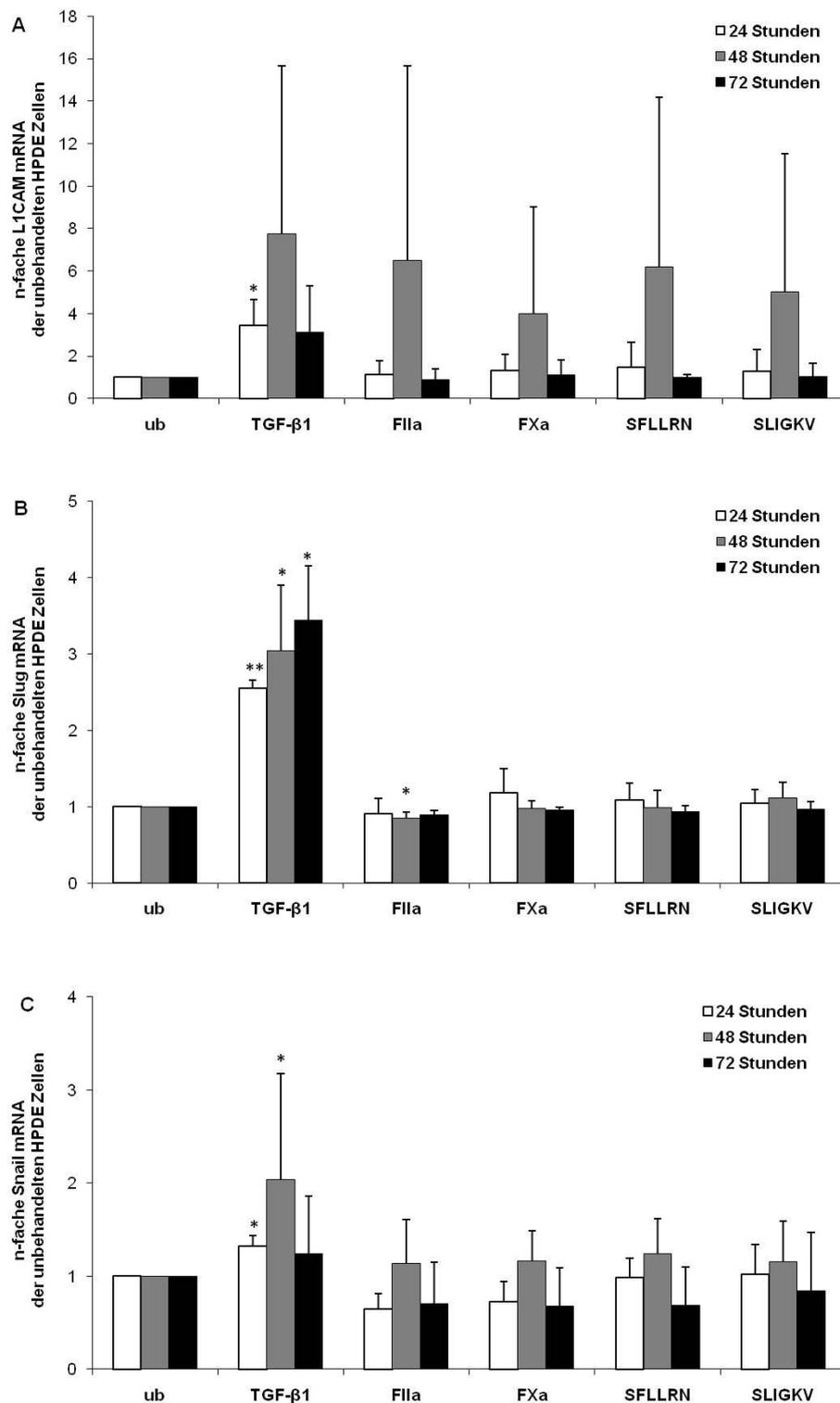


Abbildung 44: TGF- β 1 induzierte die Expression des EMT-assoziierten Markerproteins LICAM (A) sowie der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Slug (B) und Snail (C) in HPDE Zellen, wogegen PAR-Agonisten weitgehend ohne Einfluss blieben: HPDE Zellen wurden ohne (ub) oder mit 10 ng/ml TGF- β 1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μ M SFLLRN oder 100 μ M SLIGKV inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die RNA aus den lysierten Zellen extrahiert, in cDNA transkribiert und mittels Realtime-PCR amplifiziert (auf TBP normalisierte Mittelwerte); n=3; MW \pm SA; *p < 0,05, **p < 0,01.

TGF- β 1 führte in PANC-1 Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle zu einer zeitabhängig signifikant ($p < 0,05$) reduzierten Expression des epithelialen Markerproteins E-Cadherin (Abb. 45 A), während die mesenchymalen Markerproteine Vimentin (Abb. 45 B) und N-Cadherin (Abb. 45 C) deutlich induziert wurden. Die Expression von EMT-assoziiertem L1CAM (Abb. 46 A) nahm nach 48 und 72 Stunden signifikant ab. Auffällig war die in der Intensität am deutlichsten ausgeprägte Expressionssteigerung der EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Slug (Abb. 46 B) und Snail (Abb. 46 C).

Die PAR-Agonisten hatten hingegen gegenüber unbehandelten PANC-1 Zellen weitgehend keinen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin (Abb. 45 A), Vimentin (Abb. 45 B), N-Cadherin (Abb. 45 C), L1CAM (Abb. 46 A), Slug (Abb. 46 B) und Snail (Abb. 46 C), auch wenn signifikante ($p < 0,05$) Einzelergebnisse zu beobachten waren: SLIGKV führte nach 24-stündiger Stimulation zu einer transienten, signifikanten Reduktion der E-Cadherin Expression (Abb. 45 A). FIIa, FXa und SFLLRN führten nach 24 Stunden zu einer nicht signifikanten ($p > 0,05$) Induktion von Slug (Abb. 46 B), die zeitabhängig nach 72 Stunden auf das Niveau unbehandelter Zellen zurückfiel.

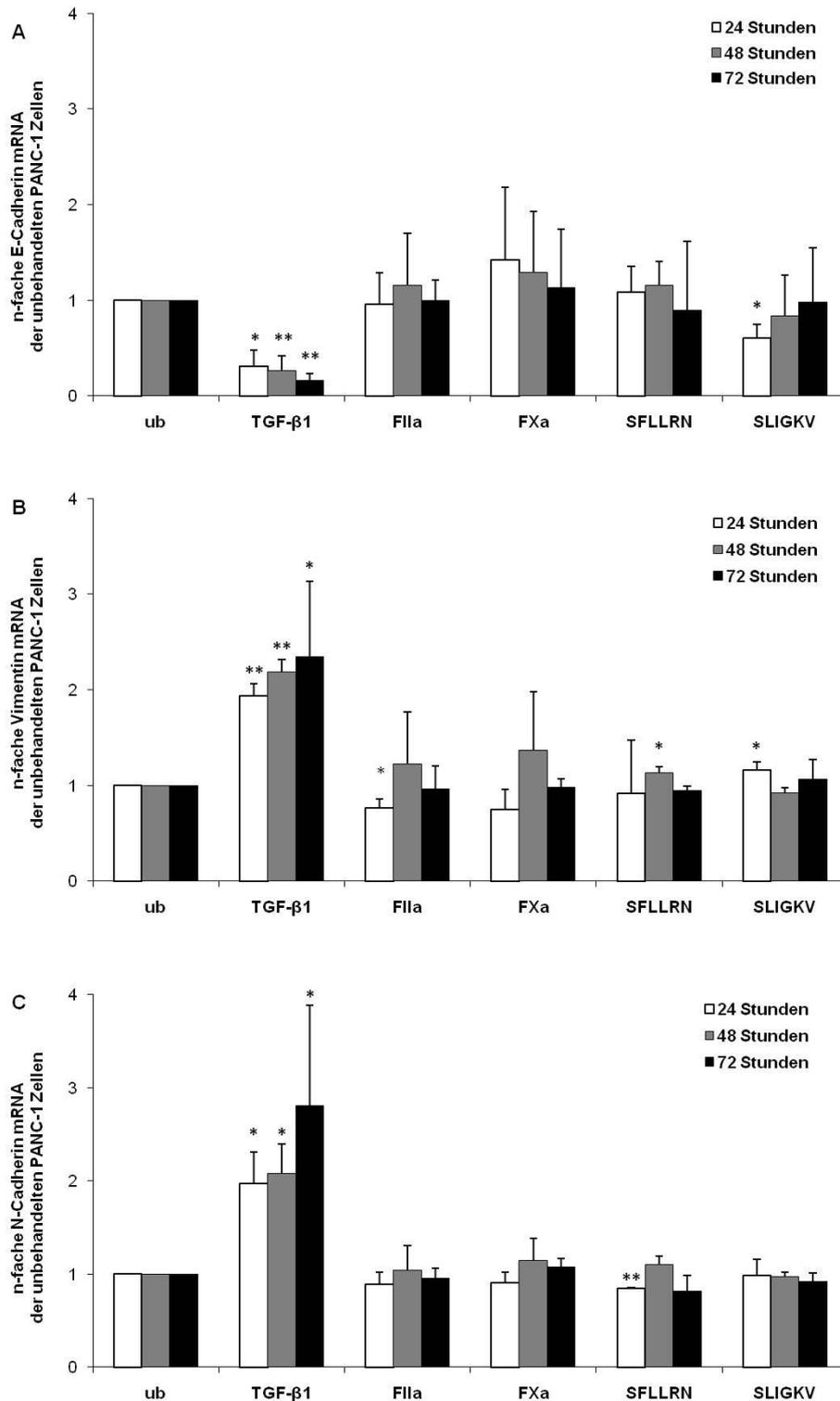


Abbildung 45: TGF-β1 inhibierte zeitabhängig die Expression des epithelialen Markers E-Cadherin in PANC-1 Zellen wogegen die Expression der mesenchymalen Marker Vimentin (B) und N-Cadherin (C) induziert wurde. PAR-Agonisten blieben weitgehend ohne Einfluss: PANC-1 Zellen wurden ohne (ub) oder mit 10 ng/ml TGF-β1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μM SFLLRN oder 100 μM SLIGKV inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die RNA aus den lysierten Zellen extrahiert, in cDNA transkribiert und mittels Realtime-PCR amplifiziert (auf TBP normalisierte Mittelwerte); n=3; MW ± SA; *p < 0,05, **p < 0,01.

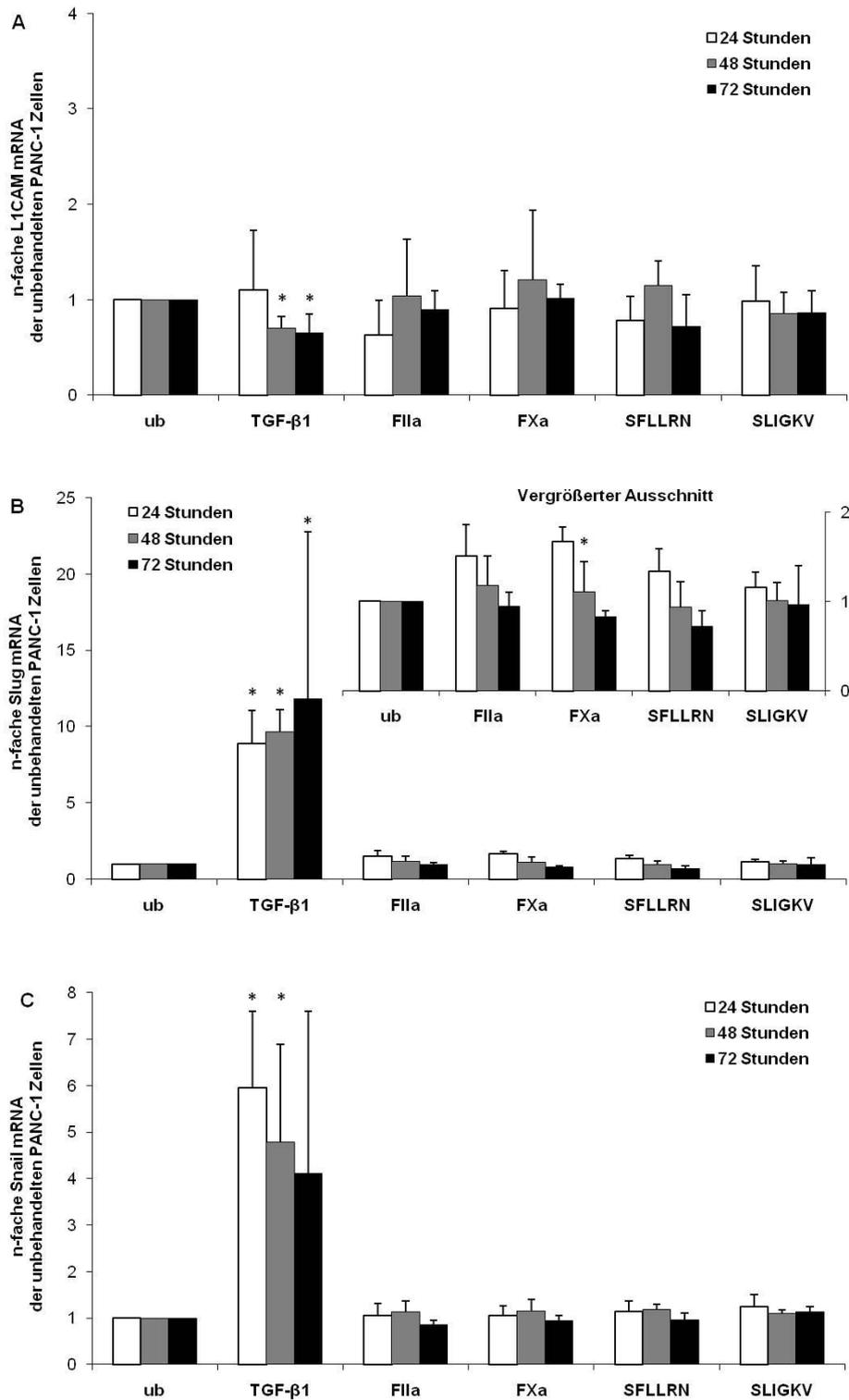


Abbildung 46: TGF-β1 inhibierte zeitabhängig die Expression des EMT-assoziierten Markerproteins LICAM (A) in PANC-1 Zellen wogegen die EMT-assoziierten Transkriptionsfaktoren Slug (B) und Snail (C) induziert wurden. PAR-Agonisten blieben weitgehend ohne Einfluss: PANC-1 Zellen wurden ohne (ub) oder mit 10 ng/ml TGF-β1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μM SFLLRN oder 100 μM SLIGKV inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde die RNA aus den lysierten Zellen extrahiert, in cDNA transkribiert und mittels Realtime-PCR amplifiziert (auf TBP normalisierte Mittelwerte); n=3; MW ± SA; *p < 0,05, **p < 0,01.

Zusammenfassend hatten die PAR-Agonisten kaum einen Einfluss auf die Expression der EMT-assoziierten Proteine E-Cadherin, Vimentin, N-Cadherin, L1CAM, Slug und Snail, während TGF- β 1 die literaturbekannten EMT-typischen Expressionsänderungen induzierte. Da aber nicht nur Expressionsänderungen, sondern auch eine Umverteilungen von EMT-assoziierten Markerproteinen in der Zelle die in Kapitel 3.2.6 beobachtete spindelförmige Morphologie und das veränderte Migrationsverhalten nach Stimulation mit PAR-Agonisten induzieren kann, sollte im nachfolgenden Experiment die Lokalisation von E-Cadherin überprüft werden.

3.2.9 PAR-Agonisten und Erguss führen in HPDE und PANC-1 Zellen zu einer Delokalisierung von E-Cadherin, die mit einer Auflösung von Zell-Zell-Kontakten einhergeht

E-Cadherin ist ein wesentlicher Bestandteil von Desmosomen und *Adherens junctions* und stabilisiert so über Zellkontakte den Zusammenhalt epithelialer Gewebe. Im Rahmen der EMT kommt es einerseits zu Expressionsänderungen von Markerproteinen sowie andererseits auch zu einer Umverteilung der Proteine in der Zelle [284-286]. Im Fall von E-Cadherin wird dieses dann nicht mehr membranständig, sondern zytoplasmatisch exprimiert, was durch Auflösung von Zell-Zell-Kontakten zu einer Auflockerung des Zellverbandes führt, und den Zellen somit das Auswandern aus dem Gewebe ermöglicht [289-291]. Da die eingesetzten PAR-Agonisten in HPDE und PANC-1 Zellen keinen Einfluss auf die transkriptionell regulierte Expression von E-Cadherin zeigten, wurde im folgenden der Einfluss auf die Lokalisation des E-Cadherins in den Zellen untersucht. Eine Delokalisierung membranständigen E-Cadherins ins Zellinnere könnte der beobachteten spindelförmigen Morphologie und dem veränderten Migrationsverhalten zugrunde liegen.

HPDE und PANC-1 Zellen wurden serumstarviert über 24, 48 und 72 Stunden ohne oder mit 10 ng/ml TGF- β 1, 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μ M SFLLRN, 100 μ M SLIGKV oder 10 % (v/v) Erguss 660, 670 oder 688 stimuliert, auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-E-Cadherin Antikörper inkubiert. Der Primärantikörper wurde mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert, ein Kernfarbstoff zugefügt und die auf Objektträgern versiegelten Präparate

am Fluoreszenzmikroskop (40-fache Vergrößerung) fotografiert. Die Zellkerne erschienen blau, E-Cadherin war rot gefärbt.

Abbildung 47 zeigt bei unbehandelten HPDE Zellen (A) die typische transmembranäre Expression und Anreicherung von E-Cadherin in den Zellkontakten. Die Stimulation mit TGF- β 1 als Positivkontrolle (B), FIIa (C), SFLLRN (D), FXa (E) oder SLIGKV (F) induzierte eine Umverteilung des E-Cadherins aus der Zellmembran in eine intrazelluläre, perinukleäre Lokalisierung, die mit der Auflösung der Zellkontakte einher ging. Der Zellverband zeigte sich aufgelockert, die Zellen hatten weniger Kontakte untereinander. Mit FIIa stimulierte HPDE Zellen zeigten hingegen teilweise noch deutlich markierte Zellkontakte, d. h. das Vorhandensein von E-Cadherin. Nach Stimulation der HPDE Zellen mit 10 % (v/v) Erguss 660 (Ovarialkarzinom, G), 670 (Reizerguss, H) oder 688 (Pneumonie, I) konnte ebenfalls die bereits bei den isolierten Faktoren beobachtete Delokalisierung des E-Cadherins aus den Zellkontakten und die resultierende Auflösung der Zellkontakte beobachtet werden. Im Falle der Ergüsse 660 und 688 war zusätzlich eine ausgeprägte Spindelform einiger Zellen zu erkennen.

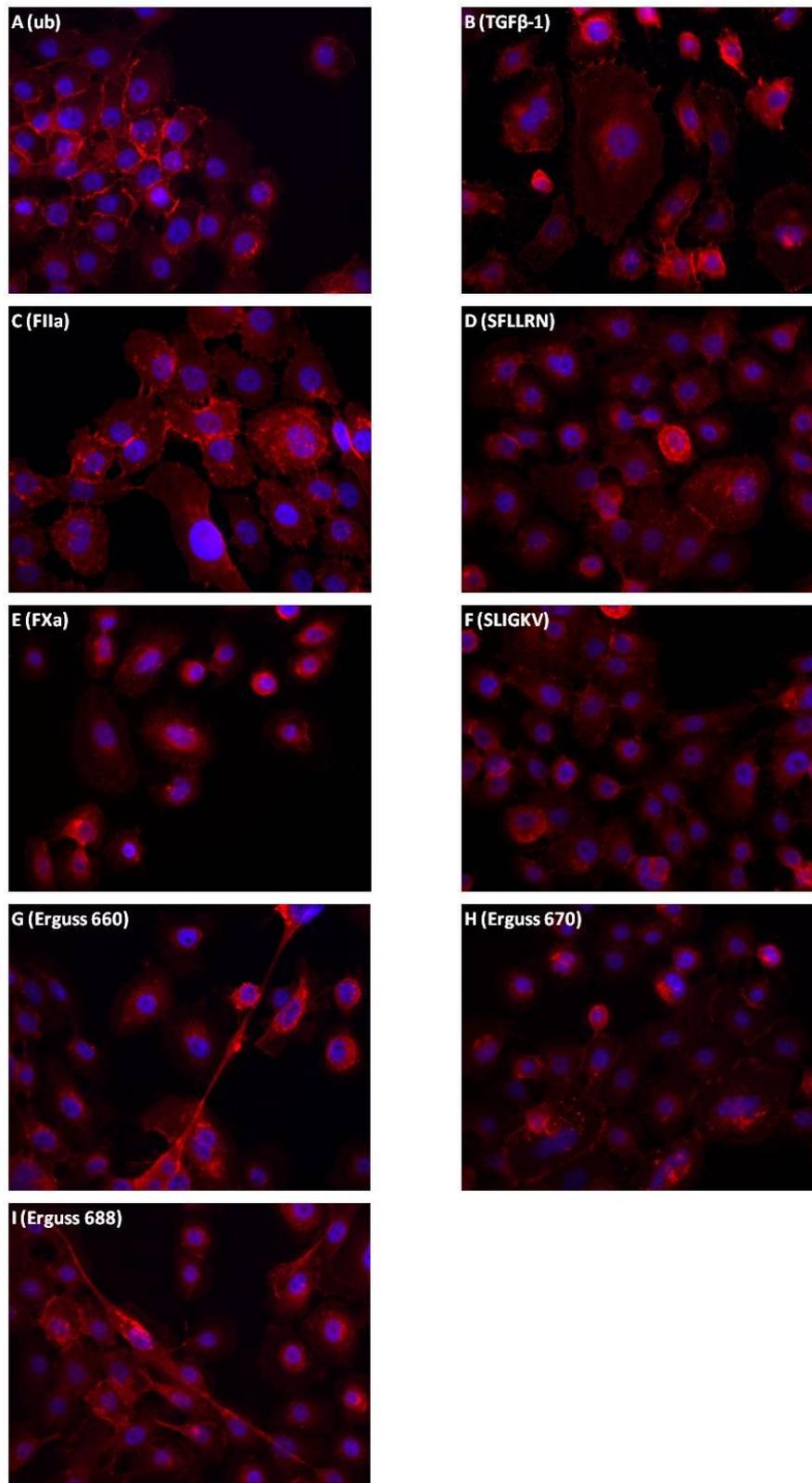


Abbildung 47: TGF- β 1, PAR-Agonisten und Ergüsse induzierten in HPDE Zellen eine Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin aus den Zellkontakten ins Zytoplasma, wodurch der Zellverband aufgelockert wurde: HPDE Zellen wurden serumstarviert über 48 Stunden ohne (ub, A) oder mit 10 ng/ml TGF- β 1 (B), 1 U/ml FIIa (C), 100 μ M SFLLRN (D), 1 U/ml FXa (E), 100 μ M SLIGKV (F) oder 10 % (v/v) Erguss 660 (Ovarialkarzinom, G), 670 (Reizerguss, H) oder 688 (Pneumonie, I) inkubiert, auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-E-Cadherin Antikörper markiert. Nach Fluoreszenzmarkierung mit einem Sekundärantikörper (rot) und Kernfärbung (blau) wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop (40-fache Vergrößerung) fotografiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 48 zeigt für unbehandelte PANC-1 Zellen (A) eine überwiegend zytoplasmatisch dominierte und nur geringe membranäre Verteilung von E-Cadherin über die gesamte Zelle, was im Einklang steht mit dem mesenchymalen Phänotyp der PANC-1 Zellen. Die Zellen bildeten Zellkontakte ohne Anreicherung von E-Cadherin aus. Eine Stimulation über 24 Stunden mit TGF- β 1 (B), FIIa (C), SFLLRN (D), FXa (E) oder SLIGKV (F) führte zu einer Delokalisierung des restlichen membranständigen E-Cadherins ins Zytoplasma. Daraus resultierte eine Auflösung der Zellkontakte gefolgt von einer teilweise ausgeprägten spindelförmigen Morphologie der PANC-1 Zellen. Nach 24-stündiger Stimulation der PANC-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss 660 (Ovarialkarzinom, G) kam es zu keiner Delokalisierung von E-Cadherin aus den Zellkontakten. Die Zellen zeigten weiterhin eine prismatische Morphologie. Erguss 670 (Reizerguss, H) und 688 (Pneumonie, I) führten zu einer Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin bevorzugt perinukleär ins Zytosol, gefolgt von der Auflösung der Zellkontakte, Auflockerung des Zellverbandes und Induktion einer spindelförmigen Morphologie. Die Effekte waren im Ausmaß mit den durch TGF- β 1 oder durch PAR-Agonisten induzierten vergleichbar.

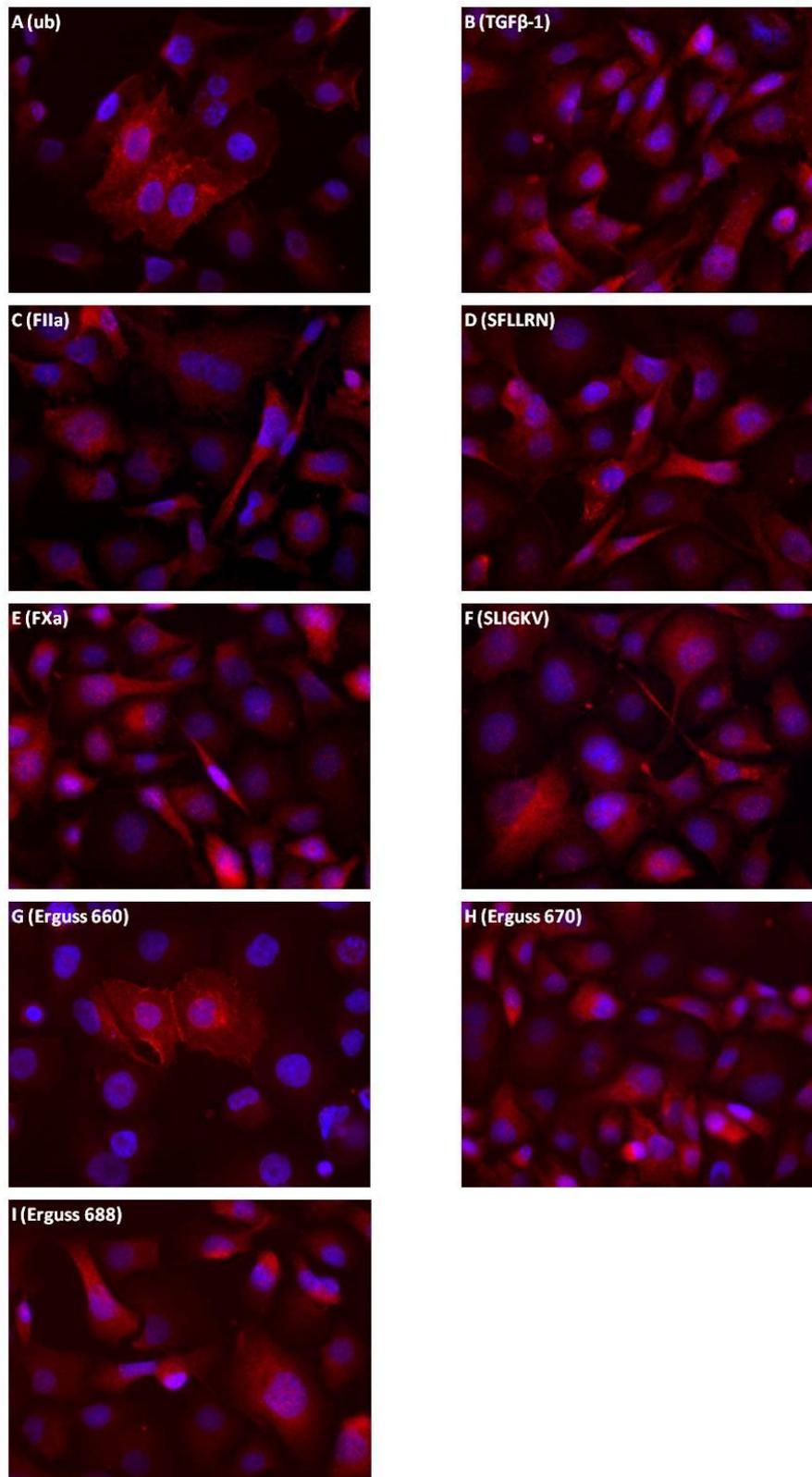


Abbildung 48: TGF- β 1, PAR-Agonisten und Ergüsse induzierten in PANC-1 Zellen eine Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin aus den Zellkontakten ins Zytoplasma, wodurch der Zellverband aufgelockert wurde: PANC-1 Zellen wurden serumstarviert und über 48 Stunden ohne (ub, A) oder mit 10 ng/ml TGF- β 1 (B), 1 U/ml FIIa (C), 100 μ M SFLLRN (D), 1 U/ml FXa (E), 100 μ M SLIGKV (F) oder 10 % (v/v) Erguss 660 (Ovarialkarzinom, G), 670 (Reizerguss, H) oder 688 (Pneumonie, I) inkubiert, auf Deckgläschen fixiert, permeabilisiert und mit einem anti-E-Cadherin Antikörper markiert. Nach Fluoreszenzmarkierung mit einem Sekundärantikörper (rot) und Kernfärbung (blau) wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop (40-fache Vergrößerung) fotografiert. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Ausschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend induzierten PAR-Agonisten, mit Ausnahme von FIIa, in HPDE Zellen die Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin ins Zytoplasma, wodurch Zellkontakte und der Gewebeverband aufgelöst wurden. Der Effekt war mit dem des potenten EMT-Induktors TGF- β 1 vergleichbar. Sowohl benigne als auch maligne Ergüsse führten darüber hinaus zusätzlich zu einer stark ausgeprägten spindelförmigen Morphologie der HPDE Zellen. In PANC-1 Zellen kam es durch Stimulation mit PAR-Agonisten und benignen Ergüssen ebenfalls zu einer Delokalisierung von E-Cadherin, Auflösung der Zellkontakte und einer deutlich ausgeprägten spindelförmigen Morphologie. Die Effekte waren ebenfalls mit den durch TGF- β 1 induzierten zu vergleichen. Lediglich der untersuchte maligne Erguss 660 führte zu keiner Änderung der Lokalisierung von E-Cadherin.

4 Diskussion

Eine tiefe Venenthrombose (TVT) bei fortgeschrittener Tumorerkrankung wird seit ihrer Erstbeschreibung 1865 durch den französischen Internisten Armand Trousseau (1801-1967) als „Trousseau-Syndrom“ bezeichnet [292]. Trousseau bemerkte ein gehäuftes Auftreten von Tumorerkrankungen nach vorherigen venösen thrombembolischen Ereignissen. Als bei ihm selbst eine Thrombophlebitis am linken Arm auftrat, diagnostizierte er daraus einen Magenkrebs, an dem er in der Folge verstarb [293]. Ein ambivalenter Zusammenhang zwischen aktivierter Gerinnung und metastasierender Tumorerkrankung ist seitdem intensiv untersucht worden und in der Literatur gut dokumentiert [294, 295]. So erhöht eine TVT die Inzidenz für eine Tumorerkrankung, ist oft das erste Symptom einer nicht diagnostizierten Tumorerkrankung und eine typische Komplikation progredienter Tumorerkrankungen, da u.a. auch Chemotherapeutika oft prokoagulatorische Nebenwirkungen zeigen [296, 297]. Die gesteigerte Mortalität aufgrund thrombembolischer Ereignisse bei Tumorpatienten ist nach wie vor ein Problem in der Therapie [298, 299].

Die vorliegende Arbeit thematisiert den Zusammenhang zwischen Tumor und Hämostase am Beispiel maligner Ergüsse, die bei ca. 15-30 % der Tumorpatienten während der Progression der Erkrankung auftreten [106, 107]. Die Ergüsse rezidivieren schnell und senken die Lebensqualität der Betroffenen bei spärlichen Therapieoptionen. Aus diesem Grund stellen maligne Ergüsse und deren Therapie weiterhin ein Problem dar. Diverse Studien haben den Benefit einer Komedikation von Tumorpatienten mit Antikoagulantien (Warfarin, LMWH) gezeigt, wobei diese sowohl direkt mit den Tumorzellen interagieren können oder über ihren antikoagulatorischen Effekt die Tumorigenese beeinflussen [300, 301]. 75-300 mg Acetylsalicylsäure täglich führten schon ab dem fünften Jahr zu einer deutlich gesenkten Tumorinzidenz, wobei das Alter den einzigen signifikanten Risikofaktor darstellte [234]. Dabei wird der Erfolg nicht nur der antikoagulatorischen Wirkung von ASS zuzuschreiben sein, sondern auch der konstanten Unterdrückung potentiell tumorigener inflammatorischer Prozesse im Körper. Aufgrund der geringen Kosten der Therapie unterstützen diese Daten die Forderung nach einer täglichen Dosis ASS als „Tumorprophylaxe für Jedermann“. Sie zeigen aber auch die Notwendigkeit weiterer Anstrengungen auf diesem Gebiet der Tumorforschung.

Maligne Ergüsse stellen neben der in Kapitel 1.2.9.1 beschriebenen Einschränkung der Lebensqualität auch ein Reservoir für Tumorzellen dar. Das Mikromilieu im Erguss scheint Chemoresistenzen zu induzieren und die Tumorprogression zu unterstützen [107, 302]. Aus diesem Kompartiment heraus kann der Körper trotz Ansprechens auf eine Therapie erneut durch resistente Tumorzellen infiltriert werden, was auch darauf hindeutet, dass das Ergussmilieu das Migrationspotential von Tumorzellen beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ergüssen, aktivierter Gerinnungsfaktoren sowie selektiver PAR-1 und PAR-2 Agonisten auf zellbiologische Prozesse der Tumorigenese wie Zellwachstum, Ansprechen auf Zytostatika sowie EMT und Migrationsverhalten an verschiedenen Zellsystemen untersucht.

4.1 Nachweis eines aktivierten Gerinnungssystems im Ergussmilieu

Im frisch punktierten Erguss kam es innerhalb kürzester Zeit zur spontanen Bildung gallertartiger Proteinklumpen, die als Fibrin nachgewiesen werden konnten (Abb. 16) [107]. Diese Beobachtung setzt zweierlei voraus: Das Vorhandensein und die Aktivität von Gerinnungsfaktoren.

In einer koagulometrischen Studie an 72 Ergüssen (26 männlicher und 46 weiblicher Patienten bzw. 20 benigner und 52 maligner Diagnose zum Zeitpunkt der Punktion) konnten alle Gerinnungsfaktoren der extrinsischen Kaskade (Fibrinogen, Faktor II, V, VII, X) sowie die Inhibitoren PC und AT III nachgewiesen werden, wenn auch alle weit unterhalb des Referenzwertes der Literatur im Plasma Gesunder lagen (Tab. 22) [268]. Der Marker für eine FIIa-Aktivierung, F1+2, zeigte sich leicht erhöht, wogegen der Fibrinolysemarker D-Dimere etwa 30-fach gegenüber dem Plasma Gesunder erhöht war. Ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied konnte nicht festgestellt werden, allerdings wiesen maligne Ergüsse signifikant höhere Faktor II, VII und AT III Spiegel auf als benigne Ergüsse. Diese Daten zeigen eine aktivierte Hämostase im Erguss unter Verbrauch der Gerinnungsfaktoren an, was deren erniedrigte Werte im Vergleich zur Referenz erklärt. Die Aktivierung der extrinsischen Kaskade führt zum Verbrauch aller Faktoren einschließlich der Inhibitoren PC und AT III, die die Reaktion zum Abklingen bringen. Die gemittelten Daten decken sich mit denen von Blume (2010) und Gieseler et al. (2007), die im selben Labor Untersuchungen an nicht sterilfiltrierten Ergüssen durchführten [107, 223]. Vaz et al. (2009) konnten bei Patienten mit unauffälligem Gerinnungsstatus im Plasma eine

Gerinnungsaktivierung in benignen (entzündlichen oder tuberkulösen) und malignen Pleuraergüssen gleichermaßen anhand erniedrigter Fibrinogenspiegel und erhöhter Spiegel für F1+2 Fragmente, TAT-Komplex und D-Dimere nachweisen [303]. Laut Vaz et al. kann mittels der genannten Gerinnungsmarker zwischen Transsudaten und Exsudaten, aber nicht zwischen den benignen oder malignen Ergüssen innerhalb der Exsudate unterschieden werden. Diese Daten decken sich weitgehend mit denen der vorliegenden Arbeit.

Für die Aktivierung der Hämostase sind zwei Szenarien denkbar: 1. Für Tumorzellen ist eine Gerinnungsaktivierung durch membranäre Expression von TF und CP beschrieben [101]. Eine Aktivierung von Thrombozyten oder Endothelien durch MMP-1, VEGF, E- und P-Selektin, Integrine, Von-Willebrand-Faktor, TNF- α , IL-1 und IL-6, die sowohl von den Tumorzellen als auch von der tumorassoziierten Matrix exprimiert werden können, wirkt über diverse Mechanismen gerinnungsaktivierend [304-310]. 2. Ebenso kann eine Gewebsverletzung sowie die Metalloberfläche der Punktionsnadel im Rahmen der Punktion des Ergusses gerinnungsaktivierend wirken. Dies wird generell nach operativen Eingriffen an erhöhten Plasmaspiegeln prokoagulatorischer Marker (D-Dimere, F1+2 Fragmente, TAT-Komplex) unter Verbrauch von AT III und Plasmininhibitor (α 2-Antiplasmin) beobachtet [311]. Daher bleibt fraglich, ob hier das Resultat einer chronisch aktivierten Gerinnung im Erguss vorliegt oder ob die Punktion den auslösenden Faktor darstellt. Die oben angeführten Publikationen zum Zusammenhang zwischen Gerinnung und Tumorgeschehen sprechen allerdings vor dem Hintergrund der minimalen Gewebsverletzung durch die Punktionsnadel für das bereits vor der Punktion aktivierte Gerinnungssystem. Die Gerinnungsreaktion ist also bereits im Patienten abgelaufen. Nun liegt der Zustand nach einer mehr oder weniger langen prokoagulatorischen Phase vor: Die Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren sind verbraucht, die Spiegel der Abbauprodukte sind erhöht.

In der Literatur finden sich Daten zu Effekten von FIIa und FXa auf Tumorzellen mit Aktivitäten kleiner gleich 0,5 U/ml, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit gefunden werden konnten und zur Stimulation eingesetzt wurden [312]. Die klassische Koagulometrie mittels Mangelplasmen und TPZ diskriminiert nicht zwischen aktivierten Gerinnungsfaktoren und ihren inaktiven Vorläufern. Daher wurde ein chromogener Aktivitätsassay etabliert (Abb. 17 bis 20) und die deutlich niedriger vermutete Aktivität von FIIa und FXa ohne Aktivierung ihrer Vorläufer im

Ergussmilieu bestimmt (Tab. 23 und 24). Die gemessenen Aktivitäten lagen mit 0,032 U/ml FIIa und 0,003 U/ml FXa nur im Bereich eines Zehntels der mittels TPZ bestimmten Aktivitäten und bestätigen die bekannte fehlende Korrelation zwischen Koagulometrie und der chromogenen Methode [313]. Es konnte weder ein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied noch ein Unterschied zwischen benignen und malignen Ergüssen nachgewiesen werden. Die Aktivitäten für FIIa und FXa stellten dabei nur je 5 % der im Erguss mittels chromogener Substrate ermittelten Gesamtaktivitäten dar (Tab. 24). Die Literatur nennt eine ganze Reihe weiterer tumorassoziierter Proteasen wie Plasmin, Faktor II, IX, X, XII, t-PA, Kallikrein, Trypsin, Elastase oder MMPs im Ergussmilieu, die die eingesetzten Substrate zu pNA umsetzen könnten [107, 314-318]. Für zellbiologische Studien wurden im weiteren Verlauf der Arbeit 0,1 bis 1 U/ml FIIa bzw. FXa eingesetzt, im Alamar Blue Assay bis zu 10 U/ml FIIa und FXa.

Aufgrund der gehäuft auftretenden Trübung bei der Aktivitätsmessung im Erguss wurde die zugrundeliegende Arzneibuch-Methode durch Austausch der Puffer und eine zusätzlich parallel durchgeführte turbidimetrische Kontrollmessung korrigiert [255, 256]. Die Daten waren reproduzierbar (n=3), lediglich die fehlende Calcium-Aktivität im Puffer könnte einen negativen Einfluss auf die ermittelte Aktivität gehabt haben. Generell ist die chromogene Aktivitätsbestimmungsmethode von Serinproteasen in komplexen Matrices wie den Ergüssen weniger gut geeignet als für Hemmstudien an isolierten Proteasen.

Im Rahmen der Zellkultur-basierten Versuche dieser Arbeit wurde FCS eingesetzt. FCS ist ein wichtiger Zusatz in der Zellkultur, da es essentielle Nährstoffe und Wachstumsfaktoren sowie Gerinnungsfaktoren enthält. Die bovinen Gerinnungsfaktoren FIIa, FXa, AT III und PC weisen hohe strukturelle und funktionelle Homologie zu den humanen Faktoren auf und werden aufgrund ihrer spezieübergreifenden Reaktivität teilweise intensivmedizinisch am Menschen eingesetzt [270-275]. Eine koagulometrische Studie mit fünf Proben FCS verschiedener Hersteller führte zu ähnlichen Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren, wie sie bereits im Erguss gefunden wurden (Tab. 26). Die 21-fach gegenüber der Referenz in humanem Plasma erhöhten Spiegel für F1+2 Fragmente sowie die erniedrigten Spiegel für D-Dimere sind Ausdruck einer Gerinnungsaktivierung durch die Gewebsverletzung bei der Gewinnung des FCS im Schlachthof. Um Effekte durch exogen hinzugefügte Gerinnungsfaktoren mit einer

definierten Aktivität untersuchen zu können, wurden die Zellen während der Versuche serumstarviert, d.h. in einem Mangelmedium mit 0,5-1 % FCS (v/v) kultiviert. Damit sollte ein Einfluss der im FCS befindlichen Gerinnungsfaktoren auf die zu untersuchenden zellbiologischen Effekte in den Zelllinien vermieden werden.

4.2 Nachweis von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren auf Patientenzellen und Zelllinien

Nachdem in malignen Ergüssen ein aktiviertes Gerinnungssystem nachgewiesen werden konnte, wurde überprüft, ob darin befindliche Tumorzellen entsprechende Rezeptoren exprimieren, über die Gerinnungsfaktoren zellbiologische Effekte auf die Zellen ausüben können. Aus den Ergüssen konnten als Patientenzellen bezeichnete Tumorzellen isoliert und kultiviert werden. In 78 % der Patientenzellkulturen konnten membranständige PAR-1 Rezeptoren und in 17 % der Patientenzellkulturen konnten membranständige PAR-2 Rezeptoren nachgewiesen werden (Tab. 25), die durch die Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa aktiviert werden könnten. Über eine möglicherweise deutlich höhere intrazelluläre Expression der PAR-1/2 Rezeptoren in Patientenzellen kann mangels Daten keine Aussage getroffen werden. In der Literatur ist die PAR-1 Expression auf Tumorzellen aus malignen Ergüssen beschrieben [107, 108]. Darüber hinaus können PAR-1 und PAR-2 auf vielen Tumorentitäten und Tumorzelllinien nachgewiesen werden, wobei die Expression von PAR-1 und teilweise auch PAR-2 positiv mit der Invasivität der Zellen korreliert [319-328]. Die erhöhte Invasivität erklärt auch, warum die aus den Ergüssen isolierten Patientenzellen mehrheitlich PAR-1 positiv sind und welche Rolle sie bei der Ergussentstehung spielen. Invasive Zellen dringen in den Pleuraspalt, das Perikard oder die Bauchhöhle ein, verursachen dabei eine Entzündung, die u.a. durch Freisetzung von VEGF zu einem Verlust der Endothelbarrierefunktion führt, worauf hin Proteine wie die Gerinnungsfaktoren und weitere Tumorzellen leicht in die Kavität eindringen können [105, 107, 329].

Da die Patientenzellen eine sehr langsame Proliferation aufwiesen sowie häufig mit Fibroblasten verunreinigt waren, konnten sie nicht für die weiteren Versuche eingesetzt werden. Daher wurden die Zelllinien HPDE, PANC-1 und THP-1 als Modellzelllinien verwendet, deren Eignung hinsichtlich ihrer Expression von PAR-1 und PAR-2 zunächst überprüft wurde. Mit der Auswahl dieser Zellen standen mit PANC-1 sowohl eine Karzinomzelllinie, mit THP-1 eine monozytäre Tumorzelllinie als auch mit HPDE

eine nicht-tumorigene epitheliale Zelllinie zur Verfügung. Im weiteren Verlauf der Arbeit konnte somit der Einfluss einer PAR-Aktivierung auf die in der EMT weiter fortgeschrittene Karzinomzelllinie PANC-1 der nicht-tumorigenen epithelialen Zelllinie HPDE gegenüber gestellt werden.

Nur PANC-1 Zellen zeigten nach Oberflächenfärbung in der Durchflusszytometrie eine eindeutige Expression von PAR-1 und PAR-2 (Abb. 21). Auf HPDE Zellen konnte eine geringe membranständige Expression von PAR-1 und eine deutlichere membranständige Expression von PAR-2 nachgewiesen werden. THP-1 zeigten eine deutliche Expression membranständiger PAR-1 Rezeptoren, wogegen PAR-2 kaum exprimiert waren. Mittels einer Immunfluoreszenzfärbung nach Permeabilisierung konnte darüber hinaus für HPDE und PANC-1 Zellen eine deutliche PAR-1 und PAR-2 Expression gegenüber der Isotypkontrolle nachgewiesen werden (Abb. 22, 23). Die Rezeptoren zeigten sich dabei nur schwach membranär aber dagegen deutlich stärker granulär und tendenziell perinukleär im Zytosol lokalisiert, was bereits unter dem Begriff *endocytic sorting* (endosomale Sortierung) beschrieben wurde [180, 200]. Ein Großteil der PAR scheint demnach ständig in endosomalen Vesikeln einsatzbereit in der Zelle gelagert zu werden, während nur ein Bruchteil der Rezeptoren membranständig exprimiert wird. Die Zelle kann somit ständig mit frischen Rezeptoren auf Proteasesignale ihrer Umgebung reagieren. Die Expression von PAR-1 und PAR-2 auf PANC-1 Zellen wurde bereits 2006 von Wei et al. beschrieben, und entspricht den hier vorgestellten Daten [330]. Für HPDE Zellen ist dies die Erstbeschreibung der Expression von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren.

Auf THP-1 Zellen wurden bereits in diversen Studien indirekt PAR-2 Rezeptoren mittels selektiver Hexapeptide, blockierender Antikörper und PAR-2 siRNA durch Beeinflussung der zytosolischen Ca^{2+} -Spiegel, der Phosphorylierung von ERK1/2, der Expression entzündungsassoziiertes Proteine wie u.a. TNF- α , IL-6 und NF- κ B, nachgewiesen [276-280]. Daher erfolgte keine weitere Färbung der zytosolisch lokalisierten Rezeptoren in THP-1 Zellen.

4.3 Einfluss von Ergüssen auf Proliferation und Chemosensitivität von THP-1 Zellen

Für diesen Teil der Arbeit wurde der Alamar Blue Assay mit der Zelllinie THP-1 etabliert (Abb. 24). Zunächst wurde die IC_{50} zweier Zytostatika, Carboplatin und Doxorubicin, an der Zelllinie titriert (Tab. 27). Danach wurde der Einfluss einer

Supplementierung des Kulturmediums mit 10 % (v/v) Erguss auf das Zellwachstum und das Ansprechen der THP-1 Zellen auf Zytostatika gemessen. Für diese Untersuchungen wurden 60 verschiedene Ergüsse eingesetzt und die erhaltenen Daten anhand Geschlecht (40 weiblich, 20 männlich), Malignität (43 maligne, 17 benigne) und Diagnosestellung zum Zeitpunkt der Punktion (17 benigne Ergüsse, 19 Lungentumore, 17 gynäkologische Tumore, 14 gastroenterologische Tumore) klassiert und mittels Mann Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben ausgewertet (Abb. 26-29 und Tab. 28).

Im Mittel (alle 60 Ergüsse) resultierte die Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit Ergüssen verschiedener Genese nach Behandlung mit und ohne Carboplatin oder Doxorubicin in einer erniedrigten Zellzahl gegenüber der Kontrolle ohne Erguss Zytostatika (Tab. 28, Abb. 26-29). Das bedeutet auch ein verbessertes Ansprechen auf die Zytostatika. Die Ansätze enthielten runde ein Viertel weniger Zellen gegenüber den ergussfreien Kontrollansätzen. Die auffälligste Hemmung des Zellwachstums zeigten Ergüsse von Patientinnen mit gynäkologischen Tumorerkrankungen. Auffällig waren dem gegenüber auch die deutlichen induzierenden Effekte einiger Ergüsse auf das Zellwachstum sowie auf das Ansprechen der THP-1 Zellen auf Carboplatin und Doxorubicin, die sich in einer bis zu 2,5-fach höheren Zellzahl verglichen mit der ergussfreien Kontrolle zeigten. Diese Effekte konnten durch Klassierung nach Diagnose zum Punktionszeitpunkt einigen Ergüssen gastroenterologischer Tumoren weiblicher Patientinnen, benignen Ergüssen weiblicher Patientinnen sowie einem gynäkologischen Erguss zugeschrieben werden. Ergüsse männlicher Patienten zeigten dagegen mehr einen inhibierenden Einfluss auf das Zellwachstum.

Puiffe et al. (2007) untersuchten den Einfluss einer Supplementierung von 5 % malignem Ascites auf die Proliferation der Ovariakarzinomzelllinie OV-90. Nur zwei der 10 ausgewählten Ergüsse führten über 24 bzw. 48 Stunden zu einer signifikant reduzierten Zellzahl gegenüber der Kontrolle mit 5 % (v/v) FCS [331]. Braun et al. (2002) konnten im ³H-Thymidin-Assay eine sowohl autolog als auch heterolog gesteigerte Proliferation in Endometriumzellen aus eutopischem und ektopischem Endometrium von Patientinnen mit Endometriose durch Supplementierung des Kulturmediums mit autologem oder heterologem Ascites nachweisen [332]. Der Effekt konnte aber durch eine Co-Inkubation mit dem rekombinanten, löslichen TNF α -Rezeptor Etanercept als TNF α -vermittelt nachgewiesen werden. Rehnberg et

al. konnten 2007 eine gesenkte Proliferationsrate von Mesothelzellen aus malignen Ergüssen gegenüber Mesothelzellen aus benignen Ergüssen beobachten [333]. Darüber hinaus sind die Hemmung des Zellwachstums zugunsten einer erhöhten Migrationsfähigkeit und Chemoresistenz typische Effekte von TGF- β 1, der von Ceyhan et al. 2003 in malignen Ergüssen nachgewiesen wurde [134, 334]. Blume konnte 2010 erhöhte Konzentrationen TGF- β 1 in denjenigen malignen Ergüssen messen, die teilweise mit den hier verwendeten Ergüssen identisch sind [223]. Der hemmende Effekt dieser Ergüsse auf das Zellwachstum könnte also durch das antiproliferativ wirkende TGF- β 1 vermittelt sein. Im Fall der gynäkologischen Ergüsse ist auch ein antiproliferativ wirkendes Hormon wie *Gonadotropin releasing hormone Typ II* (GnRH II) oder 17 β -Estradiol im Erguss denkbar, was die stärkere Hemmwirkung auf das Zellwachstum durch Ergüsse weiblicher Patientinnen erklärt. Für beide Hormone liegen Daten zu einem ausgeprägten antiproliferativen Effekt auf Tumorzellen vor [335, 336]. Östrogenrezeptoren wurden bereits neben Progesteronrezeptoren auf Tumorzellen aus malignen Ergüssen von Patientinnen mit Brustkrebs nachgewiesen, was dem Hormonstatus der jeweiligen Primärtumore entspricht [337].

Die beobachteten Effekte einer Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss decken sich tendenziell mit der Literatur, auch wenn dort andere Zelllinien verwendet wurden. Eine Untersuchung der Ergüsse bezüglich des Gehalts der antiproliferativ wirkenden Faktoren TGF- β 1, TNF α , GnRH II oder 17 β -Estradiol könnte helfen die beobachteten Effekte weiter aufzuklären.

Weitere mögliche antiproliferative Faktoren im Erguss könnten auch die im Rahmen dieser Arbeit im Erguss bestimmten Gerinnungsfaktoren FII und FX sein. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Supplementierung des Kulturmediums mit Erguss und der bereits vorher mittels TPZ in den Ergüssen nachgewiesenen Gerinnungsprotease FII aufzudecken, wurden die Daten der FII Aktivität im Erguss mit dem Einfluss derselben Ergüsse auf das Zellwachstum korreliert. Dies war für 29 Ergüsse möglich. FII Aktivitäten im Erguss ab ca. 0,3 U/ml korrelierten mit einer reduzierten Zellzahl unbehandelter Zellen sowie mit Carboplatin behandelter THP-1 Zellen, was ein verbessertes Ansprechen auf Carboplatin bedeuten kann (Abb. 30 und 31). Für Doxorubicin behandelte Zellen existierte kein aktivitätsabhängiger Zusammenhang zwischen der FII Aktivität im Erguss und dem Zellwachstum (Abb. 32). In der Literatur existieren keine vergleichbaren Studien zum

modulierenden Effekt einer Supplementierung des Kulturmediums von Tumorzellen mit Ergussflüssigkeit auf das Ansprechen der Zellen auf Zytostatika. Daten zum Zusammenhang zwischen Chemoresistenz und Erguss liegen lediglich zu löslichen Faktoren in Ergüssen oder membranständigen Faktoren auf Tumorzellen aus Ergüssen vor. So geht beispielsweise eine Chemoresistenz bei fortgeschrittenem Ovarialkarzinom mit einer erhöhten Expression von Klasse III β -Tubulin auf den Tumorzellen im Erguss dieser Patientinnen einher [302]. Es liegen aber keine Publikationen zur Erklärung des in dieser Arbeit beobachteten Effekts einer Supplementierung des Kulturmediums mit Ergüssen auf das Ansprechen auf Zytostatika vor. Da die Ergüsse keine Unterschiede im FX-Gehalt aufwiesen, konnte keine Korrelation beobachtet werden.

Der Effekt einer Supplementierung von THP-1 Zellen mit Ergüssen auf das Ansprechen auf Carboplatin und Doxorubicin korreliert darüber hinaus mit dem Einfluss derselben Ergüsse auf das Zellwachstum. Ein Einfluss der Ergüsse auf die Chemosensitivität der THP-1 Zellen unabhängig von der Teilungsrate scheint damit unwahrscheinlich. Eher könnte dies der schon weiter oben erwähnte Effekt von Zellwachstum inhibierenden Zytokinen im Erguss wie z.B. TGF- β 1 sein. In den Ergüssen könnten sich auch Arzneistoffreste der aktuellen Therapien der Patienten befinden, die ebenfalls einen Effekt auf das Zellwachstum haben könnten. Für Tumorpatienten kommen hier beispielsweise Zytostatika, Immunsuppressiva oder Analgetika in Frage. Dieser Ansatz kann aber kaum die sehr ähnlichen Effekte der benignen und malignen Ergüsse männlicher Patienten erklären, in denen sich dann auch Rückstände unterschiedlicher Arzneistoffe finden müssten, die unterschiedliche Effekte auf das Zellwachstum zeigen würden. Daher bleibt dieser Ansatz ohne weitere Untersuchung der Ergüsse auf Arzneistoffrückstände eine Vermutung. Weiterhin sind die klassierten Daten vorsichtig zu werten, da die Fallzahlen innerhalb der einzelnen Klassen eher gering sind. Eine weitere Suche nach der Einflussgröße in den stark antiproliferativ wirkenden gynäkologischen Ergüssen wäre interessant.

Zusammenfassend korreliert die Aktivität von FII im Erguss mit dem verminderten Zellwachstum und dem verbesserten Ansprechen der Zellen auf Carboplatin durch Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit den Ergüssen. Fraglich ist jedoch weiterhin, ob die hier beobachteten Effekte den Einfluss der Gerinnungsfaktoren auf das Zellwachstum der THP-1 Zellen widerspiegeln, oder ob tatsächlich in die Wirkmechanismen der Zytostatika eingegriffen wird, und somit eine

Chemosensitivierung erzielt wird. Außerdem stellt sich die Frage nach weiteren Faktoren wie Zytokinen oder Arzneistoffrückständen im Erguss, die Teil der gemessenen Effekte sein könnten. Um dieser Fragestellung hinsichtlich der über PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren vermittelten Effekte nachzugehen, wurden weitere Studien an THP-1 und PANC-1 Zellen mit PAR-Agonisten durchgeführt.

4.4 Einfluss von FIIa, FXa und PAR-Agonisten auf die Proliferation und Chemosensitivität von PANC-1 und THP-1 Zellen

Zur Überprüfung eines Zellwachstum inhibierenden Effektes von FIIa und FXa sowie eines Einflusses der beiden Gerinnungsfaktoren auf die Sensitivität von Zellen gegenüber Zytostatika wurden THP-1 und PANC-1 Zellen ohne und mit Carboplatin oder Doxorubicin (je IC_{50}) behandelt und der Einfluss einer Inkubation mit bis zu 10 U/ml FIIa oder FXa gemessen (Tab. 29). Um zwischen einer Wirkung über PAR-1 oder PAR-2 Rezeptoren diskriminieren zu können, wurden außerdem die selektiven PAR-Agonisten SFLLRN (PAR-1) und SLIGKV (PAR-2) je bis zu 100 μ M eingesetzt. Bei der Durchführung dieses Versuches fiel auf, dass sich die in Kapitel 3.2.4.2 bestimmte IC_{50} der Zytostatika mit jeder weiteren Passagierung der Zellen änderte, so dass die Kontrollwerte teilweise vom titrierten 50 %-Wert (bezogen auf die zytostatikumfreie Kontrolle) abwichen (22 bis 82 % der Kontrolle).

Die eingesetzten Stimulantien FIIa und FXa hatten keinen Einfluss auf das Zellwachstum bzw. das Ansprechen der PANC-1 Zellen auf Doxorubicin. SFLLRN und SLIGKV führten in PANC-1 Zellen zu einer nicht signifikanten konzentrationsabhängigen Chemoresistenz gegenüber Doxorubicin sowie einem reduzierten Zellwachstum. Dagegen berichten Shimamoto et al. (2004) von einer signifikant gesteigerten Proliferation nach Stimulation von PANC-1 Zellen mit 33 oder 66 μ M SLIGKV, wogegen SFLLRN diesen Effekt nicht zeigte [338]. Tendenziell kann im Rahmen dieser Arbeit mit ähnlichen Konzentrationen SFLLRN und SLIGKV eher das Gegenteil beobachtet werden. Daten zum Einfluss der eingesetzten PAR-Agonisten auf die Chemosensitivität von PANC-1 Zellen finden sich in der Literatur nicht.

In THP-1 Zellen führte eine Stimulation mit höheren Aktivitäten FIIa zu einer nicht signifikanten Hemmung des Zellwachstums, was sich im Grundsatz mit der Literatur deckt: Dort zeigen Schiller et al. (2002) mittels Alamar Blue Assay eine Reduktion der Zellzahl durch 72-stündige Inkubation mit FIIa-Aktivitäten über 1,8 U/ml an HL-60 Zellen, allerdings auch einen proliferativen Effekt von Aktivitäten bis 1,8 U/ml [134].

Durch Stimulation der PAR-2 Rezeptoren der THP-1 Zellen durch Inkubation mit FXa und SLIGKV konnte dosisabhängig ebenfalls ein leicht antiproliferativer Effekt erzielt werden, der aber nicht signifikant war.

Die Stimulation von Carboplatin behandelten THP-1 Zellen mit 0,1-10 U/ml FIIa führte konzentrationsabhängig zu einer signifikant anderthalbfach höheren Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle, die durch Stimulation der Zellen mit dem PAR-1 Agonisten SFLLRN nicht erzielt werden konnte. Die Stimulation von THP-1 Zellen mit FIIa führte unter Behandlung mit Doxorubicin ebenfalls zu einer deutlich erhöhten Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle, jedoch führte hier neben 0,1-5 U/ml FIIa auch die Stimulation mit 0,1-100 μ M PAR-1 Agonist SFLLRN bzw. PAR-2 Agonist SLIGKV zu einer signifikant gesteigerten Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Da die Zellzahlen von THP-1 Zellen in zytostatikumfreien Ansätzen unter dem Einfluss von FIIa, SFLLRN und SLIGKV konzentrationsabhängig konstant blieben oder nur leicht sanken, während die Stimulationen bei Carboplatin oder Doxorubicin behandelten Ansätzen zu gesteigerten Zellzahlen führten, könnte hier eine Resistenzinduktion in THP-1 Zellen durch FIIa, SFLLRN und SLIGKV zugrunde liegen. Es könnte aber auch eine Selektion resistenter Zellen stattgefunden haben. Weitere Experimente zum Mechanismus der Wirkung von PAR-Agonisten auf die Proliferation könnten hier Klarheit schaffen.

Die Stimulation mit FXa hatte keinen signifikanten Einfluss auf beide Zelllinien, führte aber in unbehandelten THP-1 Zellen zu einer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant niedrigeren Zellzahl.

Der hemmende Einfluss von FIIa, FXa und SLIGKV auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen sowie das tendenziell leicht verbesserte Ansprechen der Zellen auf Carboplatin durch Inkubation mit SFLLRN ähnelt dem gemittelten Einfluss einer Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit Ergussfluid (vgl. Kap. 3.2.4.3). Denkbar wäre hier auch eine Vermittlung dieser Effekte der Ergüsse durch Aktivierung von membranständigen PAR-1 oder PAR-2 Rezeptoren. Allerdings könnten diese Effekte auch durch das im Erguss nachgewiesene, bevorzugt anti-mitogen wirkende TGF- β 1 sowie weitere Zytokine induziert werden oder zumindest überlagert werden.

Die unterschiedlichen Effekte der Gerinnungsfaktoren und Agonisten können über die Signaltransduktion von PAR Rezeptoren erklärt werden. Aktivierte PAR-1 und PAR-2 binden besonders an multiple heterotrimere G-Proteine wie G_i , G_q und $G_{12/13}$,

welche unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden anstoßen und somit zu unterschiedlichen Effekten führen [189, 190]. Synthetische Hexapeptide wie SFLLRN und SLIGKV können die Rezeptoren unabhängig von einer proteolytischen Freilegung des agonistischen Liganden aktivieren, induzieren dann aber auch andere Zellantworten: Eine proteolytische Aktivierung von PAR-1 auf Endothelzellen resultiert beispielsweise bevorzugt in der Rekrutierung von $G_{12/13}$ und einer Permeabilisierung der Endothelbarriere, während synthetische Peptide hier eher einen G_q abhängigen Ca^{2+} -Einstrom vermitteln [201, 202].

Ein weiterer Erklärungsansatz für unterschiedliche Effekte der Gerinnungsfaktoren und Ergüsse auf gleiche Zelllinien ist die Selektivität der proteolytischen sowie hexapeptidischen PAR-Agonisten. So aktiviert FIIa nicht nur PAR-1 Rezeptoren, sondern auch PAR-3 und PAR-4 Rezeptoren, die ebenfalls zellbiologische Einflussgrößen darstellen und Teil des gesamten gemessenen Effektes sein könnten [180, 200]. Extrazelluläre Mutationen des PAR-1 Rezeptors führen darüber hinaus zu einer gegenüber dem PAR-1 Wildtyp veränderten Signaltransduktion, die in veränderten zellbiologischen Effekten resultiert [201]. FXa aktiviert bevorzugt PAR-1 und PAR-2 und kann auch im TF-FVIIa-FXa-Komplex vorkommen, der sich durchaus auch mittels der Gerinnungsfaktoren im Erguss oder im FCS bilden könnte, und vermittelt so wie oben beschrieben andere Signale als der freie FXa. SFLLRN ist darüber hinaus als PAR-1 selektiv beschrieben, besitzt aber durchaus agonistische Aktivität am PAR-2 Rezeptor [339, 340].

In der Literatur finden sich kaum Angaben über eine Resistenzinduktion durch Gerinnungsfaktoren. Im Rahmen einer Internetrecherche in der Meta-Datenbank Pubmed der *National Institutes of Health* (NIH, Bethesda MD, US; www.pubmed.gov) zu verschiedenen Schlagworten wie beispielsweise „*Thrombin*“, „*Factor Xa*“, „*SFLLRN*“, „*SLIGKV*“, „*PAR-1*“, „*PAR-2*“, „*Thrombin receptor*“, „*Coagulation*“ oder „*Coagulation factors*“ kombiniert mit den Schlagworten „*Drug resistance, neoplasm*“, „*Drug resistance, multiple*“, „*Multidrug resistance-associated proteins*“, „*Carboplatin*“ oder „*Doxorubicin*“ fanden sich keine relevanten Publikationen zum Thema. Trotzdem ist ein gerinnungsassoziiertes Resistenzphänomen für Carboplatin bekannt. Carboplatin zeigt eine Proteinbindung an Fibrinogen bei physiologischen Fibrinogenspiegeln, wodurch nach Aktivierung des Gerinnungssystem z.B. mit FIIa das Carboplatin in einem Fibrinnetzwerk eingeschlossen wird und die Zellen nicht mehr vollständig erreichen kann [341]. Dieser zellunabhängige Effekt kann die

Ergebnisse der oben diskutierten Versuche dieser Arbeit nur erklären, wenn die verwendeten Zelllinien unterschiedliche Effekte auf den Fibrinogenspiegel im Well haben, was vermutlich nicht der Fall ist. Da die mittels Koagulometrie untersuchten Fibrinogenspiegel der Ergüsse kaum variierten, wird der unterschiedliche Effekt der Ergüsse auf die Zellzahl der THP-1 Zellen ebenfalls nicht hierin begründet sein. Weiterhin korreliert eine gesteigerte Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Tumorgewebe von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkrebs mit einer Resistenz gegen Platinverbindungen [342]. FIIa sowie SFLLRN induzieren PAR-1 vermittelt eine gesteigerte COX-2 Expression, was eine mögliche Erklärung für die beobachteten Resistenzphänomene darstellt [343, 344]. Eine TF/FVIIa induzierte Aktivierung von BCL-2 in Neuroblastomzellen stellt den einzigen publizierten gerinnungsabhängigen Resistenzmechanismus maligner Zellen gegenüber Doxorubicin dar [345]. Eine Inkubation von U937 (hystiozytische Lymphomzelllinie) und 1301 (akute lymphoblastoide Leukämiezelllinie) Zellen über 24 bis 30 Stunden mit 0,3 U/ml FIIa führt zu einem Anstieg der BCL-2-Expression [150]. Ob diese Mechanismen in THP-1 Zellen dem verminderten Ansprechen auf Carboplatin und Doxorubicin zugrunde liegen, bleibt zu überprüfen.

Zusammenfassend führte eine Stimulation mit proteatischen und synthetischen PAR-1 und PAR-2 Agonisten im Alamar Blue Assay zu keiner signifikanten Änderung der Zellzahl von PANC-1 Zellen. Hohe Aktivitäten FIIa hemmten das Zellwachstum und vermittelten eine ausgeprägte Resistenz gegenüber Carboplatin und Doxorubicin in THP-1 Zellen, die in Doxorubicin behandelten Zellen ebenfalls mit beiden PAR-Agonisten erzielt werden konnte. FXa führte zu einem nicht signifikant verbesserten Ansprechen der THP-1 Zellen auf Doxorubicin, was in einer gehemmten Proliferation begründet zu sein scheint. Die Daten entsprechen teilweise der Literatur, die für FIIa konzentrationsabhängige induzierende Effekte auf Zellwachstum und Resistenz belegt [134].

Die ausbleibenden Effekte der Stimulation von PANC-1 Zellen mit SLIGKV widersprachen den Angaben der Literatur. Iwaki et al. konnten 2008 nach 48-stündiger Stimulation von serumstarvierten PANC-1 Zellen mit 1-100 μ M SLIGKV eine konzentrationsabhängige um das Zweifache gesteigerte Zellzahl mittels des Tetrazolium-basierten WST-1 Assays detektieren [346]. Um die im Alamar Blue Assay erhobenen Befunde zu überprüfen und den Einfluss einer Stimulation mit den eingesetzten PAR-

Agonisten zu validieren, wurde der ebenfalls Tetrazolium basierte MTS-Assay mit PANC-1 Zellen durchgeführt.

Es wurde der Einfluss von FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV sowie TGF- β 1, einem bekannten Proliferationshemmer als Positivkontrolle, auf die Proliferation von PANC-1 Zellen im MTS-Assay untersucht (Abb. 36). Die PAR-1 und PAR-2 aktivierenden Proteasen und Peptide hatten in den Konzentrationen wie im Alamar Blue Assay nach 48-stündiger Inkubation keinen Effekt auf das Zellwachstum der PANC-1 Zellen. Die von Iwaki et al. (2008) publizierte Proliferationssteigerung der Zellen durch Stimulation mit 100 μ M PAR-2 Agonist SLIGKV konnte folglich nicht bestätigt werden. Allerdings konnte SLIGKV in einer höheren Konzentration als im Alamar Blue Assay (300 μ M) das Zellwachstum signifikant um 16 % hemmen (84 % d. Kontrolle), was dem Ausmaß nach Inkubation mit 10 ng/ml TGF- β 1 entsprach (85 % d. Kontrolle). Eine Proliferationshemmung durch TGF- β 1 zugunsten erhöhter Motilität ist bekannt [334, 346, 347]. Der PAR-2 Agonist SLIGKV induziert je nach Zellsystem unterschiedliche Effekte, so kann in Brustkrebszellen eine gesteigerte Migration beobachtet werden, während in anderen Tumorzellen auch die Proliferation induziert werden kann [348-350]. Alle weiteren PAR-Agonisten führten im MTS-Assay zu einem Ergebnis, welches dem des Alamar Blue Assays ähnlich war.

In den Ergüssen wurden aktivierte Gerinnungsfaktoren nachgewiesen sowie ein negativer Einfluss der Ergüsse auf das Zellwachstum von THP-1 Zellen gezeigt. Im Weiteren wurde untersucht, ob eine Hemmung der im Erguss enthaltenen Aktivitäten von FIIa und FXa mit Antikoagulantien einen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen hat. Die Supplementierung von PANC-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss zeigte im MTS-Assay das schon im Alamar Blue Assay an THP-1 Zellen gemessene um 20-25 % reduzierte Zellwachstum (vgl. Tab. 28 und Abb. 37). Durch Einsatz von 32 ATU des FIIa-Inhibitors Lepirudin ließ sich für einen von zehn Ergüssen eine signifikant gesenkte Zellzahl detektieren. Die restlichen Ansätze zeigten wie beim Einsatz von 0,5 μ M des FXa-Inhibitors Rivaroxaban keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum.

Die im Erguss enthaltenen Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa haben somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Proliferation der PANC-1 Zellen. Da die Zellzahl durch Supplementierung mit 10 % (v/v) Erguss im Mittel aber um 16 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle gesenkt war, sind antiproliferative Effekte durch andere

Faktoren im Erguss wie TGF- β 1 denkbar. TGF- β 1 wurde bereits in verschiedenen Studien im Erguss nachgewiesen [223, 334].

Maligne und benigne Ergüsse zeigten im Alamar Blue Assay einen wachstumshemmenden Effekt auf unbehandelte oder mit Zytostatikum behandelte THP-1 Zellen, der sich im Ausmaß vergleichbar auch an PANC-1 Zellen im MTS-Assay beobachten ließ. Die PAR-Agonisten FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV konnten in beiden Testsystemen nicht eindeutig als verantwortliche Faktoren für diesen wachstumshemmenden Effekt identifiziert werden, zeigten aber tendenziell einen leicht hemmenden Einfluss auf das Wachstum von PANC-1 und THP-1 Zellen. Eine PAR-Aktivierung mit den Agonisten FIIa, SFLLRN und SLIGKV führte in THP-1 Zellen zu einer Chemoresistenz, wogegen FXa in THP-1 Zellen kaum einen Effekt vermittelte. Die PAR-Agonisten hatten keinen Einfluss auf das Ansprechen der PANC-1 Zellen auf Carboplatin und Doxorubicin.

4.5 FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV aktivieren PAR-1/2 Rezeptoren

Wie bereits in verschiedenen Studien beschrieben führt eine Aktivierung von PAR-1 mit FIIa oder SFLLRN sowie von PAR-2 mit FXa oder SLIGKV zu einem Anstieg der Phosphorylierung von ERK1/2 (pERK) [351-353]. Für HPDE und PANC-1 Zellen konnte gegenüber einer unbehandelten Kontrolle eine Induktion von pERK1/2 nach Stimulation mit FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV nachgewiesen werden (Abb. 38), die sich durch Vorinkubation der Zellen mit dem niedermolekularen ERK-Inhibitor PD98056 hemmen ließ. In beiden Zelllinien führte eine Stimulation mit den genannten PAR-Agonisten also zur Aktivierung von PAR-Signalwegen.

Die Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren auf THP-1 Zellen ist bereits in der Literatur bekannt. Kang et al. konnten 2005 für THP-1 Zellen die Aktivierung von PAR-2 Rezeptoren mit Trypsin an einer gesteigerten ERK-Phosphorylierung zeigen, die sich mit dem ERK-Inhibitor PD98059 hemmen ließ [354]. Zheng et al. (2007) konnten ebenfalls eine Aktivierung von PAR-1 in THP-1 Zellen mittels FIIa nur indirekt nachweisen [355].

4.6 FIIa, FXa, PAR-Agonisten und Erguss führen in HPDE und PANC-1 Zellen zu EMT-ähnliche Veränderungen

Die epitheliale-mesenchymale Transition ist ein wichtiger Promotor der Tumorigenese und beschreibt den Übergang basal-apikal polarisierter, epithelialer Gewebe zu fibroblastoiden, motilen und individuellen mesenchymalen Strukturen. Im Folgenden können Zellen den Gewebeverband verlassen und andere Gewebe infiltrieren. Dieser Übergang ist u.a. gekennzeichnet durch den Verlust des epithelialen Markerproteins E-Cadherin, das besonders Zell-Zell-Kontakte ausbildet, und damit für die epitheliale Integrität und Barrierefunktion sorgt. Im Gegenzug werden verstärkt mesenchymale Marker wie N-Cadherin, Vimentin, L1CAM, Slug und Snail induziert, die mit einer Änderung der Morphologie, Proliferation und Migrationsfähigkeit einhergehen [82-84].

Zur Untersuchung von EMT-assoziierten Veränderungen in Zelllinien bietet sich der Vergleich zwischen der pankreatischen, nicht tumorigenen, epithelialen, prä-EMT Zelllinie HPDE mit der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 an, die deutliche mesenchymale Charakteristika (erhöhte Expression von Vimentin, N-Cadherin, L1CAM, gesenkte Expression von E-Cadherin) aufweist [284, 285, 356]. Laut Literatur können Agonisten an PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren, wie FIIa, FXa, SFLLRN oder SLIGKV die Migrationsfähigkeit hemmen, aber auch induzieren [158, 159, 174, 175, 177, 219, 220, 357, 358]. Daher wurde untersucht, ob die verwendeten PAR-Agonisten einen Einfluss auf die EMT und somit das Migrationsverhalten von HPDE und PANC-1 Zellen haben.

4.6.1 Stimulation von PANC-1 Zellen mit PAR-Agonisten führt zu einer spindelförmigen Morphologie und einem veränderten Migrationsverhalten

Bei der mikroskopischen Begutachtung mit PAR-Agonisten stimulierter PANC-1 Zellen fiel immer wieder eine Änderung der Morphologie vom prismatischen zum spindelförmigen Phänotyp auf, die zu einem veränderten Migrationsverhalten der Zellen führten. Um zu quantifizieren, ob die spindelförmige Morphologie eine gesteigerte Migration der Zellen nach sich zieht, wurde mittels Petrischalen-Zellkultureinsätzen aus Silikon ein zellfreier Spalt zwischen zwei Wachstumsfronten geschaffen. Zeitabhängig konnten Zellen durch Proliferation (runde, prismatische Zellen, die im Zellverband liegen) oder durch Migration (einzelne, spindelförmige Zellen) in den

zellfreien Spalt eindringen, und dort mikroskopisch beobachtet werden. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden anschließend hinsichtlich der Proliferationsfront, Zellmorphologie und migrierter Zellen bewertet.

Mit 10 % (v/v) FCS stimulierte PANC-1 Zellen (normale Kulturbedingungen) zeigten nach 24 Stunden zwei deutlich ausgeprägte, sich geschlossen aufeinander zu bewegendes Proliferationsfronten mit definierten Zell-Zell-Kontakten und einer prismatischen Morphologie der Zellen (Abb. 39). Die unbehandelten, serumstarvierten PANC-1 Zellen zeigten dagegen zum gleichen Zeitpunkt eine deutlich zurück gebliebene, unruhige Zellfront, aus der etliche Einzelzellen mit fibroblastoider Morphologie heraus migriert waren und teilweise Stressfasern ausgebildet hatten, während der Großteil des Spaltes weiterhin zellfrei blieb. Die Supplementierung serumstarvierten Zellen mit 10 ng/ml des als Positivkontrolle eingesetzten EMT-Induktors TGF- β 1 zeigte gegenüber den anderen Ansätzen die am stärksten ausgeprägte spindelförmige bis fädig ausgezogene Morphologie der Zellen, die mit den meisten migrierten Zellen auf dem Foto sowie einer scharfen, an den Bildrändern zurückgebliebenen Proliferationsfront einherging. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Jungert et al. (2007) [359]. Im Vergleich zu unbehandelten, serumstarvierten Ansätzen führte die Stimulation mit 1 U/ml FIIa, 1 U/ml FXa, 100 μ M SFLLRN, 100 μ M SLIGKV oder 10 % (v/v) Erguss 860 zu einer verstärkten Migration sowie deutlicher ausgeprägten morphologischen Änderungen hin zur Spindelform der überwiegend vereinzelt liegenden Zellen, erreichte aber nicht das Ausmaß von TGF- β 1. Für einen Vergleich der Änderung im Migrationsverhalten durch die Stimulation sollten die migrierten Zellen quantifiziert werden. Die Schwierigkeit dabei lag in der Unterscheidung zwischen der Proliferationsfront und den migrierten Zellen, so dass diese Methode nur für die Bildgebung eingesetzt werden konnte.

Um die morphologische Änderung und das veränderte Migrationsvermögen weiter zu untersuchen, wurde ein Transwell-Migrationsassay zur Quantifizierung der Migration durchgeführt.

4.6.2 Einfluss von PAR-Agonisten auf das Migrationsverhalten von HPDE und PANC-1 Zellen

Für FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV konnte bereits in verschiedenen Tumorzelllinien ein Einfluss auf die Migrationsfähigkeit beschrieben werden [158, 159, 174, 175, 177, 219, 220, 357, 358]. Je nach verwendeter Zelllinie wurden den PAR-Agonisten dabei

inhibierende oder induzierende Effekte nachgewiesen. Um das in Kapitel 3.2.6 an PANC-1 Zellen beobachtete veränderte Migrationsverhalten zu quantifizieren, wurden die Migrationsraten von PANC-1 sowie HPDE Zellen im Transwell-Migrationsassay nach Stimulation mit PAR-Agonisten sowie TGF- β 1 als Positivkontrolle bestimmt.

HPDE Zellen, die für 24 Stunden mit SFLLRN, SLIGKV oder Erguss 670 stimuliert worden waren, zeigten eine erhöhte Migrationsrate im Ausmaß leicht höher als nach Stimulation mit TGF- β 1 (Abb. 41). Die Inkubation von HPDE Zellen mit FIIa, FXa sowie Erguss 660 und 688 hatte keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen.

PANC-1 Zellen, die mit FIIa, FXa oder SLIGKV stimuliert wurden, zeigten eine signifikant beinahe so hohe Migrationsrate wie mit TGF- β 1 stimulierte Zellen (Abb. 42). Eine Stimulation der Zellen mit SFLLRN führte zu einer ebenso hohen Migrationsrate, das Ergebnis war aber nicht signifikant. Die Ergüsse 660, 670 und 688 blieben ohne Einfluss auf die Migrationsrate von PANC-1 Zellen.

Diese Daten deuten zusammen mit den morphologischen Änderungen und dem leicht gehemmten Zellwachstum durch Stimulation mit PAR-Agonisten auf eine EMT durch Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren hin. Studien belegen, dass eine Aktivierung von PAR-1 in Mäusen mittels Plasmin bzw. Plasminogen zur EMT führt, die mit dem Verlust von E-Cadherin zugunsten von mesenchymalen Marken (u.a. α -SMA) einhergeht [360]. Im Alveolarepithel von Mäusen sowie einer humanen Alveolarepithel-Tumorzelllinie wurde ebenfalls eine EMT-assoziierte Veränderung beschrieben, allerdings vermittelt über PAR-4 [361]. Für PAR-2 liegen bisher keine Daten in diesem Zusammenhang vor. Durch Stimulation von HPDE Zellen mit PAR-Agonisten und Erguss 670 (Reizerguss) kam es ebenfalls zur Induktion einer spindelförmigen Morphologie, die sich in einer erhöhten Migrationsrate widerspiegelte.

Um diesen Hinweis auf eine PAR-1/2 vermittelte EMT in HPDE und PANC-1 Zellen nachzugehen, wurde zunächst auf transkriptionelle Änderungen in EMT-assoziierten Markerproteinen nach Stimulation mit PAR-Agonisten untersucht.

4.6.3 Das erhöhte Migrationsverhalten von HPDE und PANC-1 Zellen nach Stimulation mit PAR-Agonisten beruht nicht auf einer veränderten Expression EMT-assoziiierter Proteine

Der Verlust von epitheliale E-Cadherin kann ein erstes Anzeichen einer einsetzenden EMT sein, die mit einer gesteigerten Expression mesenchymaler Marker wie N-Cadherin und Vimentin sowie EMT-assoziiertem L1CAM einhergeht. In die Regulation dieser Proteine sind die Transkriptionsfaktoren Slug und Snail involviert, die bei der EMT (beispielsweise durch TGF- β 1 induziert) überexprimiert werden [92, 362]. In den untersuchten Zelllinien HPDE und PANC-1 wurden Änderungen in der Expression der genannten EMT-Marker mittels Realtime-PCR überprüft. Dafür wurden die serumstarvierten Zellen über 24, 48 und 72 Stunden mit FIIa, FXa, SFLLRN, SLIGKV und TGF- β 1 stimuliert, die mRNA isoliert und nach reverser Transkription quantifiziert. Als Kontrollgen diente das *housekeeping-gene* TBP.

In den nicht tumorigenen HPDE Zellen führte die Stimulation mit TGF- β 1 nicht zu einer Änderung der E-Cadherin Expression, jedoch zu einer Induktion von Vimentin, N-Cadherin, L1CAM, Slug und Snail (Abb. 43, 44), wie bereits von Geismann et al. (2009) beschrieben [287]. Darüber hinaus hatten die PAR-Agonisten FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV keinen Einfluss auf die Expression von E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, L1CAM, Slug und Snail.

In PANC-1 Zellen führte die Stimulation mit TGF- β 1 zeitabhängig zur einer EMT-typischen Abnahme der E-Cadherin Expression sowie einer deutlichen Induktion von N-Cadherin, Vimentin, Slug und Snail (Abb. 45, 46). Die Expression von L1CAM sank leicht nach 48 bis 72 Stunden. Wie in den HPDE Zellen hatten die PAR-Agonisten hingegen keinen Effekt auf die Expression von E-Cadherin, Vimentin, N-Cadherin, Slug und Snail. Die Expression von L1CAM zeigte sich nach 24 Stunden nicht signifikant erhöht, und sank dann zeitabhängig auf den Ausgangswert ab.

Insgesamt ließ sich feststellen, dass die eingesetzten PAR-1 und PAR-2 Agonisten keinen transkriptionellen Einfluss auf die Expression der untersuchten epithelialen und mesenchymalen Marker in PANC-1 und HDPE Zellen hatten. Die Daten bezüglich der Stimulation von PANC-1 Zellen mit TGF- β 1 decken sich mit der Literatur [359, 363, 364].

Zusammenfassend sprechen die erhobenen Daten kaum für eine transkriptionell bedingte Expressionsänderung von epithelialen und mesenchymalen

Markerproteinen in HPDE und PANC-1 Zellen durch Stimulation mit den PAR-Agonisten FIIa, FXa, SFLLRN und SLIGKV. Daher wurde untersucht, ob die PAR-Agonisten einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von E-Cadherin in HPDE und PANC-1 Zellen haben.

4.6.4 PAR-Agonisten führen zu einer Delokalisierung von E-Cadherin in HPDE und PANC-1 Zellen

E-Cadherin ist ein wesentlicher Bestandteil von Desmosomen und *Adherens junctions* und stabilisiert so über Zellkontakte den Zusammenhalt epithelialer Gewebe [365]. Im Rahmen der EMT kommt es einerseits zu einer transkriptionellen Expressionsänderung von Markerproteinen und andererseits zu einer Umverteilung der Proteine in der Zelle. Im Fall von E-Cadherin wird dieses dann nicht mehr membranständig, sondern zytoplasmatisch exprimiert und dort degradiert, was durch Auflösung von Zell-Zell-Kontakten zu einer Auflockerung des Zellverbandes führt [289]. Da die eingesetzten PAR-Agonisten in HPDE und PANC-1 Zellen keinen Einfluss auf die transkriptionell regulierte Expression von E-Cadherin zeigten, wurde im folgenden der Einfluss auf die zelluläre Verteilung von E-Cadherin untersucht. Eine Delokalisierung membranständigen E-Cadherins ins Zellinnere könnte der beobachteten spindelförmigen Morphologie und dem veränderten Migrationsverhalten zugrunde liegen.

Für diese Untersuchungen wurden HPDE und PANC-1 Zellen stimuliert, permeabilisiert und E-Cadherin immunologisch angefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigte sich für unbehandelte HPDE Zellen nach 48 Stunden eine deutliche Anreicherung des E-Cadherins membranständig in den gut erkennbaren Zell-Zell-Kontakten (Abb. 47). Eine vesikuläre oder perinukleäre Lokalisation des E-Cadherins konnte nicht beobachtet werden. Die Stimulation mit TGF- β 1 als Positivkontrolle führte ebenso wie mit PAR-Agonisten zu einer Abnahme membranständigen E-Cadherins und einer Zunahme des zytosolischen, vesikulären, tendenziell perinukleär lokalisierten E-Cadherins. Dies ging einher mit einer nahezu vollständigen Auflösung der Zell-Zell-Kontakte und der Ausbildung von Aktin-Stressfasern. Der Zellverband zeigte sich aufgelockert, die Zellen hatten weniger Kontakte untereinander. Mit FIIa stimulierte HPDE Zellen zeigten teilweise noch deutlich markierte Zellkontakte, d. h. membranständiges E-Cadherin. Eine Inkubation der HPDE Zellen mit 10 % (v/v) Erguss 660 (Ovarialkarzinom), 670 (Reizerguss)

oder 688 (Pneumonie) führte zur bereits bei den isolierten Faktoren beobachteten Delokalisierung des E-Cadherins aus den Zellkontakten und der resultierenden Auflösung der Zellkontakte. Im Falle der Ergüsse 660 und 688 ist zusätzlich eine ausgeprägte Spindelform einiger Zellen zu erkennen. Trotzdem führte nur der Erguss 670 zu einer gesteigerten Migrationsrate im Transwell-Migrationsassay (Abb. 41). Eine Hemmung der Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa im Erguss mit Lepirudin und Rivaroxaban könnte deren Einfluss in diesem Kontext aufklären.

Unbehandelte PANC-1 Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung des E-Cadherins in der ganzen Zelle, was im Einklang mit dem bereits beschriebenen, hoch-malignen Phänotyp steht (Abb. 48). Zell-Zell-Kontakte sind vorhanden, fallen aber nicht durch eine Anreicherung von E-Cadherin auf. Dieser Zustand zeigt einen gegenüber den HPDE Zellen bereits fortgeschrittenen EMT-Status der unbehandelten PANC-1 Zellen an [366]. Eine Stimulation über 24 Stunden mit TGF- β 1 oder den PAR-Agonisten führte zu einer Delokalisierung des restlichen membranständigen E-Cadherins ins Zytoplasma. Damit einher ging eine Auflösung der Zellkontakte gefolgt von einer teilweise ausgeprägten spindelförmigen Morphologie der PANC-1 Zellen. Der Erguss 660 (Ovariakarzinom) führte nach 24-stündiger Inkubation in PANC-1 Zellen zu keiner Delokalisierung von E-Cadherin aus den Zellkontakten. Die Zellen zeigten weiterhin eine prismatische Morphologie und wiesen eine schwach ausgeprägte Zunahme von E-Cadherin in den Zell-Zell-Kontakten auf. Eine 24-stündige Inkubation von PANC-1 Zellen mit Erguss 670 (Reizerguss) oder 688 (Pneumonie) führte zu einer Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin bevorzugt perinukleär ins Zytosol, gefolgt von der Auflösung der Zellkontakte, einer Auflockerung des Zellverbandes und einer spindelförmigen Morphologie. Die Effekte einer Inkubation der PANC-1 Zellen mit Ergüssen sind im Ausmaß mit dem Effekt von TGF- β 1 sowie den Effekten der PAR-Agonisten vergleichbar.

Winter et al. (2006) haben *in-vitro* eine PAR-2 vermittelte Aufhebung der E-Cadherin Adhäsion und eine damit einhergehende Beeinträchtigung der Epithelbarriere der Atemwege festgestellt [367]. McDonald et al. (2008) postulieren den PAR-1 Rezeptor als einen wesentlichen Migrations-Regulator während der Embryogenese und Metastasierung [368]. So soll PAR-1 essentiell für die apikal-basale Polarität des Epithels sein, eine Grundvoraussetzung für eine einwandfreie Trennung der Zelle von ihren Nachbarzellen sowie für die gerichtete Migration. Einer FIIa induzierten Inhibition von Rac-1 und Induktion von RhoA, intrazellulären PAR Rezeptor

assoziierten Kinasen, wird der Zusammenbruch der Barrierefunktion von Endothelzellen durch Umorganisation des Zytoskeletts zugeschrieben [369].

In diesem Versuch konnte durch Stimulation von HPDE und PANC-1 Zellen mit PAR-Agonisten eine Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin ins Zytosol nachgewiesen werden. Die Effekte auf HPDE und PANC-1 Zellen waren ähnlich, wenn auch in den nicht-tumorigenen HPDE Zellen stärker ausgeprägt gegenüber den PANC-1 Zellen. Ein Grund hierfür kann der noch sehr stark ausgeprägte epitheliale Phänotyp der HPDE Zellen mit einer deutlichen transmembranständigen E-Cadherin Expression sein, der eine intensivere Delokalisierung von E-Cadherin ins Zytosol zulässt. Dagegen ist in PANC-1 Zellen, die die EMT schon weitestgehend durchlaufen haben (reduzierte Expression von E-Cadherin, stärkere Expression von Vimentin, N-Cadherin und L1CAM), nur eine schwach ausgeprägte Delokalisierung von E-Cadherin zu beobachten.

Obwohl die Ergüsse 670 und 688 zu einer Delokalisation von E-Cadherin aus den Zellkontakten von PANC-1 Zellen führten, konnte kein gesteigertes Migrationsverhalten im Transwell-Migrationsassay beobachtet werden. Dagegen zeigte Erguss 660 keinen Einfluss auf die Lokalisation von E-Cadherin in PANC-1 Zellen, was mit ausbleibenden Effekt auf die Migration im Einklang stand. Die Delokalisierung von E-Cadherin und Induktion einer deutlichen Spindelform in HPDE Zellen durch Erguss 660 und 688 resultierte ebenfalls nicht in einer gesteigerten Migrationsrate im Transwell-Migrationsassay. Nur die Auflösung der Zellkontakte der HPDE Zellen durch Delokalisierung von E-Cadherin nach Stimulation mit Erguss 670 ging auch mit einem gesteigerten Migrationsverhalten in diesen Zellen einher. Insgesamt waren in den HPDE Zellen aufgrund des prä-EMT Status der Zellen stärkere Effekte durch PAR-Agonisten und Ergüsse zu erwarten, als in den bereits deutliche Charakteristika einer EMT aufweisenden PANC-1 Zellen, was aber nicht bestätigt werden konnte. Daher sind vermutlich noch andere Mechanismen involviert, die zu einer Steigerung der Migrationsfähigkeit führen. Denkbar sind die Expression und Lokalisation weiterer Zellkontakte bildender Proteine wie z.B. Occludin, Cadherine oder Aktin.

Zusammenfassend induzierten PAR-Agonisten in HPDE und PANC-1 Zellen die Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin ins Zytoplasma, wodurch die Zellkontakte der Zellen sowie der Gewebeverband aufgelöst wurden. Im Ausmaß waren die Effekte mit dem des EMT-Induktors TGF- β 1 vergleichbar. Benigne und maligne

Ergüsse führten darüber hinaus zusätzlich zu einer stark ausgeprägten spindelförmigen Morphologie in HPDE Zellen, wobei dies nur bei einem benignen Erguss mit einer gesteigerten Migrationsrate einher ging. Dagegen führten maligne Ergüsse zu einer Delokalisierung von E-Cadherin, jedoch nicht zu einer gesteigerten Migrationsrate der Zellen. Eine Untersuchung weiterer Ergüsse und die Hemmung der Gerinnungsfaktoren in den Ergüssen mit Lepirudin und Rivaroxaban hätte hier möglicherweise den Nachweis erbringen können, dass die Gerinnungsfaktoren in den Ergüssen in die EMT involviert sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass maligne Ergüsse einen proliferationshemmenden Effekt auf Tumorzellen (PANC-1, THP-1) haben, der zumindest teilweise auf den enthaltenen Gerinnungsfaktoren FIIa und FXa beruht. FIIa scheint neben weiteren Faktoren im Erguss eine PAR-1 abhängige Chemoresistenz in THP-1 Zellen zu vermitteln, was sich durch Inkubation der Zellen mit FIIa und SFLLRN bestätigte. FIIa, FXa, die synthetischen Hexapeptide SFLLRN und SLIGKV sowie teilweise auch die Ergüsse führten in HPDE und PANC-1 Zellen über eine Aktivierung exprimierter PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren zu einer Auflösung epithelialer Zellkontakte durch Delokalisierung von E-Cadherin ins Zellinnere. Dort konnte das E-Cadherin teilweise perinukleär und in Vesikeln gespeichert nachgewiesen werden. Aus dem Verlust der epithelialen Gewebeintegrität resultierte ein Verlust der Stabilität des Zytoskeletts. Die Zellen bildeten Aktin-Stressfasern aus. Aus diesen Änderungen resultierte eine teilweise erhöhte Zellmotilität, die anhand einer gesteigerten Migration gemessen werden konnte. Eine Stimulation mit Erguss 670 führte zu dem gleichen Effekt, wobei auch andere Faktoren aus dem Erguss dazu beizutragen scheinen.

Die beobachteten Änderungen nach PAR-Stimulation gingen in HPDE und PANC-1 Zellen nicht mit den typischen transkriptionellen Expressionsänderungen epithelialer und mesenchymaler Marker einer EMT einher, wie es anhand der Stimulation mit TGF- β 1 gezeigt werden konnte.

Die Befunde dieser Arbeit untermauern, dass das Ergussmilieu bzw. die darin befindlichen Gerinnungsfaktoren direkte zellbiologische Effekte auf Tumorzellen aber auch schon auf deren Vorläuferzellen haben können. Weitere Untersuchungen, besonders die Überprüfung, inwieweit eine Therapie mit Antikoagulantien das

Ergussmilieu und die Tumorzellen (z.B. EMT, Ansprechen auf Zytostatika) beeinflusst, erscheinen vor dem Hintergrund dieser Arbeit sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Ein prokoagulatorischer Status ist ein typisches Symptom von Tumorerkrankungen und deren Progression und geht mit der Entwicklung tiefer Venenthrombosen sowie maligner Ergüsse einher, in denen Gerinnungsfaktoren nachgewiesen werden können. Die raumfordernden Ergüsse führen je nach Lokalisation und Umfang des Ergusses zu Brust- oder Abdominalschmerzen, Atemnot, Husten, Erbrechen, Verdauungsstörungen, Anorexie und Kachexie, Nausea sowie einer eingeschränkten Beweglichkeit, und senken die Lebensqualität der Betroffenen erheblich. Die Therapieoptionen sind spärlich, oft bleibt nur eine wiederholte Punktion der rasch rezidivierenden Ergüsse.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von PAR-Agonisten (Thrombin, SFLLRN, Faktor Xa, SLIGKV) auf die Proliferation, das Ansprechen auf Zytostatika, die Epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) und daraus folgende Änderungen im Migrationsverhalten von Tumorzellen untersucht. Ziel war es, das Verständnis der Rolle von Gerinnungsfaktoren im Ergussmilieu und im Rahmen des Metastasierungsprozesses weiter aufzuklären, um möglichen Therapieansätzen mit Gerinnungsinhibitoren den Boden zu bereiten.

107 Ergüsse aus klinisch notwendigen Punktionen wurden gesammelt, die enthaltenen Zellen isoliert und kultiviert sowie die Ergüsse nach Geschlecht und Diagnose zum Zeitpunkt des Ergusses in maligne und benigne Ergüsse charakterisiert. In einer koagulometrischen Untersuchung an 72 Ergüssen konnten alle Gerinnungsfaktoren der extrinsischen Kaskade (Faktor II, V, VII, X, Fibrinogen, Protein C, Antithrombin III) im Erguss nachgewiesen werden. Die klinischen Marker für ein aktiviertes Gerinnungssystem, D-Dimere und F1+2 Fragmente, waren deutlich erhöht. In einem chromogenen Aktivitätsassay konnten nur geringe Aktivitäten Faktor IIa und Faktor Xa im Erguss nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten ein deutlich aktiviertes Gerinnungssystem in benignen und malignen Ergüssen, was die Frage nach deren Einfluss auf die im Erguss enthaltenen Tumorzellen aufwirft. Die aus Ergüssen isolierten Tumorzellen exprimierten membranständige PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren, über die Thrombin und Faktor Xa zellbiologische Effekte vermitteln können. Auf der als Modellzellen eingesetzten humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie PANC-1, der humanen monozytären Tumorzelllinie THP-

1 und der nicht-tumorigenen humanen pankreatischen Epithelzelllinie HPDE konnten PAR-1 und PAR-2 Rezeptoren in unterschiedlicher Dichte nachgewiesen werden. HPDE und PANC-1 Zellen zeigten darüber hinaus eine starke intrazelluläre, granuläre Expression beider Rezeptoren.

Eine Supplementierung des Kulturmediums von THP-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss führte bei 60 getesteten Ergüssen im Mittel zu einer Hemmung des Zellwachstums in unbehandelten und mit Carboplatin oder Doxorubicin behandelten Zellen. Ergüsse weiblicher Patientinnen mit benigner Diagnose oder gastrointestinaler Krebserkrankung führten teilweise zu deutlich erhöhten Zellzahlen in unbehandelten und Zytostatikum behandelten Ansätzen, was einer Resistenz entspricht. Höhere FII Aktivitäten im Erguss korrelierten mit einer Hemmung des Zellwachstums in unbehandelten und mit Carboplatin behandelten Zellen. Stimulation der THP-1 Zellen mit PAR-Agonisten führte zu einer Hemmung des Zellwachstums sowie einer Chemoresistenz gegen Carboplatin und Doxorubicin. Die Stimulation mit PAR-Agonisten zeigte keinen konzentrationsabhängigen Einfluss auf das Zellwachstum von PANC-1 Zellen sowie das Ansprechen der Zellen auf Zytostatika. Eine Supplementierung des Kulturmediums von PANC-1 Zellen mit 10 % (v/v) Erguss führte bei den 10 getesteten Ergüssen im Mittel ebenfalls zu einer Hemmung des Zellwachstums. Die Hemmung von im Erguss enthaltenen Thrombin und Faktor Xa blieb ohne Einfluss auf das Zellwachstum was eine Rolle der Gerinnungsinhibitoren am proliferationsinhibierenden Effekt ausschließt.

Abschließend wurde der Einfluss von PAR-Agonisten auf die EMT untersucht. PAR-Agonisten zeigten in HPDE und PANC-1 Zellen keinen transkriptionellen Einfluss auf die Expression der EMT-assoziierten Proteine E-Cadherin, Vimentin, N-Cadherin, L1CAM, Slug und Snail, aber induzierten eine Delokalisierung von membranständigem E-Cadherin ins Zytosol, eine Auflösung von Zellkontakten sowie eine spindelförmige Morphologie. Diese zellbiologischen Veränderungen führten zu einer erhöhten Migrationsfähigkeit sowohl der nicht-tumorigenen HPDE Zellen als auch der in der EMT weit fortgeschrittenen Karzinomzelllinie PANC-1.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine tumorfördernde Wirkung von Gerinnungsfaktoren auf tumorigene und nicht-tumorigene Zellen und leisten somit einen Beitrag zum Verständnis der Rolle der Gerinnungsfaktoren im Ergussmilieu und im Rahmen von Metastasierungsprozessen. Dies zeigt die Notwendigkeit einer antikoagulatorischen Therapie in Tumorpatienten oder zur Tumorphylaxe.

6 Literaturverzeichnis

1. Destatis. *Todesursachen: Anzahl der Gestorbenen nach Kapiteln der International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD-10)*. 2011 [cited 16.05. 2011]; Available from: <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Statistiken/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/Content75/GestorbeneAnzahl,templateId=renderPrint.psml>.
2. RKI. *Krebs in Deutschland*. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2010 [cited 16.05. 2011]; 7. Ausgabe:[Available from: http://www.rki.de/clin_160/nn_204124/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2010,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2010.pdf].
3. Wagener C. and Müller O., *Molekulare Onkologie*. 3., komplett aktualisierte und erw. Aufl. ed. 2010, Stuttgart [u.a.]: Thieme.
4. Kaltenberg K., *Mutationanalysis from tumorsuppressorgene PTEN in prostate cancers*, in *Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin*. 2002: Berlin.
5. Croce C.M., *Oncogenes and cancer*. N Engl J Med, **2008**. 358(5): p. 502-11.
6. Hengstler J.G., Bogdanffy M.S., Bolt H.M., and Oesch F., *Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, **2003**. 43: p. 485-520.
7. Konopka J.B., Watanabe S.M., Singer J.W., Collins S.J., and Witte O.N., *Cell lines and clinical isolates derived from Ph1-positive chronic myelogenous leukemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1985**. 82(6): p. 1810-4.
8. Tsujimoto Y., Gorham J., Cossman J., Jaffe E., and Croce C.M., *The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining*. Science, **1985**. 229(4720): p. 1390-3.
9. Finger L.R., Harvey R.C., Moore R.C., Showe L.C., and Croce C.M., *A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia*. Science, **1986**. 234(4779): p. 982-5.
10. Kopnin B.P., *Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis*. Biochemistry (Mosc), **2000**. 65(1): p. 2-27.
11. Xia W., Bacus S., Husain I., Liu L., Zhao S., Liu Z., Moseley M.A., 3rd, Thompson J.W., Chen F.L., Koch K.M., and Spector N.L., *Resistance to ErbB2 tyrosine kinase inhibitors in breast cancer is mediated by calcium-dependent activation of RelA*. Mol Cancer Ther, **2010**. 9(2): p. 292-9.
12. Minamoto T., Mai M., and Ronai Z., *K-ras mutation: early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorectal, pancreas, and lung cancers--a review*. Cancer Detect Prev, **2000**. 24(1): p. 1-12.
13. Muller P.A., Vousden K.H., and Norman J.C., *p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion*. J Cell Biol, **2011**. 192(2): p. 209-18.
14. Wienholds E. and Plasterk R.H., *MicroRNA function in animal development*. FEBS Lett, **2005**. 579(26): p. 5911-22.

15. Kwak P.B., Iwasaki S., and Tomari Y., *The microRNA pathway and cancer*. *Cancer Sci*, **2010**. 101(11): p. 2309-15.
16. Lujambio A. and Esteller M., *CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer*. *Cell Cycle*, **2007**. 6(12): p. 1455-9.
17. Schroeder M. and Mass M.J., *CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, **1997**. 235(2): p. 403-6.
18. Peserico A. and Simone C., *Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance*. *J Biomed Biotechnol*, **2011**. 2011: p. 371832.
19. Johnson C.A., Goddard J.P., and Adams R.L., *The effect of histone H1 and DNA methylation on transcription*. *Biochem J*, **1995**. 305 (Pt 3): p. 791-8.
20. Ballestar E. and Esteller M., *The epigenetic breakdown of cancer cells: from DNA methylation to histone modifications*. *Prog Mol Subcell Biol*, **2005**. 38: p. 169-81.
21. Kondo Y., Shen L., and Issa J.P., *Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer*. *Mol Cell Biol*, **2003**. 23(1): p. 206-15.
22. Varier R.A. and Timmers H.T., *Histone lysine methylation and demethylation pathways in cancer*. *Biochim Biophys Acta*, **2011**. 1815(1): p. 75-89.
23. Tryndyak V.P., Kovalchuk O., and Pogribny I.P., *Loss of DNA methylation and histone H4 lysine 20 trimethylation in human breast cancer cells is associated with aberrant expression of DNA methyltransferase 1, Suv4-20h2 histone methyltransferase and methyl-binding proteins*. *Cancer Biol Ther*, **2006**. 5(1): p. 65-70.
24. Hanahan D. and Weinberg R.A., *The hallmarks of cancer*. *Cell*, **2000**. 100(1): p. 57-70.
25. Murray A., *Cell cycle checkpoints*. *Curr Opin Cell Biol*, **1994**. 6(6): p. 872-6.
26. Schwartz G.K. and Shah M.A., *Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy*. *J Clin Oncol*, **2005**. 23(36): p. 9408-21.
27. Johnson D.G. and Walker C.L., *Cyclins and cell cycle checkpoints*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **1999**. 39: p. 295-312.
28. Morgan D.O., *Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **1997**. 13: p. 261-91.
29. Besson A., Dowdy S.F., and Roberts J.M., *CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond*. *Dev Cell*, **2008**. 14(2): p. 159-69.
30. Slingerland J. and Pagano M., *Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer*. *J Cell Physiol*, **2000**. 183(1): p. 10-7.
31. Polyak K., Kato J.Y., Solomon M.J., Sherr C.J., Massague J., Roberts J.M., and Koff A., *p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest*. *Genes Dev*, **1994**. 8(1): p. 9-22.
32. Johannessen L.E., Knardal S.L., and Madshus I.H., *Epidermal growth factor increases the level of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21/CIP1 (CDK-interacting protein 1) in A431 cells by increasing the half-lives of the p21/CIP1 transcript and the p21/CIP1 protein*. *Biochem J*, **1999**. 337 (Pt 3): p. 599-606.

33. Sutherland R.L. and Musgrove E.A., *Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models*. Breast Cancer Res, **2002**. 4(1): p. 14-7.
34. Tan P., Cady B., Wanner M., Worland P., Cukor B., Magi-Galluzzi C., Lavin P., Draetta G., Pagano M., and Loda M., *The cell cycle inhibitor p27 is an independent prognostic marker in small (T1a,b) invasive breast carcinomas*. Cancer Res, **1997**. 57(7): p. 1259-63.
35. Czerniak B., Herz F., Koss L.G., and Schlom J., *ras oncogene p21 as a tumor marker in the cytodagnosis of gastric and colonic carcinomas*. Cancer, **1987**. 60(10): p. 2432-6.
36. Greenberg A.H., *Granzyme B-induced apoptosis*. Adv Exp Med Biol, **1996**. 406: p. 219-28.
37. Chen G. and Goeddel D.V., *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, **2002**. 296(5573): p. 1634-5.
38. Hsu H., Xiong J., and Goeddel D.V., *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. Cell, **1995**. 81(4): p. 495-504.
39. Hsu H., Shu H.B., Pan M.G., and Goeddel D.V., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, **1996**. 84(2): p. 299-308.
40. Popov S.G., Villasmi R., Bernardi J., Grene E., Cardwell J., Popova T., Wu A., Alibek D., Bailey C., and Alibek K., *Effect of Bacillus anthracis lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells*. FEBS Lett, **2002**. 527(1-3): p. 211-5.
41. Tesh V.L., *Induction of apoptosis by Shiga toxins*. Future Microbiol, **2010**. 5(3): p. 431-53.
42. Ilmarinen-Salo P., Moilanen E., and Kankaanranta H., *Nitric oxide induces apoptosis in GM-CSF-treated eosinophils via caspase-6-dependent lamin and DNA fragmentation*. Pulm Pharmacol Ther, **2010**. 23(4): p. 365-71.
43. Billig H., Chun S.Y., Eisenhauer K., and Hsueh A.J., *Gonadal cell apoptosis: hormone-regulated cell demise*. Hum Reprod Update, **1996**. 2(2): p. 103-17.
44. Haupt S., Berger M., Goldberg Z., and Haupt Y., *Apoptosis - the p53 network*. J Cell Sci, **2003**. 116(Pt 20): p. 4077-85.
45. Du H., Wolf J., Schafer B., Moldoveanu T., Chipuk J.E., and Kuwana T., *BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak*. J Biol Chem, **2011**. 286(1): p. 491-501.
46. Baliga B. and Kumar S., *Apaf-1/cytochrome c apoptosome: an essential initiator of caspase activation or just a sideshow?* Cell Death Differ, **2003**. 10(1): p. 16-8.
47. Philipp J., Dienst A., Unruh M., Wagener A., Grunow A., Engert A., Fries J.W., and Gottstein C., *Soluble tissue factor induces coagulation on tumor endothelial cells in vivo if coadministered with low-dose lipopolysaccharides*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **2003**. 23(5): p. 905-10.
48. Sakahira H., Enari M., and Nagata S., *Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis*. Nature, **1998**. 391(6662): p. 96-9.
49. Mills J.C., Stone N.L., and Pittman R.N., *Extranuclear apoptosis. The role of the cytoplasm in the execution phase*. J Cell Biol, **1999**. 146(4): p. 703-8.

50. Janicke R.U., Sprengart M.L., Wati M.R., and Porter A.G., *Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis*. J Biol Chem, **1998**. 273(16): p. 9357-60.
51. Schlegel R.A., Callahan M.K., and Williamson P., *The central role of phosphatidylserine in the phagocytosis of apoptotic thymocytes*. Ann N Y Acad Sci, **2000**. 926: p. 217-25.
52. Ghavami S., Hashemi M., Ande S.R., Yeganeh B., Xiao W., Eshraghi M., Bus C.J., Kadkhoda K., Wiechec E., Halayko A.J., and Los M., *Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes*. J Med Genet, **2009**. 46(8): p. 497-510.
53. LaCasse E.C., Baird S., Korneluk R.G., and MacKenzie A.E., *The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer*. Oncogene, **1998**. 17(25): p. 3247-59.
54. Pettaway C.A., *Prognostic markers in clinically localized prostate cancer*. Tech Urol, **1998**. 4(1): p. 35-42.
55. Kondo N., Takahashi A., Ono K., and Ohnishi T., *DNA damage induced by alkylating agents and repair pathways*. J Nucleic Acids, **2010**. 2010: p. 543531.
56. Banath J.P. and Olive P.L., *Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks*. Cancer Res, **2003**. 63(15): p. 4347-50.
57. Noordhuis P., Holwerda U., Van der Wilt C.L., Van Groeningen C.J., Smid K., Meijer S., Pinedo H.M., and Peters G.J., *5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers*. Annals of Oncology, **2004**. 15(7): p. 1025-1032.
58. Prakasha Gowda A.S., Polizzi J.M., Eckert K.A., and Spratt T.E., *Incorporation of Gemcitabine and Cytarabine into DNA by DNA Polymerase β and Ligase III/XRCC1*. Biochemistry, **2010**. 49(23): p. 4833-4840.
59. Chu E., Drake J.C., Boorman D., Baram J., and Allegra C.J., *Mechanism of thymidylate synthase inhibition by methotrexate in human neoplastic cell lines and normal human myeloid progenitor cells*. J Biol Chem, **1990**. 265(15): p. 8470-8.
60. Senderowicz A.M., *Flavopiridol: the First Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor in Human Clinical Trials*. Investigational New Drugs, **1999**. 17(3): p. 313-320.
61. Long B.H. and Fairchild C.R., *Paclitaxel Inhibits Progression of Mitotic Cells to G1 Phase by Interference with Spindle Formation without Affecting Other Microtubule Functions during Anaphase and Telephase*. Cancer Research, **1994**. 54(16): p. 4355-4361.
62. Jordan M.A., Thrower D., and Wilson L., *Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis*. J Cell Sci, **1992**. 102 (Pt 3): p. 401-16.
63. Wagner A.J., Malinowska-Kolodziej I., Morgan J.A., Qin W., Fletcher C.D., Vena N., Ligon A.H., Antonescu C.R., Ramaiya N.H., Demetri G.D., Kwiatkowski D.J., and Maki R.G., *Clinical activity of mTOR inhibition with sirolimus in malignant perivascular epithelioid cell tumors: targeting the pathogenic activation of mTORC1 in tumors*. J Clin Oncol, **2010**. 28(5): p. 835-40.
64. Llovet J.M. and Bruix J., *Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, **2008**. 48(4): p. 1312-1327.

65. Stavrovskaya A.A., *Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells*. Biochemistry (Mosc), **2000**. 65(1): p. 95-106.
66. Lippert T.H., Ruoff H.J., and Volm M., *Resistance in malignant tumors: can resistance assays optimize cytostatic chemotherapy?* Pharmacology, **2008**. 81(3): p. 196-203.
67. Simon S.M. and Schindler M., *Cell biological mechanisms of multidrug resistance in tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1994**. 91(9): p. 3497-504.
68. Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman M.M., Pastan I., and Willingham M.C., *Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1987**. 84(21): p. 7735-8.
69. Miller D.S., *Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier*. Trends Pharmacol Sci, **2010**. 31(6): p. 246-54.
70. Marie J.P., Zhou D.C., Gurbuxani S., Legrand O., and Zittoun R., *MDR1/P-glycoprotein in haematological neoplasms*. Eur J Cancer, **1996**. 32A(6): p. 1034-8.
71. Goldstein L.J., Galski H., Fojo A., Willingham M., Lai S.L., Gazdar A., Pirker R., Green A., Crist W., Brodeur G.M., and et al., *Expression of a multidrug resistance gene in human cancers*. J Natl Cancer Inst, **1989**. 81(2): p. 116-24.
72. Hopper E., Belinsky M.G., Zeng H., Tosolini A., Testa J.R., and Kruh G.D., *Analysis of the structure and expression pattern of MRP7 (ABCC10), a new member of the MRP subfamily*. Cancer Lett, **2001**. 162(2): p. 181-91.
73. Loe D.W., Deeley R.G., and Cole S.P., *Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP*. Eur J Cancer, **1996**. 32A(6): p. 945-57.
74. Grant C.E., Valdimarsson G., Hipfner D.R., Almquist K.C., Cole S.P., and Deeley R.G., *Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs*. Cancer Res, **1994**. 54(2): p. 357-61.
75. Tew K.D., *Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance*. Cancer Res, **1994**. 54(16): p. 4313-20.
76. Mishra P.J., Humeniuk R., Longo-Sorbello G.S., Banerjee D., and Bertino J.R., *A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**. 104(33): p. 13513-8.
77. Rasheed Z.A. and Rubin E.H., *Mechanisms of resistance to topoisomerase I-targeting drugs*. Oncogene, **2003**. 22(47): p. 7296-304.
78. Chu G., *Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair*. J Biol Chem, **1994**. 269(2): p. 787-90.
79. O'Connor P.M., Jackman J., Bae I., Myers T.G., Fan S., Mutoh M., Scudiero D.A., Monks A., Sausville E.A., Weinstein J.N., Friend S., Fornace A.J., Jr., and Kohn K.W., *Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents*. Cancer Res, **1997**. 57(19): p. 4285-300.
80. Landowski T.H., Gleason-Guzman M.C., and Dalton W.S., *Selection for drug resistance results in resistance to Fas-mediated apoptosis*. Blood, **1997**. 89(6): p. 1854-61.

81. Gazitt Y., Rothenberg M.L., Hilsenbeck S.G., Fey V., Thomas C., and Montegomrey W., *Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells*. Int J Oncol, **1998**. 13(4): p. 839-48.
82. Lee J.M., Dedhar S., Kalluri R., and Thompson E.W., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. J Cell Biol, **2006**. 172(7): p. 973-81.
83. Kang Y. and Massague J., *Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis*. Cell, **2004**. 118(3): p. 277-9.
84. Thiery J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. Nat Rev Cancer, **2002**. 2(6): p. 442-54.
85. Perez-Moreno M., Jamora C., and Fuchs E., *Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions*. Cell, **2003**. 112(4): p. 535-48.
86. Nawshad A., Lagamba D., Polad A., and Hay E.D., *Transforming growth factor-beta signaling during epithelial-mesenchymal transformation: implications for embryogenesis and tumor metastasis*. Cells Tissues Organs, **2005**. 179(1-2): p. 11-23.
87. Thiery J.P. and Sleeman J.P., *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, **2006**. 7(2): p. 131-42.
88. Katsumoto T., Mitsushima A., and Kurimura T., *The role of the vimentin intermediate filaments in rat 3Y1 cells elucidated by immunoelectron microscopy and computer-graphic reconstruction*. Biol Cell, **1990**. 68(2): p. 139-46.
89. Bindels S., Mestdagt M., Vandewalle C., Jacobs N., Volders L., Noel A., van Roy F., Berx G., Foidart J.M., and Gilles C., *Regulation of vimentin by SIP1 in human epithelial breast tumor cells*. Oncogene, **2006**. 25(36): p. 4975-85.
90. Derycke L.D. and Bracke M.E., *N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling*. Int J Dev Biol, **2004**. 48(5-6): p. 463-76.
91. Geismann C.U., *Beteiligung des promigratorischen Moleküls L1CAM an der Epithelialen Mesenchymalen Transition des pankreatischen Gangepithels*. 2010, Christian-Albrechts-Universität: Kiel.
92. Sabbah M., Emami S., Redeuilh G., Julien S., Prevost G., Zimber A., Ouelaa R., Bracke M., De Wever O., and Gespach C., *Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers*. Drug Resist Updat, **2008**. 11(4-5): p. 123-51.
93. Xie L., Law B.K., Chytil A.M., Brown K.A., Aakre M.E., and Moses H.L., *Activation of the Erk pathway is required for TGF-beta1-induced EMT in vitro*. Neoplasia, **2004**. 6(5): p. 603-10.
94. Willis B.C. and Borok Z., *TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, **2007**. 293(3): p. 13.
95. Conacci-Sorrell M., Zhurinsky J., and Ben-Ze'ev A., *The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer*. J Clin Invest, **2002**. 109(8): p. 987-91.
96. Natalwala A., Spychal R., and Tselepis C., *Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract*. World J Gastroenterol, **2008**. 14(24): p. 3792-7.

97. Moustakas A. and Heldin C.H., *Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression*. Cancer Sci, **2007**. 98(10): p. 1512-20.
98. Andreasen P.A., Kjoller L., Christensen L., and Duffy M.J., *The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review*. Int J Cancer, **1997**. 72(1): p. 1-22.
99. *Die Onkologie ; 1. Allgemeiner Teil. 2., aktualisierte Aufl. ed*, ed. W. Hiddemann and C.R. Bartram. 2010, Heidelberg: Springer-Medizin-Verl.
100. Ray M.R. and Jablons D.M., *Hallmarks of Metastasis*. 2010.
101. Rickles F.R., Hair G.A., Zeff R.A., Lee E., and Bona R.D., *Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells*. Thromb Haemost, **1995**. 74(1): p. 391-5.
102. Ghadimi B.M. and Schlag P.M., *[Tumor metastasis. Molecular principles and therapeutic options]*. Chirurg, **1998**. 69(12): p. 1315-22.
103. Sica A., Schioppa T., Mantovani A., and Allavena P., *Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy*. European journal of cancer (Oxford, England : 1990), **2006**. 42(6): p. 717-727.
104. Sahn S.A., *Malignancy metastatic to the pleura*. Clin Chest Med, **1998**. 19(2): p. 351-61.
105. Olopade O.I. and Ultmann J.E., *Malignant effusions*. CA Cancer J Clin, **1991**. 41(3): p. 166-79.
106. Rodriguez-Panadero F., Borderas Naranjo F., and Lopez Mejias J., *Pleural metastatic tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series*. Eur Respir J, **1989**. 2(4): p. 366-9.
107. Gieseler F., Luhr I., Kunze T., Mundhenke C., Maass N., Erhart T., Denker M., Beckmann D., Tiemann M., Schulte C., Dohrmann P., Cavaille F., Godeau F., and Gespach C., *Activated coagulation factors in human malignant effusions and their contribution to cancer cell metastasis and therapy*. Thromb Haemost, **2007**. 97(6): p. 1023-30.
108. Nguyen Q.D., De Wever O., Bruyneel E., Hendrix A., Xie W.Z., Lombet A., Leibl M., Mareel M., Gieseler F., Bracke M., and Gespach C., *Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment*. Oncogene, **2005**. 24(56): p. 8240-51.
109. Grove C.S. and Lee Y.C., *Vascular endothelial growth factor: the key mediator in pleural effusion formation*. Curr Opin Pulm Med, **2002**. 8(4): p. 294-301.
110. Fava R.A., Olsen N.J., Spencer-Green G., Yeo K.T., Yeo T.K., Berse B., Jackman R.W., Senger D.R., Dvorak H.F., and Brown L.F., *Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue*. J Exp Med, **1994**. 180(1): p. 341-6.
111. Bouros D., Froudarakis M., and Siafakas N.M., *Pleurodesis: everything flows*. Chest, **2000**. 118(3): p. 577-9.
112. Marel M., Stastny B., Melinova L., Svandova E., and Light R.W., *Diagnosis of pleural effusions. Experience with clinical studies, 1986 to 1990*. Chest, **1995**. 107(6): p. 1598-603.

113. Chung M. and Kozuch P., *Treatment of malignant ascites*. *Curr Treat Options Oncol*, **2008**. 9(2-3): p. 215-33.
114. Parsons S.L., Watson S.A., and Steele R.J., *Malignant ascites*. *Br J Surg*, **1996**. 83(1): p. 6-14.
115. Runyon B.A., *Care of patients with ascites*. *N Engl J Med*, **1994**. 330(5): p. 337-42.
116. Runyon B.A., Hoefs J.C., and Morgan T.R., *Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites*. *Hepatology*, **1988**. 8(5): p. 1104-9.
117. Garrison R.N., Kaelin L.D., Galloway R.H., and Heuser L.S., *Malignant ascites. Clinical and experimental observations*. *Ann Surg*, **1986**. 203(6): p. 644-51.
118. Parsons S.L., Lang M.W., and Steele R.J., *Malignant ascites: a 2-year review from a teaching hospital*. *Eur J Surg Oncol*, **1996**. 22(3): p. 237-9.
119. Buzaid A.C., Garewal H.S., and Greenberg B.R., *Managing malignant pericardial effusion*. *West J Med*, **1989**. 150(2): p. 174-9.
120. Sulkes A., Weshler Z., and Kopolovic Y., *Pericardial effusion as first evidence of malignancy in bronchogenic carcinoma*. *J Surg Oncol*, **1982**. 20(2): p. 71-4.
121. Ayantunde A.A. and Parsons S.L., *Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study*. *Ann Oncol*, **2007**. 18(5): p. 945-9.
122. Lee Y.C. and Light R.W., *Management of malignant pleural effusions*. *Respirology*, **2004**. 9(2): p. 148-56.
123. Thurber D.L., Edwards J.E., and Achor R.W., *Secondary malignant tumors of the pericardium*. *Circulation*, **1962**. 26: p. 228-41.
124. Inan I., De Sousa S., Myers P.O., Bouclier B., Dietrich P.Y., Hagen M.E., and Morel P., *Management of malignant pleural effusion and ascites by a triple access multi perforated large diameter catheter port system*. *World J Surg Oncol*, **2008**. 6: p. 85.
125. Gouin-Thibault I. and Samama M.M., *Laboratory diagnosis of the thrombophilic state in cancer patients*. *Semin Thromb Hemost*, **1999**. 25(2): p. 167-72.
126. Blom J.W., Doggen C.J., Osanto S., and Rosendaal F.R., *Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis*. *JAMA*, **2005**. 293(6): p. 715-22.
127. Lip G.Y., Chin B.S., and Blann A.D., *Cancer and the prothrombotic state*. *Lancet Oncol*, **2002**. 3(1): p. 27-34.
128. von Tempelhoff G.F., Dietrich M., Niemann F., Schneider D., Hommel G., and Heilmann L., *Blood coagulation and thrombosis in patients with ovarian malignancy*. *Thromb Haemost*, **1997**. 77(3): p. 456-61.
129. Xie W.Z., Leibl M., Clark M.R., Dohrmann P., Kunze T., and Gieseler F., *Activation of the coagulation system in cancerogenesis and metastasation*. *Biomed Pharmacother*, **2005**. 59(3): p. 70-5.
130. Paneesha S., Cheyne E., French K., Delgado J., Borg A., and Rose P., *High D-dimer level at presentation in patients with venous thrombosis is a marker for malignancy*. *Haematologica*, **2005**. 90(12 Suppl): p. ELT08.
131. Kwon H.C., Oh S.Y., Lee S., Kim S.H., Han J.Y., Koh R.Y., Kim M.C., and Kim H.J., *Plasma levels of prothrombin fragment F1+2, D-dimer and prothrombin time correlate with clinical stage and lymph node metastasis in operable gastric cancer patients*. *Jpn J Clin Oncol*, **2008**. 38(1): p. 2-7.

132. Gadducci A., Marrai R., Baicchi U., Galletti O., Facchini V., and Genazzani A.R., *Prothrombin fragment F1+2 and thrombin-antithrombin III complex (TAT) plasma levels in patients with gynecological cancer*. *Gynecol Oncol*, **1996**. 61(2): p. 215-7.
133. Ay C., Vormittag R., Dunkler D., Simanek R., Chiriac A.L., Drach J., Quehenberger P., Wagner O., Zielinski C., and Pabinger I., *D-dimer and prothrombin fragment 1 + 2 predict venous thromboembolism in patients with cancer: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study*. *J Clin Oncol*, **2009**. 27(25): p. 4124-9.
134. Schiller H., Bartscht T., Arlt A., Zahn M.O., Seifert A., Bruhn T., Bruhn H.D., and Gieseler F., *Thrombin as a survival factor for cancer cells: thrombin activation in malignant effusions in vivo and inhibition of idarubicin-induced cell death in vitro*. *Int J Clin Pharmacol Ther*, **2002**. 40(8): p. 329-35.
135. Hillen H.F., *Thrombosis in cancer patients*. *Ann Oncol*, **2000**. 11 Suppl 3: p. 273-6.
136. Gordon S.G. and Mielicki W.P., *Cancer procoagulant: a factor X activator, tumor marker and growth factor from malignant tissue*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **1997**. 8(2): p. 73-86.
137. Gunji Y., Lewis J., and Gorelik E., *Fibrin formation inhibits the in vitro cytotoxic activity of human natural and lymphokine-activated killer cells*. *Blood Coagul Fibrinolysis*, **1990**. 1(6): p. 663-72.
138. Bruhn H.D., Schambeck C.M., and Hach-Wunderle V., *Hämostaseologie für die Praxis. Sicher durch den klinischen Alltag*. 2010, Stuttgart: Schattauer. XXIV, 565 S.
139. Ostrovsky L., Carvalho-Tavares J., Woodman R.C., and Kubes P., *Translational inhibition of E-selectin expression stimulates P-selectin-dependent neutrophil recruitment*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **2000**. 278(4): p. H1225-32.
140. Venkatesha R.T., Ahamed J., Nuesch C., Zaidi A.K., and Ali H., *Platelet-activating factor-induced chemokine gene expression requires NF-kappaB activation and Ca²⁺/calcineurin signaling pathways. Inhibition by receptor phosphorylation and beta-arrestin recruitment*. *J Biol Chem*, **2004**. 279(43): p. 44606-12.
141. Syeda F., Grosjean J., Houlston R.A., Keogh R.J., Carter T.D., Paleolog E., and Wheeler-Jones C.P., *Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways*. *J Biol Chem*, **2006**. 281(17): p. 11792-804.
142. Camerer E., Qazi A.A., Duong D.N., Cornelissen I., Advincula R., and Coughlin S.R., *Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis*. *Blood*, **2004**. 104(2): p. 397-401.
143. Jones D.S., Wallace A.C., and Fraser E.E., *Sequence of events in experimental metastases of Walker 256 tumor: light, immunofluorescent, and electron microscopic observations*. *J Natl Cancer Inst*, **1971**. 46(3): p. 493-504.
144. Dabbagh K., Laurent G.J., McNulty R.J., and Chambers R.C., *Thrombin stimulates smooth muscle cell procollagen synthesis and mRNA levels via a PAR-1 mediated mechanism*. *Thromb Haemost*, **1998**. 79(2): p. 405-9.

145. Cucina A., Borrelli V., Di Carlo A., Pagliei S., Corvino V., Santoro-D'Angelo L., Cavallaro A., and Sterpetti A.V., *Thrombin induces production of growth factors from aortic smooth muscle cells*. J Surg Res, **1999**. 82(1): p. 61-6.
146. Bian Z.M., Elnér S.G., and Elnér V.M., *Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, **2007**. 48(6): p. 2738-46.
147. Dupuy E., Habib A., Lebret M., Yang R., Levy-Toledano S., and Tobelem G., *Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible relevance to HIF-1alpha*. J Thromb Haemost, **2003**. 1(5): p. 1096-102.
148. Huang Y.Q., Li J.J., Hu L., Lee M., and Karpatkin S., *Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes*. Thromb Haemost, **2001**. 86(4): p. 1094-8.
149. Liu J., Schuff-Werner P., and Steiner M., *Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, **2006**. 343(1): p. 183-9.
150. Ahmad R., Knafo L., Xu J., Sindhu S.T., Menezes J., and Ahmad A., *Thrombin induces apoptosis in human tumor cells*. Int J Cancer, **2000**. 87(5): p. 707-15.
151. Wojtukiewicz M.Z., Tang D.G., Ciarelli J.J., Nelson K.K., Walz D.A., Diglio C.A., Mammen E.F., and Honn K.V., *Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells*. Int J Cancer, **1993**. 54(5): p. 793-806.
152. Rahman A., Anwar K.N., True A.L., and Malik A.B., *Thrombin-induced p65 homodimer binding to downstream NF-kappa B site of the promoter mediates endothelial ICAM-1 expression and neutrophil adhesion*. J Immunol, **1999**. 162(9): p. 5466-76.
153. Kaplanski G., Marin V., Fabrigoule M., Boulay V., Benoliel A.M., Bongrand P., Kaplanski S., and Farnarier C., *Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106)*. Blood, **1998**. 92(4): p. 1259-67.
154. Konstantoulaki M., Kouklis P., and Malik A.B., *Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, **2003**. 285(2): p. L434-42.
155. Liao F., Li Y., O'Connor W., Zanetta L., Bassi R., Santiago A., Overholser J., Hooper A., Mignatti P., Dejana E., Hicklin D.J., and Bohlen P., *Monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin is a potent inhibitor of angiogenesis, tumor growth, and metastasis*. Cancer Res, **2000**. 60(24): p. 6805-10.
156. Pankonin G. and Teuscher E., *Stimulation of endothelial cell migration by thrombin*. Biomed Biochim Acta, **1991**. 50(9): p. 1073-8.
157. Kalmes A., Vesti B.R., Daum G., Abraham J.A., and Clowes A.W., *Heparin blockade of thrombin-induced smooth muscle cell migration involves inhibition of epidermal growth factor (EGF) receptor transactivation by heparin-binding EGF-like growth factor*. Circ Res, **2000**. 87(2): p. 92-8.
158. Kaufmann R., Rahn S., Pollrich K., Hertel J., Dittmar Y., Hommann M., Henklein P., Biskup C., Westermann M., Hollenberg M.D., and Settmacher U., *Thrombin-mediated hepatocellular carcinoma cell migration: cooperative*

- action via proteinase-activated receptors 1 and 4*. J Cell Physiol, **2007**. 211(3): p. 699-707.
159. Chen H.T., Tsou H.K., Tsai C.H., Kuo C.C., Chiang Y.K., Chang C.H., Fong Y.C., and Tang C.H., *Thrombin enhanced migration and MMPs expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway*. J Cell Physiol, **2010**. 223(3): p. 737-45.
160. Zhang T., Ma Z., Wang R., Wang Y., Wang S., Cheng Z., Xu H., Jin X., Li W., and Wang X., *Thrombin facilitates invasion of ovarian cancer along peritoneum by inducing monocyte differentiation toward tumor-associated macrophage-like cells*. Cancer Immunol Immunother, **2010**. 59(7): p. 1097-108.
161. Booden M.A., Eckert L.B., Der C.J., and Trejo J., *Persistent signaling by dysregulated thrombin receptor trafficking promotes breast carcinoma cell invasion*. Mol Cell Biol, **2004**. 24(5): p. 1990-9.
162. Radjabi A.R., Sawada K., Jagadeeswaran S., Eichbichler A., Kenny H.A., Montag A., Bruno K., and Lengyel E., *Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface*. J Biol Chem, **2008**. 283(5): p. 2822-34.
163. Even-Ram S., Uziely B., Cohen P., Grisaru-Granovsky S., Maoz M., Ginzburg Y., Reich R., Vlodaysky I., and Bar-Shavit R., *Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes*. Nat Med, **1998**. 4(8): p. 909-14.
164. Damiano B.P., Cheung W.M., Santulli R.J., Fung-Leung W.P., Ngo K., Ye R.D., Darrow A.L., Derian C.K., de Garavilla L., and Andrade-Gordon P., *Cardiovascular responses mediated by protease-activated receptor-2 (PAR-2) and thrombin receptor (PAR-1) are distinguished in mice deficient in PAR-2 or PAR-1*. J Pharmacol Exp Ther, **1999**. 288(2): p. 671-8.
165. Cederqvist K., Haglund C., Heikkila P., Hollenberg M.D., Karikoski R., and Andersson S., *High expression of pulmonary proteinase-activated receptor 2 in acute and chronic lung injury in preterm infants*. Pediatr Res, **2005**. 57(6): p. 831-6.
166. Xiong J., Zhu Z., Liu J., Wang Y., and Li Z., *Role of protease activated receptor-2 expression in renal interstitial fibrosis model in mice*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, **2005**. 25(5): p. 523-6.
167. Grandaliano G., Pontrelli P., Cerullo G., Monno R., Ranieri E., Ursi M., Loverre A., Gesualdo L., and Schena F.P., *Protease-activated receptor-2 expression in IgA nephropathy: a potential role in the pathogenesis of interstitial fibrosis*. J Am Soc Nephrol, **2003**. 14(8): p. 2072-83.
168. Borensztajn K., Stiekema J., Nijmeijer S., Reitsma P.H., Peppelenbosch M.P., and Spek C.A., *Factor Xa stimulates proinflammatory and profibrotic responses in fibroblasts via protease-activated receptor-2 activation*. Am J Pathol, **2008**. 172(2): p. 309-20.
169. Blanc-Brude O.P., Archer F., Leoni P., Derian C., Bolsover S., Laurent G.J., and Chambers R.C., *Factor Xa stimulates fibroblast procollagen production, proliferation, and calcium signaling via PAR1 activation*. Exp Cell Res, **2005**. 304(1): p. 16-27.
170. Bachli E.B., Pech C.M., Johnson K.M., Johnson D.J., Tuddenham E.G., and McVey J.H., *Factor Xa and thrombin, but not factor VIIa, elicit specific cellular responses in dermal fibroblasts*. J Thromb Haemost, **2003**. 1(9): p. 1935-44.

171. Border W.A. and Noble N.A., *Transforming growth factor beta in tissue fibrosis*. N Engl J Med, **1994**. 331(19): p. 1286-92.
172. Borensztajn K., Peppelenbosch M.P., and Spek C.A., *Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease*. Trends Mol Med, **2008**. 14(10): p. 429-40.
173. Rauch B.H., Bretschneider E., Braun M., and Schror K., *Factor Xa releases matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) from human vascular smooth muscle cells and stimulates the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2: role of MMP-2 in factor Xa-induced DNA synthesis and matrix invasion*. Circ Res, **2002**. 90(10): p. 1122-7.
174. Morris D.R., Ding Y., Ricks T.K., Gullapalli A., Wolfe B.L., and Trejo J., *Protease-activated receptor-2 is essential for factor VIIa and Xa-induced signaling, migration, and invasion of breast cancer cells*. Cancer Res, **2006**. 66(1): p. 307-14.
175. Jiang X., Bailly M.A., Panetti T.S., Cappello M., Konigsberg W.H., and Bromberg M.E., *Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer cells*. J Thromb Haemost, **2004**. 2(1): p. 93-101.
176. Jiang X., Guo Y.L., and Bromberg M.E., *Formation of tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex prevents apoptosis in human breast cancer cells*. Thromb Haemost, **2006**. 96(2): p. 196-201.
177. Borensztajn K., Bijlsma M.F., Reitsma P.H., Peppelenbosch M.P., and Spek C.A., *Coagulation factor Xa inhibits cancer cell migration via protease-activated receptor-1 activation*. Thromb Res, **2009**. 124(2): p. 219-25.
178. Borensztajn K.S., Bijlsma M.F., Groot A.P., Bruggemann L.W., Versteeg H.H., Reitsma P.H., Peppelenbosch M.P., and Spek C.A., *Coagulation factor Xa drives tumor cells into apoptosis through BH3-only protein Bim up-regulation*. Exp Cell Res, **2007**. 313(12): p. 2622-33.
179. Elste A.P. and Petersen I., *Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer*. J Mol Histol, **2010**. 41(2-3): p. 89-99.
180. Soh U.J., Dores M.R., Chen B., and Trejo J., *Signal transduction by protease-activated receptors*. Br J Pharmacol, **2010**. 160(2): p. 191-203.
181. Vu T.K., Hung D.T., Wheaton V.I., and Coughlin S.R., *Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation*. Cell, **1991**. 64(6): p. 1057-68.
182. Dery O., Corvera C.U., Steinhoff M., and Bunnett N.W., *Proteinase-activated receptors: novel mechanisms of signaling by serine proteases*. Am J Physiol, **1998**. 274(6 Pt 1): p. C1429-52.
183. Macfarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T., Hunter G.D., and Plevin R., *Proteinase-activated receptors*. Pharmacol Rev, **2001**. 53(2): p. 245-82.
184. Gerszten R.E., Chen J., Ishii M., Ishii K., Wang L., Nanevicz T., Turck C.W., Vu T.K., and Coughlin S.R., *Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface*. Nature, **1994**. 368(6472): p. 648-51.
185. Corvera C.U., Dery O., McConalogue K., Gamp P., Thoma M., Al-Ani B., Caughey G.H., Hollenberg M.D., and Bunnett N.W., *Thrombin and mast cell tryptase regulate guinea-pig myenteric neurons through proteinase-activated receptors-1 and -2*. J Physiol, **1999**. 517 (Pt 3): p. 741-56.

186. Zania P., Gourni D., Aplin A.C., Nicosia R.F., Flordellis C.S., Maragoudakis M.E., and Tsopanoglou N.E., *Parstatin, the cleaved peptide on proteinase-activated receptor 1 activation, is a potent inhibitor of angiogenesis*. J Pharmacol Exp Ther, **2009**. 328(2): p. 378-89.
187. Oldham W.M. and Hamm H.E., *How do receptors activate G proteins?* Adv Protein Chem, **2007**. 74: p. 67-93.
188. Oldham W.M. and Hamm H.E., *Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, **2008**. 9(1): p. 60-71.
189. Coughlin S.R., *Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology*. J Thromb Haemost, **2005**. 3(8): p. 1800-14.
190. Russo A., Soh U.J., and Trejo J., *Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters!* Mol Interv, **2009**. 9(2): p. 87-96.
191. Nakanishi-Matsui M., Zheng Y.W., Sulciner D.J., Weiss E.J., Ludeman M.J., and Coughlin S.R., *PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin*. Nature, **2000**. 404(6778): p. 609-13.
192. Seminario-Vidal L., Kreda S., Jones L., O'Neal W., Trejo J., Boucher R.C., and Lazarowski E.R., *Thrombin promotes release of ATP from lung epithelial cells through coordinated activation of rho- and Ca²⁺-dependent signaling pathways*. J Biol Chem, **2009**. 284(31): p. 20638-48.
193. Mahajan V.B., Pai K.S., Lau A., and Cunningham D.D., *Creatine kinase, an ATP-generating enzyme, is required for thrombin receptor signaling to the cytoskeleton*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2000**. 97(22): p. 12062-7.
194. Pai K.S., Mahajan V.B., Lau A., and Cunningham D.D., *Thrombin receptor signaling to cytoskeleton requires Hsp90*. J Biol Chem, **2001**. 276(35): p. 32642-7.
195. Han J., Liu G., Profirovic J., Niu J., and Voyno-Yasenetskaya T., *Zyxin is involved in thrombin signaling via interaction with PAR-1 receptor*. FASEB J, **2009**. 23(12): p. 4193-206.
196. Lefkowitz R.J. and Shenoy S.K., *Transduction of receptor signals by beta-arrestins*. Science, **2005**. 308(5721): p. 512-7.
197. Moore C.A., Milano S.K., and Benovic J.L., *Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins*. Annu Rev Physiol, **2007**. 69: p. 451-82.
198. Stalheim L., Ding Y., Gullapalli A., Paing M.M., Wolfe B.L., Morris D.R., and Trejo J., *Multiple independent functions of arrestins in the regulation of protease-activated receptor-2 signaling and trafficking*. Mol Pharmacol, **2005**. 67(1): p. 78-87.
199. Luo W., Wang Y., Hanck T., Stricker R., and Reiser G., *Jab1, a novel protease-activated receptor-2 (PAR-2)-interacting protein, is involved in PAR-2-induced activation of activator protein-1*. J Biol Chem, **2006**. 281(12): p. 7927-36.
200. Arora P., Ricks T.K., and Trejo J., *Protease-activated receptor signalling, endocytic sorting and dysregulation in cancer*. J Cell Sci, **2007**. 120(Pt 6): p. 921-8.
201. Blackhart B.D., Ruslim-Litrus L., Lu C.C., Alves V.L., Teng W., Scarborough R.M., Reynolds E.E., and Oksenberg D., *Extracellular mutations of protease-activated receptor-1 result in differential activation by thrombin and thrombin receptor agonist peptide*. Mol Pharmacol, **2000**. 58(6): p. 1178-87.

202. McLaughlin J.N., Shen L., Holinstat M., Brooks J.D., Dibenedetto E., and Hamm H.E., *Functional selectivity of G protein signaling by agonist peptides and thrombin for the protease-activated receptor-1*. J Biol Chem, **2005**. 280(26): p. 25048-59.
203. Feistritzer C. and Riewald M., *Endothelial barrier protection by activated protein C through PAR1-dependent sphingosine 1-phosphate receptor-1 crossactivation*. Blood, **2005**. 105(8): p. 3178-84.
204. Finigan J.H., Dudek S.M., Singleton P.A., Chiang E.T., Jacobson J.R., Camp S.M., Ye S.Q., and Garcia J.G., *Activated protein C mediates novel lung endothelial barrier enhancement: role of sphingosine 1-phosphate receptor transactivation*. J Biol Chem, **2005**. 280(17): p. 17286-93.
205. Komarova Y.A., Mehta D., and Malik A.B., *Dual regulation of endothelial junctional permeability*. Sci STKE, **2007**. 2007(412): p. re8.
206. Ishii K., Hein L., Kobilka B., and Coughlin S.R., *Kinetics of thrombin receptor cleavage on intact cells. Relation to signaling*. J Biol Chem, **1993**. 268(13): p. 9780-6.
207. Ishii K., Chen J., Ishii M., Koch W.J., Freedman N.J., Lefkowitz R.J., and Coughlin S.R., *Inhibition of thrombin receptor signaling by a G-protein coupled receptor kinase. Functional specificity among G-protein coupled receptor kinases*. J Biol Chem, **1994**. 269(2): p. 1125-30.
208. Tiruppathi C., Yan W., Sandoval R., Naqvi T., Pronin A.N., Benovic J.L., and Malik A.B., *G protein-coupled receptor kinase-5 regulates thrombin-activated signaling in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2000**. 97(13): p. 7440-5.
209. Chen C.H., Paing M.M., and Trejo J., *Termination of protease-activated receptor-1 signaling by beta-arrestins is independent of receptor phosphorylation*. J Biol Chem, **2004**. 279(11): p. 10020-31.
210. Paing M.M., Stutts A.B., Kohout T.A., Lefkowitz R.J., and Trejo J., *beta - Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation*. J Biol Chem, **2002**. 277(2): p. 1292-300.
211. Ricks T.K. and Trejo J., *Phosphorylation of protease-activated receptor-2 differentially regulates desensitization and internalization*. J Biol Chem, **2009**. 284(49): p. 34444-57.
212. Bohm S.K., Khitin L.M., Grady E.F., Aponte G., Payan D.G., and Bunnett N.W., *Mechanisms of desensitization and resensitization of proteinase-activated receptor-2*. J Biol Chem, **1996**. 271(36): p. 22003-16.
213. Hein L., Ishii K., Coughlin S.R., and Kobilka B.K., *Intracellular targeting and trafficking of thrombin receptors. A novel mechanism for resensitization of a G protein-coupled receptor*. J Biol Chem, **1994**. 269(44): p. 27719-26.
214. Paing M.M., Johnston C.A., Siderovski D.P., and Trejo J., *Clathrin adaptor AP2 regulates thrombin receptor constitutive internalization and endothelial cell resensitization*. Mol Cell Biol, **2006**. 26(8): p. 3231-42.
215. Trejo J. and Coughlin S.R., *The cytoplasmic tails of protease-activated receptor-1 and substance P receptor specify sorting to lysosomes versus recycling*. J Biol Chem, **1999**. 274(4): p. 2216-24.
216. DeFea K.A., Zalevsky J., Thoma M.S., Dery O., Mullins R.D., and Bunnett N.W., *beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is*

- required for intracellular targeting of activated ERK1/2.* J Cell Biol, **2000**. 148(6): p. 1267-81.
217. Falanga A., *Thrombophilia in cancer.* Semin Thromb Hemost, **2005**. 31(1): p. 104-10.
218. Kakkar A.K., *Thrombosis and cancer.* Hematol J, **2004**. 5 Suppl 3: p. S20-3.
219. Borensztajn K., Peppelenbosch M.P., and Spek C.A., *Coagulation Factor Xa inhibits cancer cell migration via LIMK1-mediated cofilin inactivation.* Thromb Res, **2010**. 125(6): p. e323-8.
220. Elzer K.L., Heitzman D.A., Chernin M.I., and Novak J.F., *Differential effects of serine proteases on the migration of normal and tumor cells: implications for tumor microenvironment.* Integr Cancer Ther, **2008**. 7(4): p. 282-94.
221. Antony V.B., Loddenkemper R., Astoul P., Boutin C., Goldstraw P., Hott J., Rodriguez Panadero F., and Sahn S.A., *Management of malignant pleural effusions.* Eur Respir J, **2001**. 18(2): p. 402-19.
222. Rodriguez-Panadero F., Janssen J.P., and Astoul P., *Thoracoscopy: general overview and place in the diagnosis and management of pleural effusion.* Eur Respir J, **2006**. 28(2): p. 409-22.
223. Blume L.F., *Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von Wachstums- und Gerinnungsfaktoren bei der Entstehung maligner Ergüsse.* 2010, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
224. Antunes G., Neville E., Duffy J., and Ali N., *BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions.* Thorax, **2003**. 58 Suppl 2: p. ii29-38.
225. Maisch B., Seferovic P.M., Ristic A.D., Erbel R., Rienmuller R., Adler Y., Tomkowski W.Z., Thiene G., and Yacoub M.H., *Guidelines on the diagnosis and management of pericardial diseases executive summary; The Task force on the diagnosis and management of pericardial diseases of the European society of cardiology.* Eur Heart J, **2004**. 25(7): p. 587-610.
226. Hou W. and Sanyal A.J., *Ascites: diagnosis and management.* Med Clin North Am, **2009**. 93(4): p. 801-17.
227. Zacharski L.R., Ornstein D.L., and Mamourian A.C., *Low-molecular-weight heparin and cancer.* Semin Thromb Hemost, **2000**. 26 Suppl 1: p. 69-77.
228. Zacharski L.R. and Loynes J.T., *Low-molecular-weight heparin in oncology.* Anticancer Res, **2003**. 23(3C): p. 2789-93.
229. Zacharski L.R., Henderson W.G., Rickles F.R., Forman W.B., Cornell C.J., Jr., Forcier R.J., Edwards R.L., Headley E., Kim S.H., O'Donnell J.F., and et al., *Effect of warfarin anticoagulation on survival in carcinoma of the lung, colon, head and neck, and prostate. Final report of VA Cooperative Study #75.* Cancer, **1984**. 53(10): p. 2046-52.
230. Thodiyil P. and Kakkar A.K., *Can low-molecular-weight heparins improve outcome in patients with cancer?* Cancer Treat Rev, **2002**. 28(3): p. 151-5.
231. Zacharski L.R., Prandoni P., and Monreal M., *Warfarin versus low-molecular-weight heparin therapy in cancer patients.* Oncologist, **2005**. 10(1): p. 72-9.
232. Smorenburg S.M., Vink R., Otten H.M., Swaneveld F., and Buller H.R., *The effects of vitamin K-antagonists on survival of patients with malignancy: a systematic analysis.* Thromb Haemost, **2001**. 86(6): p. 1586-7.

233. Smorenburg S.M. and Van Noorden C.J., *The complex effects of heparins on cancer progression and metastasis in experimental studies*. Pharmacol Rev, **2001**. 53(1): p. 93-105.
234. Rothwell P.M., Fowkes F.G., Belch J.F., Ogawa H., Warlow C.P., and Meade T.W., *Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials*. Lancet, **2011**. 377(9759): p. 31-41.
235. DeFeo K., Hayes C., Chernick M., Ryn J.V., and Gilmour S.K., *Use of dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression*. Cancer Biol Ther, **2010**. 10(10): p. 1001-8.
236. Levine M., Hirsh J., Gent M., Arnold A., Warr D., Falanga A., Samosh M., Bramwell V., Pritchard K.I., Stewart D., and et al., *Double-blind randomised trial of a very-low-dose warfarin for prevention of thromboembolism in stage IV breast cancer*. Lancet, **1994**. 343(8902): p. 886-9.
237. Cavo M., Zamagni E., Cellini C., Tosi P., Cangini D., Cini M., Valdre L., Palareti G., Masini L., Tura S., and Baccarani M., *Deep-vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving first-line thalidomide-dexamethasone therapy*. Blood. 2002 Sep 15;100(6):2272-3.
238. Bennett C.L., Angelotta C., Yarnold P.R., Evens A.M., Zonder J.A., Raisch D.W., and Richardson P., *Thalidomide- and lenalidomide-associated thromboembolism among patients with cancer*. JAMA. 2006 Dec 6;296(21):2558-60.
239. Lechner D. and Weltermann A., *[Pathophysiology of chemotherapy-associated thrombosis]*. Hamostaseologie, **2009**. 29(1): p. 112-20.
240. Altinbas M., Coskun H.S., Er O., Ozkan M., Eser B., Unal A., Cetin M., and Soyuer S., *A randomized clinical trial of combination chemotherapy with and without low-molecular-weight heparin in small cell lung cancer*. J Thromb Haemost, **2004**. 2(8): p. 1266-71.
241. Zacharski L.R., Ornstein D.L., and Mamourian A.C., *Low-molecular-weight heparin and cancer*. Semin Thromb Hemost, **2000**. 1: p. 69-77.
242. Lieber M., Mazzetta J., Nelson-Rees W., Kaplan M., and Todaro G., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. Int J Cancer, **1975**. 15(5): p. 741-7.
243. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., and Tada K., *Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)*. Int J Cancer, **1980**. 26(2): p. 171-6.
244. Furukawa T., Duguid W.P., Rosenberg L., Viallet J., Galloway D.A., and Tsao M.S., *Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16*. Am J Pathol, **1996**. 148(6): p. 1763-70.
245. Ouyang H., Mou L., Luk C., Liu N., Karaskova J., Squire J., and Tsao M.S., *Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype*. Am J Pathol, **2000**. 157(5): p. 1623-31.
246. Strober W., *Trypan blue exclusion test of cell viability*. Curr Protoc Immunol, **2001**. Appendix 3: p. Appendix 3B.
247. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., and Randall R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, **1951**. 193(1): p. 265-75.

248. Dulley J.R. and Grieve P.A., *A simple technique for eliminating interference by detergents in the Lowry method of protein determination*. Anal Biochem, **1975**. 64(1): p. 136-41.
249. Peterson G.L., *Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall*. Anal Biochem, **1979**. 100(2): p. 201-20.
250. Lottspeich F., *Bioanalytik*. 2. Aufl., [Nachdr.] ed, ed. F. Lottspeich. 2009, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
251. Pomory C.M., *Color development time of the Lowry protein assay*. Anal Biochem, **2008**. 378(2): p. 216-7.
252. Laemmli U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, **1970**. 227(5259): p. 680-5.
253. Marzocchi E., Grilli S., Della Ciana L., Prodi L., Mirasoli M., and Roda A., *Chemiluminescent detection systems of horseradish peroxidase employing nucleophilic acylation catalysts*. Anal Biochem, **2008**. 377(2): p. 189-94.
254. Pfaffl M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, **2001**. 29(9): p. e45.
255. *Assay of Coagulation Factor II (2.7.18)*, in *Europäisches Arzneibuch 6.2*. 2008, Dt. Apotheker-Verl.: Stuttgart.
256. *Assay of Coagulation Factor X (2.7.19)*, in *Europäisches Arzneibuch 6.2*. 2008, Dt. Apotheker-Verl.: Stuttgart.
257. *Selectivity Table*. Chromogenix, Mailand IT [web site] 2011 22.03.2011 [cited 22.03. 2011]; Available from: <http://www.chromogenix.com/>.
258. EMEA. *EPAR Refludan, Annex I*. [Online Product Information of Refludan - EMEA/H/C/000122 -T/0038] 2008 [cited 10.05 2011]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000122/WC500049442.pdf.
259. Ahmed S.A., Gogal R.M., Jr., and Walsh J.E., *A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay*. J Immunol Methods, **1994**. 170(2): p. 211-24.
260. Al-Nasiry S., Geusens N., Hanssens M., Luyten C., and Pijnenborg R., *The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells*. Hum Reprod, **2007**. 22(5): p. 1304-9.
261. de Fries R. and Mitsuhashi M., *Quantification of mitogen induced human lymphocyte proliferation: comparison of alamarBlue assay to 3H-thymidine incorporation assay*. J Clin Lab Anal, **1995**. 9(2): p. 89-95.
262. Fields R.D. and Lancaster M.V., *Dual-attribute continuous monitoring of cell proliferation/cytotoxicity*. Am Biotechnol Lab, **1993**. 11(4): p. 48-50.
263. Matsumoto K., Yamada Y., Takahashi M., Todoroki T., Mizoguchi K., Misaki H., and Yuki H., *Fluorometric determination of carnitine in serum with immobilized carnitine dehydrogenase and diaphorase*. Clin Chem, **1990**. 36(12): p. 2072-6.
264. Twigg R.S., *Oxidation-Reduction Aspects of Resazurin*. Nature, **1945**. 155: p. 401 - 402.
265. O'Brien J., Wilson I., Orton T., and Pognan F., *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. Eur J Biochem, **2000**. 267(17): p. 5421-6.

266. Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., and Cory J.G., *Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture*. *Cancer Commun*, **1991**. 3(7): p. 207-12.
267. Dunigan D.D., Waters S.B., and Owen T.C., *Aqueous soluble tetrazolium/formazan MTS as an indicator of NADH- and NADPH-dependent dehydrogenase activity*. *Biotechniques*, **1995**. 19(4): p. 640-9.
268. Thomas h.v.L., *Labor und Diagnose*. 5., erw. Aufl. ed, ed. L. Thomas. 2000, Frankfurt/Main: TH-Books Verl.-Ges.
269. Nierodzik M.L. and Karpatkin S., *Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype*. *Cancer Cell*, **2006**. 10(5): p. 355-62.
270. Kurachi K., Schmer G., Hermodson M.A., Teller D.C., and Davie E.W., *Characterization of human, bovine, and horse antithrombin III*. *Biochemistry*, **1976**. 15(2): p. 368-73.
271. Doria C., Fischer C.P., Wood C.G., Li P.M., Marra S., and Hart J., *Phase 3, randomized, double-blind study of plasma-derived human thrombin versus bovine thrombin in achieving hemostasis in patients undergoing surgery*. *Curr Med Res Opin*, **2008**. 24(3): p. 785-94.
272. Shuman M.A., Tollefsen D.M., and Majerus P.W., *The binding of human and bovine thrombin to human platelets*. *Blood*, **1976**. 47(1): p. 43-54.
273. Kisiel W. and Hanahan D.J., *The action of factor Xa, thrombin and trypsin on human factor II*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1973**. 329(2): p. 221-232.
274. Ødegård O.R., Abildgaard U., Lie M., and Miller-Andersson M., *Inactivation of bovine and human thrombin and factor Xa by antithrombin III studied with amidolytic methods*. *Thrombosis Research*, **1977**. 11(2): p. 205-216.
275. Dahlback B., *Inhibition of protein Ca cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein*. *J Biol Chem*, **1986**. 261(26): p. 12022-7.
276. Namkung W., Han W., Luo X., Muallem S., Cho K.H., Kim K.H., and Lee M.G., *Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis*. *Gastroenterology*, **2004**. 126(7): p. 1844-59.
277. Sandberg W.J., Halvorsen B., Yndestad A., Smith C., Otterdal K., Brosstad F.R., Froland S.S., Olofsson P.S., Damas J.K., Gullestad L., Hansson G.K., Oie E., and Aukrust P., *Inflammatory interaction between LIGHT and proteinase-activated receptor-2 in endothelial cells: potential role in atherogenesis*. *Circ Res*, **2009**. 104(1): p. 60-8.
278. Uehara A., Iwashiro A., Sato T., Yokota S., and Takada H., *Antibodies to proteinase 3 prime human monocytic cells via protease-activated receptor-2 and NF-kappaB for Toll-like receptor- and NOD-dependent activation*. *Mol Immunol*, **2007**. 44(14): p. 3552-62.
279. Yeong P., Ning Y., Xu Y., Li X., and Yin L., *Tryptase promotes human monocyte-derived macrophage foam cell formation by suppressing LXR[alpha] activation*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, **2010**. 1801(5): p. 567-576.
280. Mari B., Guerin S., Far D.F., Breitmayer J.P., Belhacene N., Peyron J.F., Rossi B., and Auberger P., *Thrombin and trypsin-induced Ca(2+) mobilization in*

- human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors.* FASEB J, **1996**. 10(2): p. 309-16.
281. Iwaki K., Shibata K., Ohta M., Endo Y., Uchida H., Tominaga M., Okunaga R., Kai S., and Kitano S., *A small interfering RNA targeting proteinase-activated receptor-2 is effective in suppression of tumor growth in a Panc1 xenograft model.* Int J Cancer, **2008**. 122(3): p. 658-63.
282. O'Sullivan C.J., Allen N.M., O'Loughlin A.J., Friel A.M., and Morrison J.J., *Thrombin and PAR1-activating peptide: effects on human uterine contractility in vitro.* Am J Obstet Gynecol, **2004**. 190(4): p. 1098-105.
283. Shi X., Gangadharan B., Brass L.F., Ruf W., and Mueller B.M., *Protease-Activated Receptors (PAR1 and PAR2) Contribute to Tumor Cell Motility and Metastasis.* Molecular Cancer Research, **2004**. 2(7): p. 395-402.
284. Nakajima S., Doi R., Toyoda E., Tsuji S., Wada M., Koizumi M., Tulachan S.S., Ito D., Kami K., Mori T., Kawaguchi Y., Fujimoto K., Hosotani R., and Imamura M., *N-Cadherin Expression and Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma.* Clinical Cancer Research, **2004**. 10(12): p. 4125-4133.
285. Nishioka R., Itoh S., Gui T., Gai Z., Oikawa K., Kawai M., Tani M., Yamaue H., and Muragaki Y., *SNAIL induces epithelial-to-mesenchymal transition in a human pancreatic cancer cell line (BxPC3) and promotes distant metastasis and invasiveness in vivo.* Experimental and Molecular Pathology, **2010**. 89(2): p. 149-157.
286. Gordon K.J., Dong M., Chislock E.M., Fields T.A., and Blobel G.C., *Loss of type III transforming growth factor beta receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression.* Carcinogenesis, **2008**. 29(2): p. 252-62.
287. Geismann C., Morscheck M., Koch D., Bergmann F., Ungefroren H., Arlt A., Tsao M.S., Bachem M.G., Altevogt P., Sipos B., Folsch U.R., Schafer H., and Muerkoster S.S., *Up-regulation of L1CAM in pancreatic duct cells is transforming growth factor beta1- and slug-dependent: role in malignant transformation of pancreatic cancer.* Cancer Res, **2009**. 69(10): p. 4517-26.
288. Miyazono K., *Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer.* Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, **2009**. 85(8): p. 314-23.
289. Cicchini C., Laudadio I., Citarella F., Corazzari M., Steindler C., Conigliaro A., Fantoni A., Amicone L., and Tripodi M., *TGF[beta]-induced EMT requires focal adhesion kinase (FAK) signaling.* Experimental Cell Research, **2008**. 314(1): p. 143-152.
290. Santibanez J.F., *JNK mediates TGF-beta1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes.* FEBS Lett, **2006**. 580(22): p. 5385-91.
291. Bhowmick N.A., Ghiassi M., Bakin A., Aakre M., Lundquist C.A., Engel M.E., Arteaga C.L., and Moses H.L., *Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism.* Mol Biol Cell, **2001**. 12(1): p. 27-36.
292. Trousseau A., *Phlegmasia alba dolens.* Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris: 3. 1865, Paris. 654-712.
293. Hach-Wunderle V. and Hach W., *Das Trousseau-Syndrom.* Gefässchirurgie, **1999**. 4(1): p. 50-54.

294. Falanga A., *Mechanisms of thrombosis in cancer*. Thromb Res, **2005**. 115 Suppl 1: p. 21-4.
295. Prandoni P., Falanga A., and Piccioli A., *Cancer and venous thromboembolism*. Lancet Oncol, **2005**. 6(6): p. 401-10.
296. Haddad T.C. and Greeno E.W., *Chemotherapy-induced thrombosis*. Thromb Res, **2006**. 118(5): p. 555-68.
297. Falanga A. and Zacharski L., *Deep vein thrombosis in cancer: the scale of the problem and approaches to management*. Ann Oncol, **2005**. 16(5): p. 696-701.
298. Prandoni P., Lensing A.W., Cogo A., Cuppini S., Villalta S., Carta M., Cattelan A.M., Polistena P., Bernardi E., and Prins M.H., *The long-term clinical course of acute deep venous thrombosis*. Ann Intern Med, **1996**. 125(1): p. 1-7.
299. Sorensen H.T., Mellekjaer L., Olsen J.H., and Baron J.A., *Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism*. N Engl J Med, **2000**. 343(25): p. 1846-50.
300. Lee A.Y., *Thrombosis in cancer: an update on prevention, treatment, and survival benefits of anticoagulants*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, **2010**. 2010: p. 144-9.
301. Van Noorden C.J., van Sluis G.L., and Spek C.A., *Experimental and clinical effects of anticoagulants on cancer progression*. Thromb Res, **2010**. 125 Suppl 2: p. S77-9.
302. Hetland T.E., Hellesylt E., Florenes V.A., Trope C., Davidson B., and Kaern J., *Class III beta-tubulin expression in advanced-stage serous ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival and primary chemoresistance*. Hum Pathol, **2011**. 10: p. 10.
303. Vaz M.A., Vargas F.S., Marinho F.C., D'Amico E.A., Rocha T.R., and Teixeira L.R., *Does the evaluation of coagulation factors contribute to etiological diagnosis of pleural effusions?* Clinics (Sao Paulo), **2009**. 64(9): p. 891-5.
304. Goerge T., Barg A., Schnaeker E.M., Poppelmann B., Shpacovitch V., Rattenholl A., Maaser C., Luger T.A., Steinhoff M., and Schneider S.W., *Tumor-derived matrix metalloproteinase-1 targets endothelial proteinase-activated receptor 1 promoting endothelial cell activation*. Cancer Res, **2006**. 66(15): p. 7766-74.
305. Verheul H.M.W., Hoekman K., Lupu F., Broxterman H.J., van der Valk P., Kakkar A.K., and Pinedo H.M., *Platelet and Coagulation Activation with Vascular Endothelial Growth Factor Generation in Soft Tissue Sarcomas*. Clinical Cancer Research, **2000**. 6(1): p. 166-171.
306. Kuenen B.C., Levi M., Meijers J.C., Kakkar A.K., van Hinsbergh V.W., Kostense P.J., Pinedo H.M., and Hoekman K., *Analysis of coagulation cascade and endothelial cell activation during inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor pathway in cancer patients*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **2002**. 22(9): p. 1500-5.
307. Tijburg P.N., Ryan J., Stern D.M., Wollitzky B., Rimon S., Rimon A., Handley D., Nawroth P., Sixma J.J., and de Groot P.G., *Activation of the coagulation mechanism on tumor necrosis factor-stimulated cultured endothelial cells and their extracellular matrix. The role of flow and factor IX/IXa*. J Biol Chem, **1991**. 266(18): p. 12067-74.

308. Madkour B.S., Bekheet I.W., Khaled I.A., El Baz A.G., and Essawy F.M., *Platelet activation. A link between angiogenesis and haemostasis in bladder cancer patients*. Research Journal of Medicine and Medical Sciences, **2009**. 4(2): p. 212-219.
309. Caine G.J., Lip G.Y., Stonelake P.S., Ryan P., and Blann A.D., *Platelet activation, coagulation and angiogenesis in breast and prostate carcinoma*. Thromb Haemost, **2004**. 92(1): p. 185-90.
310. Heit J.A., *Cancer and venous thromboembolism: scope of the problem*. Cancer Control, **2005**. 12 Suppl 1: p. 5-10.
311. Pleym H., Wahba A., Videm V., Asberg A., Lydersen S., Bjella L., Dale O., and Stenseth R., *Increased fibrinolysis and platelet activation in elderly patients undergoing coronary bypass surgery*. Anesth Analg, **2006**. 102(3): p. 660-7.
312. Zain J., Huang Y.Q., Feng X., Nierodzik M.L., Li J.J., and Karpatkin S., *Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells*. Blood, **2000**. 95(10): p. 3133-8.
313. Girolami A., Patrassi G., Toffanin F., and Saggin L., *Chromogenic substrate (S-2238) prothrombin assay in prothrombin deficiencies and abnormalities. Lack of identity with clotting assays in congenital dysprothrombinemias*. Am J Clin Pathol, **1980**. 74(1): p. 83-7.
314. Hua C.C., Chang L.C., Chen Y.C., and Chang S.C., *Proinflammatory cytokines and fibrinolytic enzymes in tuberculous and malignant pleural effusions*. Chest, **1999**. 116(5): p. 1292-6.
315. Davidson B., Xi Z., and Saatcioglu F., *Kallikrein 4 is expressed in malignant mesothelioma--further evidence for the histogenetic link between mesothelial and epithelial cells*. Diagn Cytopathol, **2007**. 35(2): p. 80-4.
316. De la Hoz J., Saboya L., and Cardenas M., *[Association of trypsin and chymotrypsin in pleural effusions of diverse etiology]*. Antioquia Med, **1966**. 16(2): p. 139-47.
317. Aleman C., Alegre J., Monasterio J., Segura R.M., Armadans L., Angles A., Varela E., Ruiz E., and Fernandez de Sevilla T., *Association between inflammatory mediators and the fibrinolysis system in infectious pleural effusions*. Clin Sci, **2003**. 105(5): p. 601-7.
318. Moche M., Hui D.S., Huse K., Chan K.S., Choy D.K., Scholz G.H., Gosse H., Winkler J., Schauer J., Sack U., and Hoheisel G., *[Matrix metalloproteinases and their inhibitors in lung cancer with malignant pleural effusion]*. Pneumologie, **2005**. 59(8): p. 523-8.
319. Salah Z., Maoz M., Pizov G., and Bar-Shavit R., *Transcriptional Regulation of Human Protease-Activated Receptor 1: A Role for the Early Growth Response-1 Protein in Prostate Cancer*. Cancer Research, **2007**. 67(20): p. 9835-9843.
320. Hernandez N., Correa E., Avila E., Vela T., and Perez V., *PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: a cohort study*. Journal of Translational Medicine, **2009**. 7(1): p. 47.
321. Granovsky-Grisaru S., Zaidoun S., Grisaru D., Yekel Y., Prus D., Beller U., and Bar-Shavit R., *The pattern of Protease Activated Receptor 1 (PAR1) expression in endometrial carcinoma*. Gynecologic Oncology, **2006**. 103(3): p. 802-806.

322. Yin Y.J., Salah Z., Grisaru-Granovsky S., Cohen I., Even-Ram S.C., Maoz M., Uziely B., Peretz T., and Bar-Shavit R., *Human protease-activated receptor 1 expression in malignant epithelia: a role in invasiveness*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **2003**. 23(6): p. 940-4.
323. Ikeda O., Egami H., Ishiko T., Ishikawa S., Kamohara H., Hidaka H., Mita S., and Ogawa M., *Expression of proteinase-activated receptor-2 in human pancreatic cancer: a possible relation to cancer invasion and induction of fibrosis*. *Int J Oncol*, **2003**. 22(2): p. 295-300.
324. Sánchez-Hernández P.E., Ramirez-Dueñas M.G., Albarran-Somoza B., García-Iglesias T., del Toro-Arreola A., Franco-Topete R., and Daneri-Navarro A., *Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in cervical cancer proliferation*. *Gynecologic Oncology*, **2008**. 108(1): p. 19-26.
325. Chang J.H., Park J.M., Kim S.W., Jung C.K., Kang W.K., and Oh S.T., *Expression of protease activated receptor-2 in human colorectal cancer and its association with tumor progression*. *Dis Colon Rectum*, **2010**. 53(8): p. 1202-8.
326. Su S., Li Y., Luo Y., Sheng Y., Su Y., Padia R.N., Pan Z.K., Dong Z., and Huang S., *Proteinase-activated receptor 2 expression in breast cancer and its role in breast cancer cell migration*. *Oncogene*, **2009**. 28(34): p. 3047-3057.
327. Jahan I., Fujimoto J., Alam S.M., Sato E., Sakaguchi H., and Tamaya T., *Role of protease activated receptor-2 in tumor advancement of ovarian cancers*. *Ann Oncol*, **2007**. 18(9): p. 1506-12.
328. Fujimoto D., Hirono Y., Goi T., Katayama K., Hirose K., and Yamaguchi A., *Expression of protease activated receptor-2 (PAR-2) in gastric cancer*. *Journal of Surgical Oncology*, **2006**. 93(2): p. 139-144.
329. Liu S.Z., *Biological effects of low level exposures to ionizing radiation: theory and practice*. *Hum Exp Toxicol*, **2010**. 29(4): p. 275-81.
330. Wei C., Geras-Raaka E., Marcus-Samuels B., Oron Y., and Gershengorn M.C., *Trypsin and thrombin accelerate aggregation of human endocrine pancreas precursor cells*. *J Cell Physiol*, **2006**. 206(2): p. 322-8.
331. Puiffe M.L., Le Page C., Filali-Mouhim A., Zietarska M., Ouellet V., Tonin P.N., Chevrette M., Provencher D.M., and Mes-Masson A.M., *Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer*. *Neoplasia*, **2007**. 9(10): p. 820-9.
332. Braun D.P., Ding J., and Dmowski W.P., *Peritoneal fluid-mediated enhancement of eutopic and ectopic endometrial cell proliferation is dependent on tumor necrosis factor-alpha in women with endometriosis*. *Fertil Steril*, **2002**. 78(4): p. 727-32.
333. Rehnberg J., Zendeherokh N., and Dejmek A., *Lower proliferation rate in metastatic effusion mesothelial cells than in benign effusions*. *Anal Quant Cytol Histol*, **2007**. 29(4): p. 217-20.
334. Ceyhan B.B., Demiralp E., Karakurt Z.L., Karakurt S., and Sungur M., *Transforming growth factor beta-1 level in pleural effusion*. *Respirology*, **2003**. 8(3): p. 321-5.
335. Huang E.-J., Wu C.-C., Huang H.-P., Liu J.-Y., Lin C.-S., Chang Y.-Z., Lin J., Lin J.-G., Chen L.-M., Lee S.-D., Kuo W.-W., and Huang C.-Y., *Apoptotic and*

- anti-proliferative effects of 17 β -estradiol and 17 β -estradiol-like compounds in the Hep3B cell line.* Molecular and Cellular Biochemistry, **2006**. 290(1): p. 1-7.
336. Montagnani Marelli M., Moretti R.M., Mai S., Januszkiewicz-Caulier J., Motta M., and Limonta P., *Type I gonadotropin-releasing hormone receptor mediates the antiproliferative effects of GnRH-II on prostate cancer cells.* J Clin Endocrinol Metab, **2009**. 94(5): p. 1761-7.
337. Hirsch F.W., Deibert P., Busch H., Lohr G.W., and Bross K.J., *Demonstration of estrogen and progesterone receptors as well as Ki-67 and p-145 antigens in single tumor cells from blood and pleural effusions using a slide assay.* J Cancer Res Clin Oncol, **1991**. 117(3): p. 217-22.
338. Shimamoto R., Sawada T., Uchima Y., Inoue M., Kimura K., Yamashita Y., Yamada N., Nishihara T., Ohira M., and Hirakawa K., *A role for protease-activated receptor-2 in pancreatic cancer cell proliferation.* Int J Oncol, **2004**. 24(6): p. 1401-6.
339. Cheung W.M., Andrade-Gordon P., Derian C.K., and Damiano B.P., *Receptor-activating peptides distinguish thrombin receptor (PAR-1) and protease activated receptor 2 (PAR-2) mediated hemodynamic responses in vivo.* Can J Physiol Pharmacol, **1998**. 76(1): p. 16-25.
340. Gudmundsdottir I.J., Lang N.N., Boon N.A., Ludlam C.A., Webb D.J., Fox K.A., and Newby D.E., *Role of the endothelium in the vascular effects of the thrombin receptor (protease-activated receptor type 1) in humans.* J Am Coll Cardiol, **2008**. 51(18): p. 1749-56.
341. Gorodetsky R., Peylan-Ramu N., Reshef A., Gaberman E., Levdansky L., and Marx G., *Interactions of carboplatin with fibrin(ogen), implications for local slow release chemotherapy.* Journal of Controlled Release, **2005**. 102(1): p. 235-245.
342. Ferrandina G., Ranelletti F.O., Martinelli E., Paglia A., Zannoni G.F., and Scambia G., *Cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) expression and resistance to platinum versus platinum/paclitaxel containing chemotherapy in advanced ovarian cancer.* BMC Cancer, **2006**. 6: p. 182.
343. Lo H.M., Chen C.L., Tsai Y.J., Wu P.H., and Wu W.B., *Thrombin induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 release via PAR1 activation and ERK1/2- and p38 MAPK-dependent pathway in murine macrophages.* J Cell Biochem, **2009**. 108(5): p. 1143-52.
344. Hirota Y., Osuga Y., Hirata T., Yoshino O., Koga K., Harada M., Morimoto C., Nose E., Yano T., Tsutsumi O., and Taketani Y., *Possible involvement of thrombin/protease-activated receptor 1 system in the pathogenesis of endometriosis.* J Clin Endocrinol Metab, **2005**. 90(6): p. 3673-9.
345. Fang J., Gu L., Zhu N., Tang H., Alvarado C.S., and Zhou M., *Tissue factor/FVIIa activates Bcl-2 and prevents doxorubicin-induced apoptosis in neuroblastoma cells.* BMC Cancer, **2008**. 8: p. 69.
346. Yang E.Y. and Moses H.L., *Transforming growth factor beta 1-induced changes in cell migration, proliferation, and angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane.* J Cell Biol, **1990**. 111(2): p. 731-41.
347. Godin I. and Wylie C.C., *TGF beta 1 inhibits proliferation and has a chemotropic effect on mouse primordial germ cells in culture.* Development, **1991**. 113(4): p. 1451-1457.

348. Ge L., Shenoy S.K., Lefkowitz R.J., and DeFea K., *Constitutive protease-activated receptor-2-mediated migration of MDA MB-231 breast cancer cells requires both beta-arrestin-1 and -2*. J Biol Chem, **2004**. 279(53): p. 55419-24.
349. Yada K., Shibata K., Matsumoto T., Ohta M., Yokoyama S., and Kitano S., *Protease-activated receptor-2 regulates cell proliferation and enhances cyclooxygenase-2 mRNA expression in human pancreatic cancer cells*. J Surg Oncol, **2005**. 89(2): p. 79-85.
350. Asano-Kato N., Fukagawa K., Okada N., Dogru M., Tsubota K., and Fujishima H., *Tryptase increases proliferative activity of human conjunctival fibroblasts through protease-activated receptor-2*. Invest Ophthalmol Vis Sci, **2005**. 46(12): p. 4622-6.
351. Ollivier V., Chabbat J., Herbert J.M., Hakim J., and de Prost D., *Vascular endothelial growth factor production by fibroblasts in response to factor VIIa binding to tissue factor involves thrombin and factor Xa*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, **2000**. 20(5): p. 1374-81.
352. Bretschneider E., Kaufmann R., Braun M., Nowak G., Glusa E., and Schror K., *Evidence for functionally active protease-activated receptor-4 (PAR-4) in human vascular smooth muscle cells*. Br J Pharmacol, **2001**. 132(7): p. 1441-6.
353. Vesey D.A., Kruger W.A., Poronnik P., Gobe G.C., and Johnson D.W., *Proinflammatory and proliferative responses of human proximal tubule cells to PAR-2 activation*. Am J Physiol Renal Physiol, **2007**. 293(5): p. F1441-9.
354. Kang C.S., Tae J., Lee Y.M., Kim B.S., Moon W.S., and Kim D.K., *Protease-activated Receptor 2 is Associated with Activation of Human Macrophage Cell Line THP-1*. Immune Netw., **2005**. 5(4): p. 193-198.
355. Zheng L. and Martins-Green M., *Molecular mechanisms of thrombin-induced interleukin-8 (IL-8/CXCL8) expression in THP-1-derived and primary human macrophages*. Journal of Leukocyte Biology, **2007**. 82(3): p. 619-629.
356. Gordon K.J., Dong M., Chislock E.M., Fields T.A., and Blobe G.C., *Loss of type III transforming growth factor β receptor expression increases motility and invasiveness associated with epithelial to mesenchymal transition during pancreatic cancer progression*. Carcinogenesis, **2008**. 29(2): p. 252-262.
357. Kaufmann R., Junker U., Junker K., Nuske K., Ranke C., Zieger M., and Scheele J., *The serine proteinase thrombin promotes migration of human renal carcinoma cells by a PKA-dependent mechanism*. Cancer Lett, **2002**. 180(2): p. 183-90.
358. Kamath L., Meydani A., Foss F., and Kuliopulos A., *Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells*. Cancer Res, **2001**. 61(15): p. 5933-40.
359. Jungert K., Buck A., von Wichert G., Adler G., Konig A., Buchholz M., Gress T.M., and Ellenrieder V., *Sp1 is required for transforming growth factor-beta-induced mesenchymal transition and migration in pancreatic cancer cells*. Cancer Res, **2007**. 67(4): p. 1563-70.
360. Zhang G., Kernan K.A., Collins S.J., Cai X., Lopez-Guisa J.M., Degen J.L., Shvil Y., and Eddy A.A., *Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals*. J Am Soc Nephrol, **2007**. 18(3): p. 846-59.

361. Ando S., Otani H., Yagi Y., Kawai K., Araki H., Fukuhara S., and Inagaki C., *Proteinase-activated receptor 4 stimulation-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells*. *Respir Res*, **2007**. 8: p. 31.
362. Huszar M., Pfeifer M., Schirmer U., Kiefel H., Konecny G.E., Ben-Arie A., Edler L., Munch M., Muller-Holzner E., Jerabek-Klestil S., Abdel-Azim S., Marth C., Zeimet A.G., Altevogt P., and Fogel M., *Up-regulation of L1CAM is linked to loss of hormone receptors and E-cadherin in aggressive subtypes of endometrial carcinomas*. *J Pathol*, **2010**. 220(5): p. 551-61.
363. Hotz B., Arndt M., Dullat S., Bhargava S., Buhr H.J., and Hotz H.G., *Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer*. *Clin Cancer Res*, **2007**. 13(16): p. 4769-76.
364. Schniewind B., Groth S., Sebens Muerkoster S., Sipos B., Schafer H., Kalthoff H., Fandrich F., and Ungefroren H., *Dissecting the role of TGF-beta type I receptor/ALK5 in pancreatic ductal adenocarcinoma: Smad activation is crucial for both the tumor suppressive and prometastatic function*. *Oncogene*, **2007**. 26(33): p. 4850-62.
365. van Roy F. and Berx G., *The cell-cell adhesion molecule E-cadherin*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2008**. 65(23): p. 3756-3788.
366. Ungefroren H., Lenschow W., Chen W.B., Faendrich F., and Kalthoff H., *Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling*. *J Biol Chem*, **2003**. 278(13): p. 11041-9.
367. Winter M.C., Shasby S.S., Ries D.R., and Shasby D.M., *PAR2 activation interrupts E-cadherin adhesion and compromises the airway epithelial barrier: protective effect of beta-agonists*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **2006**. 291(4): p. L628-35.
368. McDonald J.A., Khodyakova A., Aranjuez G., Dudley C., and Montell D.J., *PAR-1 kinase regulates epithelial detachment and directional protrusion of migrating border cells*. *Curr Biol*, **2008**. 18(21): p. 1659-67.
369. Baumer Y., *The role of Rho GTPases Rac 1 and Rho A in endothelial barrier function*, in *akultät für Biologie 2009*, Julius-Maximilians-Universität: Würzburg.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel auf Anregung von Prof. Dr. Frank Gieseler und Prof. Dr. Thomas Kunze unter der Leitung von Prof. Dr. Thomas Kunze. Die Erstellung dieser interdisziplinären Arbeit war ein langwieriger und mühseliger Prozess und wäre ohne die Mithilfe und Unterstützung vieler Personen in dieser Form nicht zustande gekommen.

Für die Aufnahme in die gemeinsame Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Thematik sowie die stete Diskussionsbereitschaft und technische Unterstützung danke ich Prof. Dr. Thomas Kunze und Prof. Dr. Frank Gieseler. Der Großteil der Arbeiten wurde im Rahmen der DFG Projekte GI 152/4-1 und GI 152/5-1 „Der Einfluss aktivierter Gerinnungsfaktoren auf die Progression von Tumorzellen in malignen Ergüssen“ im Labor von Prof. Dr. Gieseler durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Clement danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Susanne Sebens und Prof. Dr. Heiner Schäfer. Ihr habt mich stets unterstützt und durch Eure positive, engagierte, hilfsbereite und selbstlose Art habt Ihr mir das Forschen in Eurem Labor zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht. Dabei kamen auch die Annehmlichkeiten des Lebens und der Spaß nie zu kurz. Ich danke Euch von ganzem Herzen!

Mit Dr. Lars-Fabian Blume verbinden mich viele „Extremsituationen“ im und außerhalb des Labors, die wir jederzeit gemeistert haben! Sei mir bitte auch weiterhin so ein toller Freund, wie Du es bist.

Bei Dr. Claudia Geismann bedanke ich mich für die großartige Hilfestellung zu methodischen Fragen aller Art und die vielen interessanten Gespräche.

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung aller Mitarbeiter im Labor für Molekulare Gastroenterologie und Hepatologie nicht möglich gewesen. Ich danke Dr. Marie-Luise Kruse, Eike Jürgen, Frauke Grohmann, Maike Großmann und insbesondere Iris Bauer, Dagmar Leisner und Maike Witt-Ramdohr für die stete Hilfestellung.

Bei Prof. Dr. Hendrik Ungefroren bedanke ich mich für die vielen Versuche mit Radioaktivität, die leider nicht den Weg in diese Arbeit gefunden haben, sowie die unkomplizierte Unterstützung meiner Arbeit.

Ich danke Michael Clark und Christine Wilhelms für die hervorragende technische Assistenz. Lieber Mike, leider bist Du viel zu früh von uns gegangen! Du hast mir beigebracht Hirschmettwurst mit Wildschweinfleisch schmackhaft zu machen und Arbeitsplätze in Abwesenheit der Eigentümer in Igel und Marsmenschen zu verwandeln. Methodisch warst Du eine sichere Bank im Labor. Es war toll, Dich kennen gelernt zu haben. Unsere gemeinsame Zeit war aber leider viel zu kurz.

An Lukas Riebling ergeht hiermit eine Warnung: Ich werde den Angelthron nicht mit Dir teilen! Auch bei Dir macht das Wort Extremsituation immer wieder Sinn. Das gilt auch für Kiko, den aufstrebenden Jungangler. Ihr seid tolle Freunde und habt einen großen Anteil an dieser Arbeit! Vielen Dank für die Diskussionen und Hilfestellung.

Bei den Rumpelfüßen Dennis, Joscha, Jürke, Robert und Lars bedanke ich mich für die Rumpelabende, ob auf dem Fußballplatz oder nicht.

Bei Thomas Behrend bedanke ich mich für die stete und schnelle organisatorische Hilfsbereitschaft sowie die tolle Atmosphäre in unserem Büroschlauch. Kuchen!!!

Dem gesamten Arbeitskreis Clement danke ich an dieser Stelle für das harmonische Miteinander. Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Kollegen am Pharmazeutischen Institut und besonders dem Team vom Achtsemesterpraktikum für die tolle Zeit bedanken. Bei allen nicht namentlich genannten Personen wollte ich mich in aller Stille bedanken. Ich habe Euch nicht vergessen!

Bei Anna Beimer und Kristina Schade bedanke ich mich für die beeindruckende Geduld im Angesicht schier endloser Versuchsreihen.

Zum Schluss möchte ich noch den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken: meinen Familien und meinen Freunden. Welch ein großes Glück, dass es Euch gibt!

Mein größter und liebevoller Dank gilt Katharina Ratke. Du hast mit Deiner wundervollen Art und großer Liebe meine Launen ertragen, an mich geglaubt und mir die Kraft zum Weitermachen gegeben. Was für ein großes Glück, dass es Dich gibt! Danke für das so wunderschöne Leben mit Dir!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Momme Denker
Geburtsdatum	28. November 1978
Geburtsort	Kiel
Staatsangehörigkeit	deutsch

Promotion und Weiterbildung

Januar 2011	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik
10/2006 – 01/2011	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung einer Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Thomas Kunze
07/2005 – 05/2006	Aufbaustudiengang Pharmazie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Studium

Juli 2006	Erteilung der Approbation als Apotheker
01/2006 – 06/2006	Pharmaziepraktikum in der Belvedere Apotheke, Kiel
07/2005 – 12/2005	Pharmaziepraktikum am Pharmazeutischen Institut, Kiel
04/2001 – 06/2005	Pharmaziestudium, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2000 – 04/2001	Diplomstudium Chemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/1999 bis 10/2000	Diplomstudium Agrarwissenschaften, Christian-Albrechts-Universität Kiel

Zivildienst

10/1998 - 10/1999	Gorch-Fock-Schule, Schule für geistig Behinderte, Kiel
-------------------	--

Schulbildung

Juni 1998	Allgemeine Hochschulreife
08/1989 – 06/1998	Kieler Gelehrtenschule, Altsprachliches Gymnasium, Kiel
08/1985 – 06/1989	Dörfergemeinschaftsschule Grundschule Strohrück

Erklärung zu §10 Abs. 2 der Promotionsordnung

Der Inhalt dieser Abhandlung wurde – abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer – selbstständig von mir erarbeitet und in dieser Form zusammengestellt. Teile der Arbeit wurden im Rahmen der Weiterbildung zum Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik unter dem Titel „Etablierung chromogener Assays zur Bestimmung der Proteaseaktivität von Thrombin und Faktor Xa“ zur Prüfung bei der Apothekerkammer Schleswig-Holstein eingereicht. Die Arbeit hat darüber hinaus an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden.

Kiel, im September 2011

Momme Denker

Summary

A procoagulant state accompanied by deep vein thrombosis and development of expansive effusions containing coagulation factors are well known matters in cancer patients during the progression of the disease. Patients suffer from chest and abdominal pain, dyspnoea, cough, digestive disorders, vomiting, anorexia and cachexia, nausea, limited mobility resulting in a reduced quality of life. Until now therapeutical options are poor besides repetitive puncture and pleurodesis.

In order to elucidate the role of coagulation factors on growth, chemosensitivity, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cell migration of cancer cells within effusions, 108 effusions from clinically necessary punctures were collected and characterized in terms of gender and diagnosis at the date of puncture (malignant vs. benign; gynaecological, lung and gastroenterological cancers). After separating the cells from the effusions all coagulation factors of the extrinsic cascade (factor II, V, VII, X, fibrinogen) were detected at low concentrations whereas clinical markers for an activated coagulation system such as D-dimer fragments and prothrombin fragment 1.2 were significantly elevated. Thrombin and factor Xa showed almost no activity in a chromogenic assay. These findings indicate a highly activated coagulation system within the effusions without significant differences between gender and diagnosis.

Tumour cells isolated from the effusions expressed PAR-1 and PAR-2 receptors that were membrane-bound but mainly localized in the cytosol. PAR-1 and PAR-2 are relevant for protease signalling and influence on the cell biology. Owing to the low proliferative activity and contamination with fibroblasts these cells were not suitable for further experiments. The alternatively used cell lines HPDE (non-tumorigenic human pancreatic duct epithelial cells), PANC-1 (human pancreatic cancer) and THP-1 (human acute monocytic leukaemia) showed variable PAR-1 and PAR-2 surface expression, and HPDE and PANC-1 cells showed a marked cytosolic expression of both receptors, too.

Culture medium supplemented with 10 % (v/v) effusion fluid inhibited THP-1 cell growth and improved response to Carboplatin and doxorubicin treatment. Moreover, benign effusions and effusions from gastroenterological cancers of female patients lead to a concomitant slightly developed chemoresistance against carboplatin and

doxorubicin and increased cell growth. Elevated thrombin levels within the effusions correlated with improved response to carboplatin and increased cell growth. Stimulation of THP-1 cells with PAR-agonists resulted in a PAR-1 mediated marginal inhibition of cell proliferation and a distinct chemoresistance against carboplatin and doxorubicin while PAR-2 agonist led to a chemoresistance against doxorubicin. PANC-1 cells showed no concentration-dependent response to PAR-1 and PAR-2 agonists with respect to cell proliferation and response to cytostatic drugs.

However, culture of PANC-1 cells in medium supplemented with 10 % (v/v) effusion fluid inhibited cell growth. Co-incubation with Lepirudin (thrombin inhibitor) or Rivaroxaban (factor Xa inhibitor) had no influence on cell growth indicating that other factors in the effusions beside coagulation factors are responsible for the growth inhibitory effect.

Finally, PAR agonists showed no transcriptional influence on EMT-associated marker proteins E-cadherin, Vimentin, N-cadherin, L1CAM, Slug and Snail in HPDE and PANC-1 cells but induced delocalisation of membrane-bound E-cadherin into the cytosol. Along with this delocalisation a dissolving of cell-cell junctions and a spindle-shaped cell morphology was observed in both cell lines. These cell biological changes could be associated with an increased cell migration in both non-tumorigenic HPDE cells and tumorigenic PANC-1 cells.

In summary, these results revealed a distinct tumour progressive potential of coagulation factors on tumorigenic and even non-tumorigenic cells and contribute to the understanding of their role during tumorigenesis and metastasis. They suggest also the need of anticoagulant treatment of tumour patients and in tumour prophylactic treatment.