

# **Die Bedeutung von Tumor-Mikropartikeln für die Fibrinbildung und Metastasierung des Pankreaskarzinoms**

von Petra Vrabcová

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Die Bedeutung von Tumor-Mikropartikeln für die  
Fibrinbildung und Metastasierung des  
Pankreaskarzinoms**

von Petra Vrabcová

aus Chrudim (CZ)

München 2015

---

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen  
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:  
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. Stefan Bauersachs

Angefertigt am: Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinikum Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Mentor: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

---

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. Stefan Bauersachs

**Korreferent/en:** Priv.-Doz. Dr. Petra Kölle

**Tag der Promotion: 18. Juli 2015**

---

**Für meine Familie**

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>3</b>
1.1 Mikrovesikel .....	3
1.1.1 Mikropartikel (MP) .....	3
1.1.1.1 Eigenschaften der MP .....	3
1.1.1.2 Funktionen der MP .....	4
1.1.1.3 Pathologische Wirkungen von MP .....	4
1.1.2 Exosomen .....	5
1.1.2.1 Eigenschaften der Exosomen .....	5
1.1.2.2 Pathologische Bedeutung der Exosomen .....	6
1.2 Pankreaskarzinom .....	7
1.3 Metastasierung des Pankreaskarzinoms .....	8
1.3.1 Metastasierungsprozess .....	8
1.3.2 Bildung der prämetastatischen Nische .....	8
1.3.3 Metastasierung und Blutgerinnung .....	10
1.4 Mechanismen der Fibrinbildung .....	10
1.4.1 Fibrinbildung als „Host Defense Mechanismus“ .....	11
1.5 Tumor-assoziierte Thrombose .....	12
1.5.1 Mechanismen der DVT .....	12
1.6 Zielsetzung .....	13
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Material .....	14
2.1.1 Geräte .....	14
2.1.2 Verbrauchsmaterial .....	14
2.1.3 Chemikalien/Reagenzien .....	15
2.1.4 Antikörper (AK) .....	16
2.1.5 Puffer .....	17
2.1.6 Zelllinien .....	18
2.2. Methoden .....	19
2.2.1 Zellkultur .....	19
2.2.1.1 Verwendete Zelllinien .....	19
2.2.1.2 Kultivierung von Zellen .....	19
2.2.1.3 Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen .....	20

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung .....	20
2.2.1.5 Zellaufschluss .....	20
2.2.1.5.1 Lyse der Zellen durch Einfrieren und Auftauen .....	20
2.2.1.5.2 Lyse der Zellen durch Ultraschall .....	20
2.2.2 Versuche mit Vollblut .....	21
2.2.2.1 Blutentnahme .....	21
2.2.2.2 Thrombelastographie (TEG).....	21
2.2.3 Mikrovesikel- Isolierung .....	22
2.2.3.1 Isolierung von zirkulierenden MP aus humanem Vollblut.....	22
2.2.3.2 Isolierung von MP aus Pankreaskarzinom-Zellen.....	22
2.2.3.3 Exosomen-Isolierung aus karzinomatösen Zelllinien.....	22
2.2.4 Faktor Xa Bildung.....	22
2.2.5 Faktor XIIa Bildung.....	23
2.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry.....	23
2.2.7 Flusskammer-Versuche .....	23
2.2.7.1 Methode.....	23
2.2.7.2 Protokoll.....	24
2.2.8 Transfektion von Tumorzellen mit siRNA und shRNA.....	24
2.2.9. Generierung von stabil transfizierten Zelllinien .....	24
2.2.10 Western Blot .....	25
2.2.11 Proteomanalyse.....	26
2.2.11.1 Probenvorbereitung.....	26
2.2.11.2 Methode .....	26
2.2.12 <i>In vivo</i> Versuche .....	27
2.2.12.1 Fibrinbildung und Metastasierung im orthotopen und transgenen Mausmodell.....	27
2.2.12.2 DVT-Mausmodell.....	29
2.2.13 Histologie.....	30
2.2.13.1 Vorbereitung und Anfertigung von Kryo- und Paraffinpräparaten .....	30
2.2.13.2 Carstair's Färbung.....	31
2.2.13.3 Immunhistochemische Färbungen .....	32
2.2.13.3.1 Ki67-Färbung.....	32
2.2.13.3.2 Cytokeratin 19-Färbung.....	33
2.2.13.3.3 $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)-Färbung.....	34
2.2.13.3.4 Morphologisch veränderte Strukturen .....	35
2.2.13.4 Immunfluoreszenz-Färbungen .....	35
2.2.13.4.1 Fluoreszenz-Färbung von neutrophilen Granulozyten .....	35
2.2.14 Markierung von MP .....	36

2.2.15 Fluoreszenzmikroskopie.....	36
2.2.16 Konfokale Mikroskopie.....	36
2.2.17 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen .....	37
2.2.18 Statistik.....	37
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
3.1. Mechanismen der <i>in vitro</i> Gerinnungsaktivierung durch karzinomatöse Zellen und Mikrovesikel .....	38
3.1.1 TEG.....	38
3.1.2 Faktor Xa Aktivitätsmessung.....	38
3.1.3 Intrinsischer und extrinsischer Blutgerinnungsweg .....	40
3.1.3.1 Intrinsischer Blutgerinnungsweg .....	40
3.1.3.1.1 Faktor XIIa Aktivitätsmessung.....	40
3.1.3.1.2 Fibrinbildung nach Zugabe von CTI .....	40
3.1.3.2 Extrinsischer Blutgerinnungsweg.....	41
3.1.3.2.1 TF.....	41
3.1.4 Koagulationsfaktor VII, IX, X und XI .....	42
3.1.5 Mucin-1 (Muc-1).....	43
3.1.5.1 Nachweis der Expression von Muc-1 auf KCP-Zellen.....	44
3.1.5.2 Bedeutung von Muc-1 für die Koagulation.....	44
3.1.6 Mucin-4 (Muc-4).....	45
3.2 Proteomanalyse der Zellen und MP des orthotopen und transgenen Modells .....	45
3.2.1 Nachweis von RacGAP1 und KIF23 in Pankreaskarzinomzellen und -MP mittels Western Blot.....	48
3.3 Wirkungen der karzinomatösen MP auf die Thrombenbildung und Thrombose <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> .....	49
3.3.1 Karzinomatöse MP im Flusskammermodell .....	49
3.3.2 Induktion der DVT durch karzinomatöse MP <i>in vivo</i> .....	49
3.4 Fibrinbildung und mikrovaskuläre Thrombose im orthotopen und transgenen Tiermodell .....	51
3.5 MP-induzierte Bildung prämetastatischer Nischen .....	55
3.5.1 $\alpha$ -SMA.....	55
3.5.2 Neutrophile Granulozyten.....	57
3.6 Metastasierung des Pankreaskarzinoms im orthotopen und transgenen Tiermodell .....	58
3.6.1 Ki67-Färbung .....	58
3.6.2 Cytokeratin 19-Färbung .....	60
3.6.3 Morphologisch veränderte Leberstrukturen .....	61

---

4. Diskussion .....	64
4.1 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms .....	64
4.2 Aktivierung der Koagulation durch Pankreaskarzinomzellen und -Mikrovesikel in vitro .....	64
4.2.1 Aktivierung des extrinsischen Blutgerinnungsweges durch Pankreaskarzinomzellen und -MP .....	65
4.2.2 Bedeutung von Mucinen für die Blutgerinnungsaktivierung durch Pankreaskarzinomzellen und -Mikrovesikel .....	66
4.3 Proteomanalyse von Pankreaskarzinomzellen und -MP .....	66
4.4 Bildung von DVT durch MP des Pankreaskarzinoms in vivo .....	67
4.5 Bildung von Mikrogefäßthrombosen in Lebergefäßen durch karzinomatöse MP in vivo .....	68
4.6 Bildung einer prämetastatischen Nische durch Tumor-MP in vivo .....	69
4.7 Steigerung der Metastasierung durch karzinomatöse MP in vivo .....	70
4.8 Mechanismen der Metastasierung des Pankreaskarzinoms durch karzinomatöse MP .....	71
5. Zusammenfassung .....	73
6. Summary .....	74
7. Literaturverzeichnis .....	75
8. Anhang .....	88
8.1 Carstair's Färbung .....	88
8.2 Färbung der neutrophilen Granulozyten .....	94
9. Publikationen .....	96
10. Danksagung .....	97

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATPase	Adenosintriphosphatase
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CT	Clotting Time
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
Da	Dalton
DCF	5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidylester
def.	defizient
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DVT	Deep vein thrombosis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FGF	Fibroblast Growth Factor
FBS	Fetal Bovine Serum
HE	Hämatoxylin-Eosin
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K	Kalium
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
KIF23 (=MKLP1)	Kinesin-like protein 23
kLSM	konfokale Laser Scan Mikroskopie
MMP	Matrix-Metallo-Proteinase
MP	Mikropartikel
mRNA	Messenger RNA
miRNA	Micro RNA
Muc-1	Mucin-1
Muc-4	Mucin-4

MVB	Multivesicular Bodies
Na	Natrium
neg.	negativ
n.s.	nicht signifikant
Opti-MEM	Opti-Minimal Essential Medium
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PRP	Platelet Rich Plasma
RacGAP1	Rac GTPase-activating protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
siRNA	small interfering RNA
shRNA	small hairpin RNA
TEG	Thrombelastographie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Tissue Factor
TNC	Trinatriumcitrat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WT	Wildtyp

## 1. Einleitung

### 1.1 Mikrovesikel

Zellen unterschiedlichen Ursprungs setzen spontan sog. Mikrovesikel frei (Wolf 1967, Müller *et al.* 2003). Diese extrazellulären Vesikel haben einen Durchmesser von 30 nm bis 800 nm. Der Begriff Mikrovesikel umfasst Mikropartikel und Exosomen, welche sich in Größe und Freisetzungsmechanismus jedoch unterscheiden.

#### 1.1.1 Mikropartikel (MP)

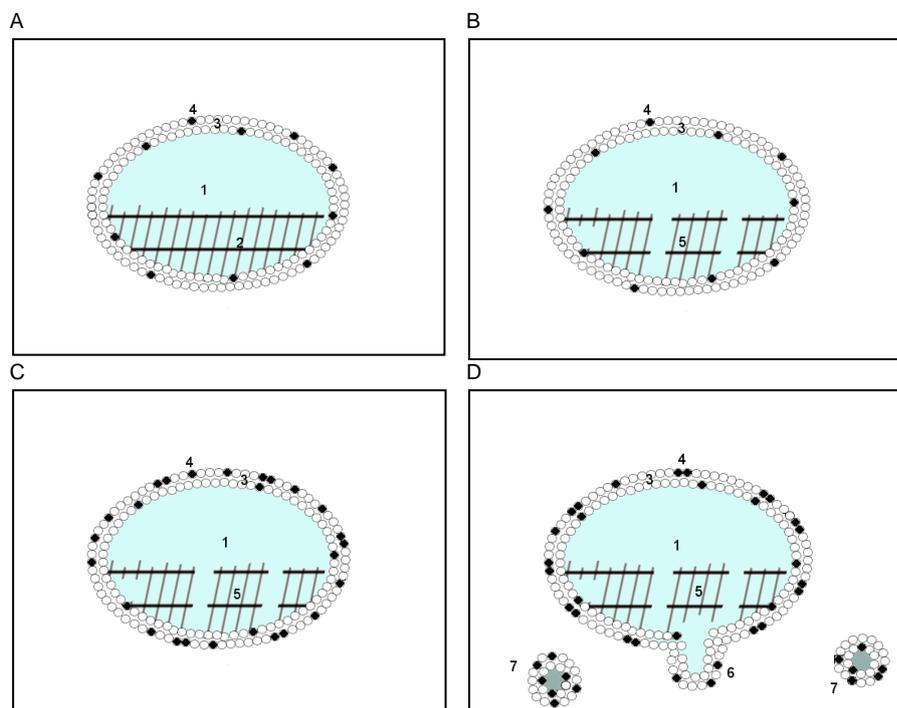
##### 1.1.1.1 Eigenschaften der MP

Bei MP handelt es sich um Abschnürungen der Zellmembran mit einem Durchmesser von 100 nm bis 800 nm, welche physiologischerweise im Blut von gesunden Individuen zirkulieren. Diverse Zellen wie z.B. Thrombozyten, Endothelzellen, Erythrozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten (Nieuwland *et al.* 1997, Nieuwland *et al.* 2000, Berckmans *et al.* 2001), jedoch auch Tumorzellen, sezernieren MP kontinuierlich durch Exozytose in den Extrazellulärraum (Zwicker *et al.* 2008). MP verschiedener Zellen unterscheiden sich dadurch voneinander, dass sie jeweils die Proteine ihrer Ursprungszelle auf ihrer Oberfläche tragen (van Wijk *et al.* 2003).

Die MP-Freisetzung geschieht vermehrt infolge von Apoptose (infolge der Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase ROCK I) (Coleman *et al.* 2001) oder nach Zellaktivierung durch diverse Agonisten, so z.B. bei Thrombozyten durch Thrombin, Kollagen und ADP (Wiedmer *et al.* 1991, Gemmel *et al.* 1993, Siljander *et al.* 1996). Aber auch sog. „Shear Stress“, sprich eine durch den Blutfluss bedingte, im Blutgefäß herrschende laminare Schubspannung, (Miyazaki *et al.* 1996, Reiningger *et al.* 2006), Hypoxie und oxidativer Stress tragen zu einer gesteigerten MP-Sekretion bei (Ratajczak *et al.* 2006).

MP sind von einer Phospholipid-Doppelschicht umgeben (Weerheim *et al.* 2002). Die Freisetzung der MP erfolgt infolge eines Anstiegs des Calciums im Zytosol der Ursprungszelle (Wiedmer *et al.* 1990), welcher von einer Disruption des Zytoskeletts der Ursprungszelle (Abb. 1 A, B), einem Wechsel von negativ geladenen Phospholipiden wie Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran (Abb. 1 C) und der Freisetzung der MP durch Exozytose begleitet wird (Abb. 1 D). Phosphatidylserin befindet sich während des Ruhezustandes der Zelle in der inneren Schicht der Zellmembran und wird erst durch die Aktivität der Enzyme Floppase und Lipid-Scramblase nach außen befördert (Zwaal *et al.* 1997, Bevers *et al.* 1999). Auch Phosphatidylethanolamin wird dabei verstärkt an die Außenseite der Zellmembran gebracht. An diese exponierten Phospholipide können diverse Gerinnungsfaktoren binden. Schließlich können durch den Einbau der Phospholipide in den

Prothrombinase- und Tenase-Komplex der intrinsische sowie der extrinsische Blutgerinnungsweg aktiviert werden (van Wijk *et al.* 2003, Piccin *et al.* 2007, Key *et al.* 2010).



**Abb.1: Schematische Darstellung der MP-Freisetzung (modifiziert nach van Wijk *et al.* 2003)**

**A:** ruhende Zelle (1) mit intaktem Zytoskelett (2); an der Innen- und Außenseite

der Zellmembran (3) befinden sich negativ geladene Phospholipide (4, schwarze Punkte)

**B:** Disruption des Zytoskeletts (5)

**C:** negativ geladene Phospholipide (4) gelangen verstärkt an die Außenseite der Zellmembran (3)

**D:** Exozytose (6) von MP (7)

### 1.1.1.2 Funktionen der MP

Den MP werden vielfältige Funktionen zugeschrieben. MP spielen eine tragende Rolle bei der Aktivierung der Blutgerinnung. Zum einen weisen MP Phospholipide wie Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche auf, welche die Blutgerinnung aktivieren (Nieuwland *et al.* 1997, Nieuwland *et al.* 2000). Zum anderen wurde das Vorhandensein von prokoagulatorischen Proteinen auf der MP-Oberfläche beschrieben. So wurde auf den im Blut zirkulierenden MP Tissue Factor (TF) beobachtet, das Starterprotein des extrinsischen Blutgerinnungsweges (Müller *et al.* 2003).

MP sind auch an der Angiogenese beteiligt, indem sie beispielsweise proangiogenetische mRNAs für Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Fibroblast Growth Factor (FGF), Angiopoetin 1, Ephrin A 3, Matrixmetalloproteinase (MMP) 2, und MMP 9 enthalten (Grange *et al.* 2011). Auch durch die Bildung von Fibrin, welches als Matrix für die Bildung neuer Blutgefäße dienen kann, wirken MP proangiogenetisch (van Doormaal *et al.* 2009).

### 1.1.1.3 Pathologische Wirkungen von MP

Eine gewisse Anzahl an MP findet man bereits im Blut von gesunden Menschen (Berckmans *et al.* 2001). Unter pathologischen Bedingungen sind die MP-Spiegel jedoch erhöht. Dies ist

beispielsweise der Fall bei Diabetes mellitus (Nomura *et al.* 1998), thrombotischen Erkrankungen (Preston *et al.* 2003) und Neoplasien, insbesondere beim Pankreaskarzinom, Ovarial- und Mammakarzinom (Tesselaar *et al.* 2007, Zwicker *et al.* 2009) sowie beim kolorektalem Karzinom (Hron *et al.* 2007).

Bei Patienten mit Pankreaskarzinom wurde ein erhöhter Spiegel an TF beobachtet (Tesselaar *et al.* 2007, Haubold *et al.* 2009, Thomas *et al.* 2009, Zwicker *et al.* 2009, Thaler *et al.* 2012, van Doormaal *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012). Untersuchungen zeigen, dass Pankreaskarzinompatienten verstärkt TF-tragende MP im Blut aufweisen und sich ihre Prognose mit steigender TF-Aktivität der MP verschlechtert (Bharthuar *et al.* 2013, Thaler *et al.* 2013). Zusätzlich wird auch eine prokoagulatorische Wirkung von Mucinen auf der Oberfläche von karzinomatösen MP vermutet (Tesselaar *et al.* 2007, Zwicker *et al.* 2009, Wang *et al.* 2012). Letztlich erhöhen diese prokoagulatorischen Eigenschaften der MP bei Krebspatienten das Risiko eine thromboembolische Erkrankung zu entwickeln (Tesselaar *et al.* 2007).

Karzinomatöse MP vermögen Zellen durch die Fusion mit der zellulären Plasmamembran zu transformieren. So können MP die onkogene Form des Epidermal Growth Factor Receptor, den Epidermal Growth Factor Receptor variant III (EGFRvIII), von aggressiven Gliomzellen auf weniger aggressive Gliomzellen transferieren (Al-Nedawi *et al.* 2008). Antonyak *et al.* (2011) beschreiben die Übertragung von Gewebetransglutaminase und Fibronectin durch karzinomatöse MP auf Fibroblasten sowie Endothelzellen und die damit verbundene onkogene Transformierung dieser Zellen. Auch RNA kann von karzinomatösen MP auf Akzeptorzellen transferiert werden (Baj-Krzyworzeka *et al.* 2006).

Von besonderer Bedeutung könnte die Beteiligung der MP an der Bildung der sog. prämetastatischen Nische sein (Kap. 1.3.2). So könnten MP Tumorzellen rekrutieren, sie bei deren Absiedlung ins Gewebe unterstützen und bei der Ausbildung einer für den Tumor empfänglichen Mikroumgebung helfen (Antonyak *et al.* 2012, Martins *et al.* 2013). Beispielsweise verstärken MP aus renalen CD 105-positiven Tumorstammzellen die Expression von Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (VEGFR 1), VEGF und MMP 2 und sind somit an der Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Lunge beteiligt (Grange *et al.* 2011).

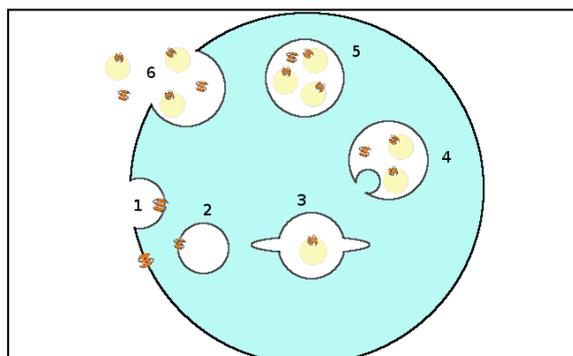
## **1.1.2 Exosomen**

### **1.1.2.1 Eigenschaften der Exosomen**

Exosomen sind kleine Mikrovesikel mit einem Durchmesser von 30 nm bis 100 nm (Johnstone *et al.* 1987, Wolfers *et al.* 2001, Garnier *et al.* 2012). Ähnlich wie MP enthalten Exosomen miRNAs, mRNAs, DNA-Fragmente sowie Proteine und Lipide, die sich je nach Ursprungszelle unterscheiden können (Stoorvogel *et al.* 2002, Schorey *et al.* 2008, Kahlert *et*

al. 2013). Johnstone *et al.* (1987) beschreiben die Bildung von Exosomen als einen Mechanismus, welcher es den Zellen ermöglicht überschüssige Proteine zu externalisieren, z.B. indem Exosomen zur Entfernung des Transferrin-Rezeptors während der Retikulozyten-Reifung dienen. Aber nicht nur Retikulozyten, sondern beispielsweise auch Thrombozyten (Heijnen *et al.* 1999), B-Lymphozyten (Raposo *et al.* 1996), Epithelzellen (Karlsson *et al.* 2001), dendritische Zellen (Théry *et al.* 1999), Neuronen (Marzesco *et al.* 2005) sowie Tumorzellen (Trams *et al.* 1981, Wolfers *et al.* 2001) setzen kontinuierlich (Hood *et al.* 2011) Exosomen frei.

Die Entstehung von Exosomen besteht aus mehreren Schritten (Abb. 2). Der Prozess beginnt mit der Bildung von frühen Endosomen. Hierbei handelt es sich um durch clathrinvermittelte Endozytose entstehende Vesikel, welche sich in der Zellperipherie befinden. Nach einem Reifungsprozess wandeln sie sich zu späten Endosomen um, welche in der Nähe des Zellkernes lokalisiert sind. Durch die Einstülpung der limitierenden endosomalen Membran werden aus späten Endosomen sog. Multivesicular Bodies (MVB) gebildet. Diese werden infolge einer Fusion mit der Plasmamembran als Exosomen in den Extrazellulärraum freigesetzt (Stoorvogel *et al.* 1991).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Exosomen-Freisetzung (modifiziert nach Stoeck *et al.* 2006)**

Bei der Exosomen-Freisetzung werden zunächst Membranproteine in Lipidvesikeln (1) endozytiert (2). Diese sog. frühen Endosomen (3) reifen zu späten Endosomen (4). Nach der Einstülpung der limitierenden endosomalen Membran (4) entstehen Multivesicular Bodies (5), welche durch die Fusion mit der Plasmamembran als Exosomen (6) sezerniert werden.

### 1.1.2.2 Pathologische Bedeutung der Exosomen

Tumor-Exosomen können das Onkoprotein MET auf Knochenmarksvorläuferzellen übertragen. Dadurch werden Knochenmarksvorläuferzellen mobilisiert und nehmen einen prometastatischen Phänotyp an, was das Tumorwachstum und die Metastasierung unterstützt (Peinado *et al.* 2012). Von Bedeutung sind Exosomen ferner im Metastasierungsprozess durch ihre Beteiligung an der Bildung einer prämetastatischen Nische (Jung *et al.* 2009, Hood *et al.* 2011). Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass von Melanomen stammende Exosomen die Rekrutierung von Melanomzellen zu den ipsilateralen Lymphknoten, die Deposition einer extrazellulären Matrix sowie eine Gefäßproliferation in diesen Lymphknoten bewirken können (Hood *et al.* 2011).

Des Weiteren vermögen Exosomen Erreger wie z.B. Prionen zu transportieren (Vella *et al.* 2008). Multivesicular Bodies können zudem als Akkumulationsort des HI-Virus in humanen Makrophagen dienen (Nguyen *et al.* 2003, Pelchen-Matthews *et al.* 2004).

Schließlich könnten Exosomen ebenso wie MP eine prokoagulatorische Wirkung aufweisen, indem sie TF enthalten und auf Akzeptorzellen übertragen (Garnier *et al.* 2012, Park *et al.* 2012).

## 1.2 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom gehört zu den weltweit am häufigsten zum Tode führenden Tumorerkrankungen. In Deutschland werden pro Jahr ca. 8.000 neue Fälle diagnostiziert, in den USA sind es ca. 33.000 neue Fälle pro Jahr (Krejs *et al.* 2010).

Bei den Karzinomen des Pankreas handelt es sich zum größten Teil um duktale Adenokarzinome (Yeo *et al.* 2002). Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist noch weitgehend ungeklärt. Als prädisponierend für dessen Entstehung werden ein hoher Nikotinkonsum (Schulte *et al.* 2014), Adipositas (Michaud *et al.* 2001), chronische Pankreatitis (Lowenfels *et al.* 1993), Diabetes Mellitus (Everhart *et al.* 1995) sowie genetische Veränderungen, z.B. in Form von Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA2 (Murphy *et al.* 2002) oder p16 (Borg *et al.* 2000) angesehen. Experimentelle Untersuchungen ergaben, dass das Pankreaskarzinom aus einer Reihe von Genmutationen wie Mutationen von Kras, p53 und DPC4/SMAD4 (Leung *et al.* 2013, Shin *et al.* 2013) entsteht.

Das Pankreaskarzinom wird bei Männern etwas häufiger diagnostiziert als bei Frauen. Bei Diagnosestellung beträgt das Durchschnittsalter bei beiden Geschlechtern 60-65 Jahre (Moore *et al.* 2001, Yeo *et al.* 2002, Klein *et al.* 2013). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei nur ca. 5 % (Jemal *et al.* 2011), denn die Inzidenzrate ist nahezu identisch mit der Mortalitätsrate (Hahn *et al.* 2005). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Patienten zum einen für eine lange Zeit keine klinischen Symptome aufweisen. Treten diese auf, sind sie meist unspezifisch. Es kommt beispielsweise zu Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Erbrechen, gastrointestinalen Schmerzen oder Ikterus. Dies erschwert eine Frühdiagnose des Tumors. Zum anderen trägt auch die Aggressivität der Erkrankung, bedingt durch lokalinvasives Wachstum und eine frühzeitige hämatogene und lymphogene Metastasierung des Tumors zur schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms bei (Yeo *et al.* 2002). Des Weiteren stellt das Fehlen einer effektiven Behandlung ein großes Problem dar. Es sind Therapieansätze mit Radio- und Chemotherapie vorhanden, die einzige kurative Behandlung besteht allerdings in der chirurgischen Resektion nach Whipple (Andersson *et al.* 2004). Jedoch befinden sich mehr als 80 % der Tumore zum Zeitpunkt der Diagnosestellung nicht mehr in einem resezierbaren Stadium (Paulson *et al.* 2013).

## 1.3 Metastasierung des Pankreaskarzinoms

### 1.3.1 Metastasierungsprozess

Der Prozess der Metastasierung beginnt generell mit der Umwandlung der Zellen des Primärtumors vom epithelialen in den mesenchymalen Zelltyp. Nach der Degradierung und Remodellierung der Extrazellulärmatrix durch Tumorzell-eigene Proteasen können die Tumorzellen ins angrenzende Gewebe gelangen. Sie verlieren ihre Adhäsionseigenschaften, gewinnen an Migrationsvermögen und Invasivität. Anschließend erfolgt die Einwanderung der Tumorzellen in Blut- und Lymphgefäße. Damit kann es zur Extravasation und der Absiedlung ins Gewebe kommen (Oppenheimer *et al.* 2006, Geiger *et al.* 2009).

Bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms sind neben Zellen mit dem Vermögen zur epithelial-mesenchymalen Transition insbesondere sog. Krebsstammzellen von besonderer Bedeutung. Diese entstehen in Folge von genetischen Veränderungen (c-kit und Kras-Mutationen) sowie Änderungen von Signalwegen (Hedgehog, Notch, Wnt, AKT, NF-κB). Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, beispielsweise durch aktive Telomerase-Expression, durch Resistenzen gegenüber Medikamenten sowie durch Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen (Tanase *et al.* 2014). Ferner tragen beispielsweise auch von Makrophagen, T- und B-Zellen sezernierte proinflammatorische Cytokine (Interleukin-1), von Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen sezernierte Chemokine (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2) sowie Mastzellen zur Metastasierung des Pankreaskarzinoms bei (Wörmann *et al.* 2014). Auch pankreatische Stellatumzellen spielen durch die Produktion von Kollagen-Stroma und durch die Interaktion mit Tumorzellen eine Rolle bei der Metastasierung des Pankreaskarzinoms (Xu *et al.* 2014).

Insgesamt gesehen ist die Metastasierung von Tumorzellen ein ineffektiver Vorgang, da nur weniger als 0,01 % der zirkulierenden Krebszellen überleben und metastasieren können. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass es in der Blutzirkulation zur Desintegration der Tumorzellen kommen kann (z.B. durch Shear Stress) bzw. die Tumorzellen durch Phagozytose-Zellen, wie z.B. Kupffer-Zellen, internalisiert und degradiert werden (Talmadge *et al.* 2010).

### 1.3.2 Bildung der prämetastatischen Nische

Für die Metastasierung des Pankreaskarzinoms ist die Bildung einer prämetastatischen Nische zu Beginn der Metastasierungskaskade von erheblicher Bedeutung. Bei der prämetastatischen Nische handelt es sich um ein Areal im Gewebe, in welchem sich metastatische Zellen ansiedeln, überleben und proliferieren können. Das Konzept der prämetastatischen Nische geht auf Steven Paget's „Seed and Soil“ Hypothese zurück (Psaila *et al.* 2009).

Diese besagt, dass Tumorzellen oder Tumorstammzellen als Saat („seed“) und die Mikroumgebung eines Organs, sprich die prämetastatische Nische, als Boden („soil“) für die Metastasierung fungieren. Eine empfängliche Mikroumgebung ist für die Absiedlung der Krebszellen und deren Wachstum in vom Primärtumor entfernt gelegenen Geweben offensichtlich essenziell. So beobachtete Paget, dass manche Organe, wie z.B. die Leber, unabhängig von ihrer Durchblutung, empfänglicher für Metastasierung sind (Paget 1989).

Bei der Bildung einer prämetastatischen Nische setzen zuerst Tumorzellen und mit ihnen interagierende Stromazellen Chemokine und Wachstumsfaktoren wie den Plazental Growth Factor und den Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) frei. Fibroblasten werden somit zur Fibronectin-Produktion angeregt und hämatopoetische Knochenmarksvorläuferzellen aktiviert. Diese siedeln sich in Gewebearealen an, in welchen vermehrt Fibronectin gebildet wurde und sezernieren zusätzlich MMP-9, wodurch die Basalmembran degradiert und die weitere Ansiedlung dieser Zellen gefördert wird (Kaplan *et al.* 2005). Schließlich kommt es unter Vermittlung der hämatopoetischen Knochenmarksvorläuferzellen, der mit ihnen assoziierten Stromazellen sowie durch Fibronectin zu einer Veränderung der gewebeassoziierten Mikroumgebung. Dadurch werden wiederum weitere Chemokine und Integrine aktiviert und Tumorzellen rekrutiert (Kaplan *et al.* 2006). Zusätzlich sind auch Myofibroblasten und neutrophile Granulozyten an der Bildung einer prämetastatischen Nische beteiligt. Myofibroblasten, sog. Tumor-assoziierte Fibroblasten, können aus residenten Fibroblasten entstehen. Beschrieben wurden aber auch eine Rekrutierung der Fibroblasten aus dem Knochenmark, ihre Entstehung aus mesenchymalen Stammzellen sowie aus Epithelzellen nach epithelial-mesenchymaler Transition (Radisky *et al.* 2007, Zeisberg *et al.* 2007, Spaeth *et al.* 2009). Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren, Cytokinen, Chemokinen sowie Matrix-degradierenden Enzymen induzieren Tumor-assoziierte Fibroblasten eine geeignete Mikroumgebung für das Tumorstadium und können so an der Ausbildung einer prämetastatischen Nische beteiligt sein (Spaeth *et al.* 2009).

Auch neutrophile Granulozyten vermögen die Extrazellulärmatrix zu remodellieren und nach ihrer Extravasation eine empfängliche Mikroumgebung für Tumorstadium und Metastasierung zu induzieren (De Larco *et al.* 2004, Psaila *et al.* 2009). In der Leber unterstützen die Neutrophilen Tumorstadium bei deren Adhäsion an das sinusoidale Endothel (McDonald *et al.* 2009). Des Weiteren kann das von neutrophilen Granulozyten exprimierte Bv8-Protein die Angiogenese stimulieren und damit pro-metastatisch wirken (Shojaei *et al.* 2008).

### 1.3.3 Metastasierung und Blutgerinnung

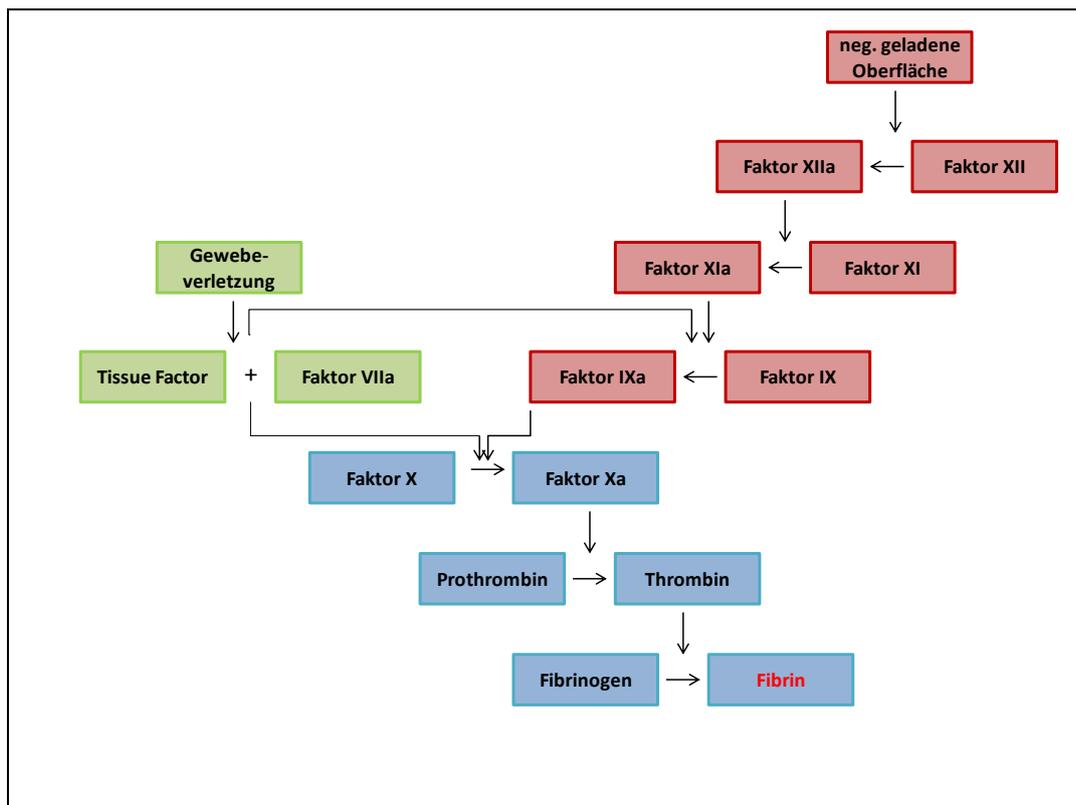
Die lokale Aktivierung der Blutgerinnung in der Mikrozirkulation scheint für den Metastasierungsvorgang förderlich zu sein. Verschiedene Autoren zeigten bereits, dass die Inhibierung von TF (Mueller *et al.* 1992), P-Selectin (Kozlowski *et al.* 2011), Thrombin (Esumi *et al.* 1991) oder Fibrinogen (Palumbo *et al.* 2000) die Metastasierung von Melanomen, Lungen- bzw. kolorektalen Karzinomen reduziert. Die Bildung eines Blutgerinnsels kann möglicherweise die Ausbreitung der Tumorzellen begünstigen und sie vor Natürlichen Killerzellen (Bobek *et al.* 2005) oder Shear Stress (Konstantopoulos & McIntire 1996) in den Blutgefäßen schützen. Thrombozyten wiederum können durch ihre Interaktion mit Tumorzellen die epithelial-mesenchymale Transition einleiten (Labelle *et al.* 2011) oder das Tumorwachstum direkt stimulieren, indem sie Wachstumsfaktoren und Chemokine freisetzen (Gay & Felding-Habermann 2011).

### 1.4 Mechanismen der Fibrinbildung

Die Fibrinbildung kann auf einem intrinsischen und einem extrinsischen Blutgerinnungsweg erfolgen. Durch beide Wege kommt es zur Aktivierung des Faktors X, welcher die Bildung von Thrombin und anschließend von Fibrin induziert. Die Gerinnungsfaktoren sind Serinproteasen (mit Ausnahme der Glykoproteine Faktor V und Faktor VIII), die vor ihrer Aktivierung als Zymogene vorliegen.

Bedeutsamer *in vivo* ist der extrinsische Gerinnungsweg (Abb. 3). Dessen Aktivierung beginnt mit der auf einer Gewebeverletzung basierenden Exposition des Transmembranproteins TF. TF (auch Faktor III, CD 142, Thromboplastin) wandelt zusammen mit Faktor VIIa den Faktor X zu Faktor Xa um. Dieser konvertiert in einem Prothrombinasekomplex mit Faktor Va, Calcium und Phospholipiden Prothrombin zu Thrombin. Thrombin spaltet daraufhin Fibrinogen zu Fibrin (Hemker *et al.* 1995, Lane *et al.* 2005, Peraramelli *et al.* 2013). Zusätzlich kann TF zusammen mit Faktor VIIa auch Faktor IX aktivieren und den intrinsischen Gerinnungsweg beeinflussen (Lawson *et al.* 1994).

Der intrinsische Weg beginnt durch den Kontakt des Blutes mit einer negativ geladenen Oberfläche (z.B. Phospholipide, Lipoproteine, Bakterien), wodurch Faktor XII zu Faktor XIIa aktiviert wird (Abb. 3). Hierauf wird Präkallikrein zu Kallikrein konvertiert. Kallikrein seinerseits führt mit hochmolekularem Kininogen zur weiteren Aktivierung von Faktor XII. Faktor XIIa wandelt daraufhin Faktor XI zu Faktor XIa um. Dieser spaltet Faktor IX zu Faktor IXa. Zusammen mit Faktor VIIIa, Phospholipiden und Calcium bildet Faktor IXa schließlich den Tenase-Komplex, wodurch Faktor X zu Faktor Xa konvertiert wird und der gemeinsame Blutgerinnungsweg gestartet wird (Schmaier *et al.* 1999, Björkqvist *et al.* 2013).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade**

Grüner Rahmen: Extrinsischer Blutgerinnungsweg: Nach einer Gewebeverletzung geht TF einen Komplex mit Faktor VIIa ein. Der TF/Faktor VIIa-Komplex aktiviert auch Faktor IX und greift damit in den intrinsischen Blutgerinnungsweg ein.

Roter Rahmen: Intrinsischer Blutgerinnungsweg: Durch den Kontakt mit einer negativ geladenen Oberfläche wird Faktor XII zu Faktor XIIa konvertiert, Faktor XIIa spaltet Faktor XI zu Faktor XIa. Anschließend wird durch Faktor XIa der Faktor IX zu Faktor IXa umgewandelt.

Blauer Rahmen: Gemeinsamer Blutgerinnungsweg: Faktor X wird zu Faktor Xa aktiviert, woraufhin Prothrombin zu Thrombin konvertiert wird und aus Fibrinogen Fibrin gebildet wird.

#### 1.4.1 Fibrinbildung als „Host Defense Mechanismus“

Die Bildung von Gefäßthrombosen durch Wirtszellen kann den Organismus vor Pathogenen schützen (Massberg *et al.* 2010, Engelman & Massberg 2013). Die Pathogene können durch das Fibrin in Mikrogefäßen „eingefangen“ und dadurch an ihrer weiteren Disseminierung gehindert werden. Massberg *et al.* (2010) beobachten, dass bei Infektionen die von neutrophilen Granulozyten freigesetzten Serinproteasen und extrazellulären Nukleosomen den extrinsischen und intrinsischen Blutgerinnungsweg aktivieren. Dadurch können die Bakterien nicht in das Gewebe einwandern.

Analog dazu zeigen Luo *et al.* (2011), dass bei Infektionen mit dem gram-negativen Bakterium *Yersinia Enterocolitica* der Wirt den TF-abhängigen Gerinnungsweg aktiviert. Das Fibrin fördert die Absonderung von inflammatorischen Zytokinen und reduziert das Überleben der Bakterien. Ferner dient Fibrinogen auch als Ligand für das  $\alpha_m\beta_2$ -Leukozytenintegrin und vermag somit die Leukozytenfunktion und die angeborene Immunität zu stimulieren (Flick *et al.* 2004).

## 1.5 Tumor-assoziierte Thrombose

Schon im Jahr 1865 stellte der französische Internist Armand Trousseau einen direkten Zusammenhang zwischen Thrombosen und malignen Erkrankungen fest (Trousseau 1865). Viele neuere Studien bestätigen, dass Patienten mit Tumoren häufiger an venösen Thromboembolien leiden als Patienten ohne Karzinome (Khorana *et al.* 2004, Zwicker *et al.* 2007, Davila *et al.* 2008).

Der Begriff Venöse Thromboembolie umfasst die Tiefe Venenthrombose, welche sich vornehmlich als Tiefe Beinvenenthrombose (Deep Vein Thrombosis=DVT) äußert, und die Lungenembolie.

Ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung der DVT besteht beispielsweise bei Patienten mit Gehirn-, Ovarial- und Pankreaskarzinomen (Lee & Levine 2003, Blom *et al.* 2006, Zwicker *et al.* 2007, Khorana *et al.* 2008). Weiteren klinischen Untersuchungen zufolge ist einer von fünf DVT-Fällen Tumor-assoziiert (Zwicker *et al.* 2007). Patienten mit Tumor-assoziierten Thrombosen weisen, verglichen mit DVT-Patienten ohne Karzinome, eine vierfach höhere Rezidivrate für DVT auf (Prandoni *et al.* 2002). Außerdem geht DVT mit einer erhöhten Mortalität der Tumorpatienten einher (Chew *et al.* 2006, Khorana *et al.* 2007). Die Mechanismen der Entstehung der DVT bei Karzinompatienten sind noch unzureichend bekannt. Vermutet wird die Beteiligung des Transmembranrezeptors TF, welcher an den Blutgerinnungsfaktor VII bindet und somit den extrinsischen Blutgerinnungsweg aktiviert. TF wird zum einen von Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten infolge von inflammatorischen Prozessen freigesetzt, zum anderen aber auch durch die Tumorzellen selbst (Furie & Furie 2006). Ebenso vermögen tumoröse MP, welche TF auf ihrer Oberfläche tragen, gerinnungsfördernd zu wirken (Zwicker *et al.* 2007, Davila *et al.* 2008, Khorana *et al.* 2008). Des Weiteren können Tumor-MP auch Mucine exprimieren und auf diesem Wege prokoagulatorisch agieren (Tesselaar *et al.* 2007, Zwicker *et al.* 2009).

DVT kann möglicherweise ebenfalls durch die von Monozyten, Endothelzellen sowie von Tumorzellen freigesetzten pro-inflammatorischen Zytokine wie den Tumornekrosefaktor und Interferon Gamma (Zwicker *et al.* 2007) hervorgerufen werden, sowie durch die Cystein-Endopeptidase Cancer Procoagulant, welche von Krebszellen exprimiert wird und den Blutgerinnungsfaktor X direkt aktiviert (Gordon *et al.* 1981). Schließlich kann aber auch eine Chemotherapie zur Thrombosebildung bei Krebspatienten beitragen (Otten *et al.* 2004, Khorana *et al.* 2005).

### 1.5.1 Mechanismen der DVT

Für die Entstehung der DVT sind eine Reduktion oder eine Stase des Blutflusses, die Aktivierung des Gefäßendothels und Änderungen in der Blutzusammensetzung von

Bedeutung (Mackman *et al.* 2012, Schulz *et al.* 2013). Dies beschrieb schon im 19. Jahrhundert der Pathologe Rudolf Virchow (Virchow'sche Trias).

Verschiedene, miteinander interagierende Blutzellen spielen eine tragende Rolle bei der Entstehung der DVT. Durch die Restriktion des Blutflusses kommt es zunächst zur Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten an das Venenendothel. Dieser Vorgang ist abhängig von endothelialem P-Selectin. Schließlich werden auch Thrombozyten rekrutiert, welche die Fibrinbildung durch die Rekrutierung von Leukozyten und durch die Stimulierung der gerinnungsaktivierenden NETs (Neutrophil Extracellular Traps) fördern. Zudem ist auch der von Leukozyten stammende TF entscheidend für die Gerinnungsaktivierung im Rahmen der DVT (von Brühl *et al.* 2012).

## 1.6 Zielsetzung

DVT bildet die zweithäufigste Todesursache bei Patienten mit Pankreaskarzinom und ist mit einer erhöhten Mortalität verbunden (Khorana *et al.* 2004, Blom *et al.* 2006). Im Blut dieser Patienten wurden MP-Spiegel beobachtet, welchen prokoagulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Auf der Basis dieser Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit die folgenden Fragestellungen untersucht:

- Besitzen Pankreaskarzinomzellen und Pankreaskarzinom-Mikrovesikel prokoagulatorische Eigenschaften?
- Kommt es dabei zur Aktivierung des intrinsischen und/oder des extrinsischen Blutgerinnungsweges?
- Welche Bedeutung haben Tumor-MP bei DVT?
- Verursachen Tumor-MP und/oder Tumorzellen Mikrogefäßthrombosen?
- Welche Rolle spielt die Fibrinbildung in der Metastasierung des Pankreaskarzinoms?
- Produzieren die Wirtszellen Fibrin im Rahmen eines *Host Response Mechanismus* selbst, um sich vor den Krebszellen und deren MP zu schützen und die Metastasierung zu verhindern?
- Oder wird Fibrin durch die Zellen und/oder MP des Karzinoms selbst gebildet um der Abwehr durch das angeborene Immunsystem zu entkommen und somit mittels eines *Immune Escape Mechanismus* die Metastasierung zu ermöglichen?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

<p>ELISA Reader Dynatech MR7000          ELISA Reader Spectra Max Paradigm          Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 FS MOT          Konfokales Laserscanmikroskop LSM 510          Meta          Kryostat Leica CM 1850          Lichtmikroskop Axiovert 100          Mikrotom RM 2255          pH-Meter HI 221          Röntgenfilm- Entwicklungsmaschine          Rührer MR 2002          Schüttelgerät KS 250 basic          Sonifier Branson ® B15</p> <p>Sterilbank HLB 2472          Thrombelastograph D (Roteg)              • Küvetten Rotem          Ultrazentrifuge Optima™LE-80K          Vortex Genie-2          Waage MC1 LC 620 S          Wasserbad Julabo U3          Western Blot Kammer          Zählkammer Neubauer Improved          Zellkulturinkubator          Zentrifugen: Rotina 35R, Universal 32, Mikro          22R          Centrifuge 5415</p>	<p>Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)          Molecular Devices (Biberach a.d. Riss, D)          Zeiss (Jena, D)          Zeiss (Jena, D)</p> <p>Leica Biosystems (Wetzlar, D)          Zeiss (Jena, D)          Leica Biosystems (Wetzlar, D)          Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)          AGFA (Mortsel, B)          Heidolph (Schwabach, D)          IKA-Labortechnik (Staufen, D)          G. Heinemann Ultraschall-und Labortechnik          (Schwäbisch Gmünd, D)          Heraeus (Hanau, D)          Pentapharm GmbH (München, D)          Tem Innovations GmbH (München, D)          Beckman (München, D)          Bender&amp;Hobein AG (Zürich, CH)          Sartorius (Göttingen, D)          Julabo Labortechnik (Allentown, USA)          BioRad (München, D)          Brand (Wertheim, D)          Heraeus (Hanau, D)          Hettich (Tuttlingen, D)</p> <p>Eppendorf (Hamburg, D)</p>
--	--

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

<p>Gewebekulturflaschen 250 ml, 750 ml          Menzel Deckgläser 18x18 mm, 24x50 mm,          Menzel-Gläser Superfrost          Multiwell Platten 96-well, flach          Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap          Röntgenfilm (Fuji Medical) 18 x 24 cm          Stripette 5 ml, 10 ml          Transferpipetten 3,5 ml          Ultrazentrifugenröhrchen (11 x 60 mm)          Zentrifugenröhrchen, konisch aus          Polypropylen, 15 ml, 50 ml</p>	<p>BD Falcon™ (Heidelberg, D)          Thermo Scientific (Braunschweig, D)</p> <p>BD Biosciences (Heidelberg, D)          Sarstedt (Nümbrecht, D)          Fujifilm Europe GmbH (Düsseldorf, D)          Corning (München, D)          Sarstedt (Nümbrecht, D)          Beckman Coulter (Krefeld, D)          BD Falcon™ (Heidelberg, D)</p>
---	--

### 2.1.3 Chemikalien/Reagenzien

Aniline Blue Solution	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Beriplex P/N 500	CSL Behring (Hattersheim am Main, D)
BSA Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
BSA Standard for Protein Assay	Interchim (Montlucon, F)
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Control si-RNA	Calbiochem (Darmstadt, D)
Corn Trypsin Inhibitor	Calbiochem (Darmstadt, D)
Dako EnVision™+System-HRP (DAB)	Dako (Hamburg, D)
DCF 5–(and-6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester	Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dc Protein Assay Reagenz A und B	BioRad (München, D)
Desirudin	Canyon Pharmaceuticals GmbH (Bahlingen a.K., D)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Ethanol 70%	Roth (Karlsruhe, D)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Ferric Ammonium Sulfate 5% Solution	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Fish Skin Gelatine	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe, D)
Freezing Medium	Ibidi (Planegg, D)
Goat Serum	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Glukose	Roth (Karlsruhe, D)
Glycerol	Calbiochem (Darmstadt, D)
Hepes	Roth (Karlsruhe, D)
Human Factor XII	Haematologic Technologies Inc. (Vermont, USA)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Kollagen Typ I	Nycomed Pharma GmbH (Konstanz, D)
Lipofectamine	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Magnesiumchlorid	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Mayer's Hematoxylin	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Methanol	Roth (Karlsruhe, D)
MKLP1 siRNA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
MKLP1 shRNA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Mowiol	Calbiochem (Darmstadt, D)
Mucin-1 siRNA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Mucin-1 shRNA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogencarbonat	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, D)
Non Essential Amino Acids	Pan Biotech (Aidenbach, D)

Opti@MEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder	Bachem AG (Bubendorf, D)
PCK	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, D)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Peroxidase Substrate Kit DAB	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Phosphotungstic Acid, 1% Aqueous Solution	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Picric Acid Orange G Solution	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Ponceau-Acid Fuchsin Solution	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Puromycin Dihydrochloride	Calbiochem (Darmstadt, D)
Rabbit Serum	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
RACGAP1 siRNA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
RACGAP1 shRNA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Rivaroxaban	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Roticlear	Roth (Karlsruhe, D)
Saponin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
S 2222	Haemochrom Diagnostica (Essen, D)
S 2302	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Thromboplastin	Siemens Healthcare (Marburg, D)
Thromborel S	Hartenstein (Würzburg, D)
Tissue Tek	Roth (Karlsruhe, D)
Tris	Roth (Karlsruhe, D)
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe, D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Trypsin EDTA (1x/10x)	PAA Laboratories (Cölbe, D)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurat)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
Vitamine	Pan Biotech (Aidenbach, D)

#### 2.1.4 Antikörper (AK)

purified mouse monoclonal anti-human anti-CD 142	BD Biosciences (Heidelberg, D)
rabbit polyclonal anti- $\alpha$ -SMA	Abcam (Cambridge, UK)
rat monoclonal anti-mouse anti-Cytokeratin 19 (Troma III)	University of Iowa, Developmental Studies Hybridoma Bank
rabbit polyclonal anti-human anti-Fibrinogen	Dako (Hamburg, D)
goat biotinylated anti-mouse IgG	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
purified monoclonal anti-mouse anti-IgG 1, $\kappa$ Isotype	BD Biosciences (Heidelberg, D)
goat biotinylated anti-rabbit IgG	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
rabbit biotinylated anti-rat IgG	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
rabbit monoclonal anti-human anti-Ki67	Abcam (Cambridge, UK)
purified rat anti-mouse anti-Ly-6G	BD Biosciences (Heidelberg, D)
rabbit polyclonal anti-MKLP 1	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)

goat polyclonal anti-mouse anti-Mucin-1 rabbit polyclonal anti-RACGAP1 rabbit polyclonal anti-human anti-Tissue Factor IgG	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D) Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D) American Diagnostica (Pfungstadt, D)
---	--

### 2.1.5 Puffer

Block-Puffer	1xTBS, 0,1 % Tween 20, 5 % BSA
CaCl <sub>2</sub> (Faktor Xa Bildung)	225 mg CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, in 50 ml bidest. H <sub>2</sub> O
Ca/Hepes (TEG)	10 mM Hepes, 100 mM CaCl <sub>2</sub> , in bidest. H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Ca/Mg (Flussskammer)	75 mM CaCl <sub>2</sub> , 37,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Citrat-Puffer	1,05 g Citronensäure-Monohydrat, in 500 ml bidest. H <sub>2</sub> O, pH 6
Hepes-Puffer	137 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM Glucose, 10 mM Hepes, in bidest. H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Lauf-Puffer (10x)	30,25 g Tris, 144 g Glycin, 50 ml 10 % SDS, in 1000 ml bidest. H <sub>2</sub> O
Lysis-Puffer	50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % Triton X, pH 8
Mowiol	2,5 g Mowiol, 6 g Glycerin, 6 ml bidest H <sub>2</sub> O, 0,2 M Tris-HCl (pH 8,5), 5 % DABCO
PBS	137 mM NaCl, 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , in bidest. H <sub>2</sub> O, pH 7,4
Permeabilisierungs-/Blocklösung	0,2 % Fish Skin Gelatine, 0,5 % BSA, 0,1 % Saponin
Resus-Puffer	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO <sub>3</sub> , 0,4 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O, 1 mM MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O, 5 mM D(+)-Glucose, 5 mM Hepes, pH 7,35
SDS-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 % SDS, 5 % β-Mercaptoethanol, 10 % Glycin, 0,1 % Bromphenolblau
Stripping-Puffer	15 g Glycin, 1 g SDS, 10 ml Tween-20, in 1000 ml bidest. H <sub>2</sub> O, pH 2,2

TBS 10 x	61 g Trizma Base, 90 g NaCl, in 1000 ml bidest. H <sub>2</sub> O
TBS-Tween	10 x TBS 1:10 mit bidest. H <sub>2</sub> O verdünnen, 0,05 % Tween-20
TNC	125 mM TNC, in bidest. H <sub>2</sub> O
Transfer-Puffer	38,6 mM Glycin, 47,9 mM Tris, 10 % Methanol, 0,37 % SDS
Tris/HCl 10x (0,5M)	0,5 M Tris, in 1000 ml bidest. H <sub>2</sub> O (pH 7,5)
ZnCl <sub>2</sub>	10 mM ZnCl <sub>2</sub> , in bidest. H <sub>2</sub> O

### 2.1.6 Zelllinien

<u>murine Zelllinie:</u> KCP	Dr. Hana Algül, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der TU München (München, D)
<u>humane Zelllinien:</u> FG, L3.6pl	Prof. Christiane Bruns, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Otto-von- Guericke Universität (Magdeburg, D)

## 2.2. Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Für alle Versuche wurden Pankreaskarzinom-Zelllinien aus einem orthotopen und einem transgenen Mausmodell verwendet. Die L3.6pl- und FG-Zelllinien des orthotopen Modells entstammen ursprünglich der aus einer Metastase eines axillaren Lymphknotens gewonnenen Zelllinie COLO 357 (Vezeridis *et al.* 1992, Bruns *et al.* 1999). Aus dieser wurden *in vitro* eine schnell wachsende *Fast Growing* (FG)-Zelllinie und eine langsam wachsende *Slow Growing* (SG)-Zelllinie geschaffen. Durch die Injektion der FG-Zellen in das Pankreas von Nacktmäusen und deren Isolierung aus den Lebermetastasen entstand die L3.3pl-Zelllinie (pl=pancreas-liver). Nach wiederholter Inokulation der Zellen ins Pankreas und ihrer Isolierung aus den Lebermetastasen wurde aus der kaum metastatischen FG-Zelllinie die hochmetastatische L3.6pl-Zelllinie generiert.

KCP-Zellen wurden in einem transgenen Modell des Pankreaskarzinoms entwickelt. Es wurden transgene Mäuse (Kreuzung von C57Bl6- und BALB/c-Mäusen) mit der Kras-Mutation G12D sowie mit einer Deletion des Tumorsuppressorgens p53 gezüchtet. In diesem transgenen Mausmodell entwickelten die Mäuse nach bereits ca. 4 Wochen spontan einen Primärtumor des Pankreas. Durch Isolierung von Zellen aus dem Pankreas dieser Mäuse wurde die KCP-Zelllinie generiert. Dazu wurde das Pankreas zerkleinert und in Nährmedium bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert, bis sich nach ein paar Tagen Pankreaskarzinomzellen abgesetzt hatten.

#### 2.2.1.2 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden in mit Nährmedium befüllten Zellkulturflaschen im Zellkulturschrank bei 37° C und 5 %-iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Jeden zweiten bis dritten Tag wurde das Medium gewechselt. Für die L3.6pl- und FG-Zelllinien wurden 500 ml von 1 g/l Glukose enthaltendem DMEM mit 50 ml FBS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 6 ml Vitamin-Mischung und 5 ml nicht-essenziellen Aminosäuren angemischt.

Die KCP-Zelllinie wurde mit 4,5 g/l Glukose enthaltendem DMEM unter Zusatz von 50 ml FBS, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 5 ml nicht-essenziellen Aminosäuren kultiviert.

Sobald sich ein konfluenter Zellrasen gebildet hatte, wurden die Zellen unter der Sterilbank mit 6 ml Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA) abgelöst, in sterilen 15 ml Falcon-Röhrchen bei 170 x g für 8 Min. zentrifugiert, mit PBS gewaschen und bei denselben Einstellungen erneut zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen 1:5 in Nährmedium verdünnt und in Zellkulturflaschen ausgesät. KCP-Zellen wurden bis zur 14. Passage gezüchtet,

danach wurden aus dem Zellvorrat (eingefrorene Zellstocks bei  $-80^{\circ}\text{C}$ ) Zellen mit einer niedrigeren Passagenzahl entnommen und im Brutschrank kultiviert.

### **2.2.1.3 Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen**

Zum Einfrieren wurden die aus den Zellkulturflaschen abgelösten Zellen (Kap. 2.2.1.2) erst 8 Min. bei  $170 \times g$  und  $24^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, mit PBS gewaschen und bei denselben Einstellungen erneut zentrifugiert. Schließlich wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium gelöst und in 1 ml-Reaktionsgefäßen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zum Revitalisieren wurden die eingefrorenen Zellen bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, zweimal für je 8 Min. bei  $170 \times g$  zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in Kulturflaschen im entsprechenden Nährmedium ausgesät.

### **2.2.1.4 Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Hierbei handelt es sich um eine 30 mm x 80 mm große und ca. 5 mm dicke Glasplatte mit einer vertieften Mittelfläche, auf welcher quadratische Felder mit einem Zählgitter eingraviert sind.

Zur Auszählung der Zellzahl wurden 10  $\mu\text{l}$  einer zu bestimmenden Zellsuspension, 90  $\mu\text{l}$  PBS und 100  $\mu\text{l}$  einer 0,05 % Trypanblau-Lösung gemischt und je 10  $\mu\text{l}$  dieses Gemisches bei aufgelegtem Deckglas beidseits auf die Kammer aufgetragen.

Die Zellzahl ließ sich errechnen, indem die Menge von lebenden Zellen in einer bestimmten Anzahl von Quadraten ausgezählt und der Mittelwert daraus ermittelt wurde. Schließlich wurde diese Zahl mit einem bestimmten Faktor, dem Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe, multipliziert. Der daraus resultierende Wert stellte die Zellzahl pro Volumeneinheit dar.

In den vorliegenden Versuchen wurden zwei Quadrate ausgezählt und folgende Formel verwendet:  $(\text{Zellzahl Quadrat 1} + \text{Zellzahl Quadrat 2}) \times 100$ . Das Ergebnis ergab die Zellzahl pro  $\mu\text{l}$ .

### **2.2.1.5 Zellaufschluss**

#### 2.2.1.5.1 Lyse der Zellen durch Einfrieren und Auftauen

Die in max. 200  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer gelösten Zellen bzw. MP wurden für 1 Min. Flüssigstickstoff ausgesetzt und gleich darauf im Wasserbad für 1 Min. bei  $37^{\circ}\text{C}$  wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

#### 2.2.1.5.2 Lyse der Zellen durch Ultraschall

Zellen bzw. MP wurden in 1-2 ml Lysis-Puffer gelöst, auf Eis gelagert und mittels eines Sonifiers dreimal für je 10 Zyklen lysiert.

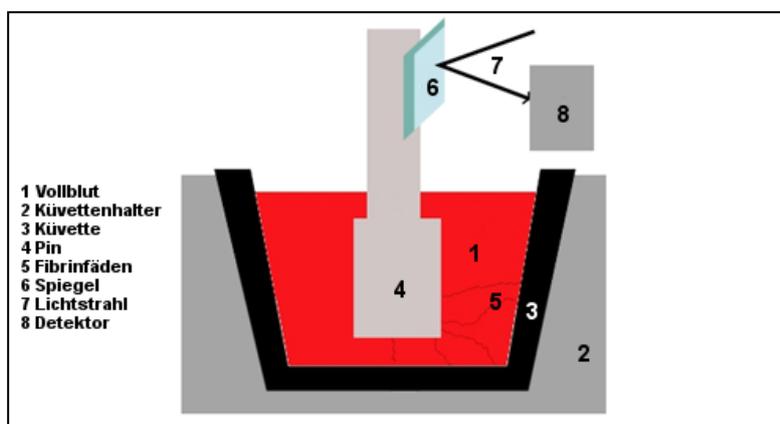
## 2.2.2 Versuche mit Vollblut

### 2.2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei gesunden Blutspendern, welche zuvor keine gerinnungsbeeinflussenden Medikamente eingenommen hatten. Die Abnahme-Spritzen wurden mit einer 12,5 mM Trinatriumcitrat-Lösung und 5 µg/ml Corn Trypsin Inhibitor (CTI) versetzt, um der Koagulation des Blutes in der Spritze vorzubeugen.

Das venöse Vollblut wurde nach vorausgehender Hautdesinfektion im Bereich der Armbeuge in 2 ml bis 20 ml Spritzen (je nach Versuch) mit einem Butterfly-Katheter entnommen.

### 2.2.2.2 Thrombelastographie (TEG)



**Abb. 4 : Vereinfachte Darstellung eines Thrombelastographen (modifiziert nach Lang *et al.* 2006)**

Vollblut (1) wurde in eine im Kuvettenhalter (2) befestigte Kuvette (3) gefüllt. Ein rotierender Pin (4) tauchte in die Probe ein. Nach der Bildung von Fibrin (5) wurde dessen Bewegung gehemmt und die Änderung der Kinetik durch ein optisches Detektionssystem (6-8) erfasst.

Die Thrombelastographie (TEG, Abb. 4) gibt Auskunft über die Gerinnungseigenschaften von Vollblut und stellt den Verlauf der Blutgerinnung von der Fibrinbildung bis zur Fibrinolyse dar. Die klassische TEG nach Hartert (1948) wurde u.a. durch die hier verwendete Rotation-Elastographie (ROTEM®) weiterentwickelt.

In eine Kuvette (Cup) wurden zunächst 270 µl von citriertem Vollblut eines gesunden Blutspenders pipettiert. Daraufhin wurden 30 µl Probenlösung hinzugegeben. Als Kontrolle wurde bei jedem Versuch eine Kuvette mit 30 µl Puffer anstelle der Probenlösung mit gemessen. Danach wurde durch Zugabe von Ca-Ionen in einer Ca/Hepes-Lösung (60 µl) die Blutgerinnung gestartet und die Messung begonnen. Ein sich drehender Stempel (Pin) tauchte in die Probe ein. Sobald die Gerinnung eingesetzt hatte und sich Fibrin gebildet hatte, wurde die Bewegung des Pins behindert. Der Computer erfasste die Änderung der Kinetik durch ein optisches Detektionssystem und berechnete diese. Von besonderem Interesse für die vorliegenden Versuche war die Clotting Time (CT), d.h. die Zeit (in Sek.) vom Beginn der Gerinnungsreaktion bis zum Beginn der Fibrinbildung.

Ferner wurde mit dem Thrombelastographen auch die Clot Formation Time (CFT) bestimmt, welche die Zeit vom Start der Gerinnselfbildung bis zu einer Gerinnselffestigkeit von 20 mm widerspiegelte. Die Maximal Clot Firmness (MCF) stellte die maximale Gerinnselffestigkeit in

mm dar. Längere Messungen ließen auch Aussagen über die Fibrinolyse zu, durch Parameter wie z.B. den LI 30 (Lysis Index after 30 minutes) und ML (Maximal Lysis).

### **2.2.3 Mikrovesikel- Isolierung**

#### **2.2.3.1 Isolierung von zirkulierenden MP aus humanem Vollblut**

Nach der Blutentnahme wurde das Vollblut bei 190 x g 15 Min. lang zentrifugiert. Das MP-haltige, zellfreie Plasma wurde abgesaugt, in neue Röhrchen übergeführt und zweimal bei 1.000 x g für je 20 Min. zentrifugiert. Nachdem erneut zellfreies Plasma entnommen wurde, erfolgte dessen Aliquotierung in 1 ml-Röhrchen und die zweimalige Zentrifugation für je 30 Min. bei 17.740 x g. Alle Zentrifugationsschritte wurden ohne Bremse durchgeführt. Schließlich wurden die MP-Pellets in 1 ml PBS gelöst und in einem Reaktionsgefäß vereint.

#### **2.2.3.2 Isolierung von MP aus Pankreaskarzinom-Zellen**

Für die Isolierung von MP aus den Pankreaskarzinomzelllinien wurde zunächst der Überstand aus den Zellkulturflaschen entnommen, da diese Zellen konstitutiv MP ins Nährmedium absondern. Der Überstand wurde zweimalig bei 1.430 x g für jeweils 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert um Zellfragmente zu entfernen. Das dabei entstandene Pellet wurde verworfen. Schließlich erfolgte die Aliquotierung der zellfreien Lösung in 1 ml-Versuchsröhrchen und deren Zentrifugation bei 17.740 x g für 30 Min ohne Bremse. Zuletzt wurden die MP-haltigen Pellets in 1 ml PBS gelöst und vereinigt.

#### **2.2.3.3 Exosomen-Isolierung aus karzinomatösen Zelllinien**

Die (wie in Kap. 2.2.3.2 beschrieben) gewonnene zellfreie Lösung wurde in der Ultrazentrifuge für 2 h bei 4° C und 100.000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen und es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte bei denselben Einstellungen in der Ultrazentrifuge. Anschließend wurden die Pellets aus den einzelnen Reaktionsgefäßen in 1 ml PBS vereinigt.

### **2.2.4 Faktor Xa Bildung**

Der photometrische Faktor Xa Assay gibt Aufschluss darüber, ob eine Probenlösung prokoagulatorisch wirkt und Faktor X zu Faktor Xa aktiviert wird.

In einer 96-Well-Platte wurden in jedes zu untersuchende Well 50 µl einer 30 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung vorgelegt, 50 µl der in Resus-Puffer gelösten Probe wurden hinzugefügt und schließlich 100 µl Substratpuffer, welches aus Beriplex (enthält die Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X), Resus-Puffer und dem chromogenen Substrat S-2222 bestand, beigemischt.

Aufgrund der Spaltung von S-2222 durch den Faktor Xa kam es zu einem Farbumschlag. Durch die Absorptionsmessung der Probe bei 405 nm Wellenlänge in 6 Zyklen à 6 Min. mit

dem ELISA-Reader konnte anhand einer Standardkurve (hierzu wurde rekombinanter humaner TF verwendet) die Faktor Xa Aktivität der Probenlösung bestimmt werden.

### 2.2.5 Faktor Xlla Bildung

Anhand des chromogenen Faktor Xlla Assays wird die Bildung von Faktor Xlla durch eine Probe und somit die Aktivierung des intrinsischen Blutgerinnungsweges dargestellt.

85 µl der in Hepes-Puffer gelösten Probe wurden mit 85 µl eines Mastermixes, bestehend aus 100 nM FXII und 100 µM ZnCl<sub>2</sub> (1:1), 20 Min. bei RT inkubiert. In einer 96-Well Platte wurden pro Well je 10 µl des chromogenen Substrates S-2302 vorgelegt und daraufhin pro Well je 50 µl Probenlösung hinzugefügt. Wurde S-2302 durch den Faktor Xlla gespalten, resultierte dies in einen Farbumschlag. Schließlich wurde mit dem ELISA-Reader die Absorption der Probe 120 Min. lang bei 405 nm gemessen.

### 2.2.6 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels eines RC DC™ (*reducing agent and detergent compatible*) Protein Assay Kits der Firma Bio Rad. In einer 96-Well-Platte wurden jeweils 25 µl der Kupfer-Alkali-Tartrat-Lösung A zu je 5 µl Probenlösung hinzugegeben. Die Kupferionen bildeten mit den Proteinen der Probe einen Komplex, welcher nach Zugabe von je 200 µl der Folin-Lösung B reduziert wurde. Diese Reaktion führte zu einem Farbumschlag, welcher bei 700 nm gemessen wurde. Die Messung erfolgte nach 5-minütiger Inkubation der 96-Well-Platte bei 37° C in einem ELISA Reader. Der Proteingehalt der Probe wurde anhand einer Eichkurve mit einem BSA-Standard bestimmt.

### 2.2.7 Flusskammer-Versuche

#### 2.2.7.1 Methode

Die thrombogenen Eigenschaften der Mikropartikel wurden mit Hilfe einer sog. Flusskammer untersucht. Hierbei handelt es sich um ein *ex vivo* Modell, in welchem eine quadratische Glaskammer am Objektisch eines Mikroskops befestigt wird, durch die anschließend Probenlösungen geleitet werden. Mit der Flusskammer werden Flussbedingungen im Blutgefäß *in vivo* simuliert.

In den vorliegenden Versuchen wurden mit Hilfe von Perfusorpumpen thrombozytenreiches Plasma (PRP) zusammen mit einer L3.6pI-MP-Lösung durch die Flusskammer geleitet.

Durch die Einstellung von Flussgeschwindigkeiten, welche die Kammergeometrie berücksichtigten, konnte schließlich die gewünschte Scherrate im Blut erzielt werden.

Da die Flusskammer an das konfokale Laserscanmikroskop mit Durchlicht und Fluoreszenzlicht angeschlossen war, konnte die Interaktion der MP mit den Blutzellen sowie

die Thrombusentstehung unmittelbar verfolgt und mittels einer integrierten Kamera dokumentiert werden.

### **2.2.7.2 Protokoll**

Nachdem L3.6pl-MP mit DCF gelabelt worden waren (Kap. 2.2.14), wurde mit PBS eine MP-Lösung mit der Endkonzentration von 140 µg/ml hergestellt. Hierauf wurde einem gesunden Blutspender Blut entnommen und nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 24° C und 190 x g das PRP gewonnen. Die Markierung des Fibrinogens erfolgte mit einem Alexa 594-gelabelten anti-Fibrin/Fibrinogen-AK.

Die Beschichtung der entsprechenden Deckgläschen für die Flusskammer erfolgte mit 100 µg/ml Kollagen, an welches während des Experimentes Thrombozyten adhärieren konnten. Die Deckgläschen wurden sodann für 2 h in eine dunkle Inkubationskammer gestellt, mit PBS gewaschen und schließlich mit 1 % BSA, gelöst in Hepes-Puffer, für 30 Min. inkubiert.

Die Flusskammer wurde zunächst am Objektisch des konfokalen Laserscanmikroskops befestigt und durch zwei Schläuche mit zwei Perfusorpumpen (eine Pumpe für eine 20 ml Spritze mit PRP+MP-Lösung, eine Pumpe für eine 20 ml Spritze mit Ca/Mg-Lösung) verbunden. Der Inhalt beider Spritzen wurde gleichzeitig durch die Kammer geleitet und anschließend in einem leeren Reaktionsgefäß aufgefangen. Das Verhalten der MP im Blut wurde mikroskopisch über einen Zeitraum von 1 h beobachtet. Insbesondere wurde untersucht, ob MP-haltige Thromben gebildet wurden. Im 5-minütigen Abstand wurden Fotos zur Dokumentation angefertigt.

### **2.2.8 Transfektion von Tumorzellen mit siRNA und shRNA**

In einer 24-Well-Platte wurden pro Well 50.000 Zellen in je 1 ml Nährmedium ausgesät. Nachdem die Zellen über Nacht adhärirt waren und sich ein Zellrasen mit 60 % - 80 % Konfluenz gebildet hatte, wurden die Zellen mit Opti-MEM gewaschen und folgendermaßen mit siRNA bzw. mit shRNA transfiziert: In jedes Well wurde ein Gemisch aus einer Lösung A (bestehend aus je 100 nM siRNA bzw. 2 µg shRNA und 100 µl Opti-MEM) und einer Lösung B (bestehend aus 2-3 µl Lipofectamine und 100 µl Opti-MEM) pipettiert, welche zuvor 30-45 Min. miteinander inkubiert worden waren. Nach 4-6 h wurden 800 µl des Nährmediums in jedes Well hinzugefügt. Am folgenden Tag wurde das gesamte Medium gewechselt. 24-48 h später wurden die transfizierten Zellen mit Trypsin/EDTA (pro Well 200 µl einfaches Trypsin/EDTA) abgelöst, in PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt (Kap. 2.2.1.4). Die gewonnenen Zellen wurden in einem Western Blot und in *in vitro* Versuchen eingesetzt.

### **2.2.9. Generierung von stabil transfizierten Zelllinien**

Nach Zelltransfektion mit shRNA (Kap. 2.2.8) wurden in einer 24-Well Platte pro Well 50.000 transfizierte Zellen mit Puromycin versetzt. Zur Ermittlung der richtigen Puromycin-

Konzentration wurden diverse Konzentrationen (0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml) getestet. Nach dieser Behandlung lösten sich die nicht-transfizierten Zellen ab. Die transfizierten Zellen jedoch, welche eine Puromycin-Resistenz aufwiesen, konnten überleben und proliferieren. Nach Ermittlung der geeigneten Konzentration, bei welcher die transfizierten Zellen gerade noch überlebten, wurden diese Zellen mit 200 µl Trypsin/EDTA abgelöst und in einer Zellkulturflasche mit dem entsprechenden Nährmedium, welches die Hälfte der zuvor ermittelten optimalen Puromycin-Konzentration enthielt, ausgesät.

### **2.2.10 Western Blot**

Mittels Western Blot wurden L3.6pl-Zellen und -MP sowie KCP-Zellen und -MP auf die Expression der Proteine Mucin-1, KIF23 und RacGAP1 untersucht.

Für diese Western Blots wurde ein 8 %-iges Gel hergestellt. Dafür wurde zunächst ein Trenngel (Separating Gel), bestehend aus dest. H<sub>2</sub>O, 1,5 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)-Lösung (pH 8,8), 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung, 10 % Ammoniumpersulfat, 30 % Acrylamid-Mix und Tetramethylethylendiamin (TEMED), angefertigt und in eine Gelkammer zwischen zwei Glasplatten gegossen. 200 µl bis 300 µl Butanol wurden auf das Gel pipettiert, um gebildete Luftblasen zu entfernen. Nach dem Festwerden des Gels nach ca. 30 Min. wurde das Sammelgel (Stacking Gel), bestehend aus H<sub>2</sub>O, 30 % Acrylamid Mix, 1,0 M Tris-Lösung (pH 6,8), 10 % SDS-Lösung, 10 % Ammoniumpersulfat und TEMED, vorbereitet. Dieses wurde, nachdem das Butanol entfernt worden war, in flüssigem Zustand auf das feste Trenngel pipettiert und ein Kamm in das Gel gesteckt, um Taschen im Gel zu erzeugen. Nach dem Festwerden des Sammelgels wurde das gesamte Gel in eine mit Lauf-Puffer gefüllte Transferkammer gestellt, der Kamm vorsichtig aus dem Gel entfernt und die dadurch entstandenen Taschen mit Hilfe einer dünnen Pipette von überflüssigem Gel und Luftblasen befreit. Danach konnten die einzelnen Wells mit den lysierten Zellen und MP (40 µl Probenlösung, Proteinkonzentration 200 µg) sowie mit der DNA-Leiter (4-8 µl) beladen werden. Die Proben wurden zuvor folgendermaßen vorbereitet: Ein SDS-Ladepuffer (4x) wurde hinzugefügt und die Proben danach 5 Min. bei 95° C unter kontinuierlichem Schütteln erhitzt. Im Anschluss wurde die mit dem beladenen Gel befüllte Transferkammer erst bei 80 mA und, sobald die Proben im Trenngel angelangt waren, für ca. 1 h bei 120 mA an Strom angeschlossen.

Nachdem die Proben den Boden des Gels erreicht hatten, wurde das Gel entnommen und in der Reihenfolge Blotpapier-Gel-Nitrocellulosemembran-Blotpapier zu einem Sandwich angeordnet. Dieses wurde in Transfer-Puffer in eine Transferkammer gelegt und der Geltransfer auf die Nitrocellulosemembran in der Kühlkammer bei einer Stromstärke von 280 mA und 100 V für 1 h und 20 Min. durchgeführt. Schließlich wurde die Membran entnommen, in ein mit 10 ml Block-Puffer befülltes 50 ml-Reaktionsgefäß gelegt und für 1 h auf eine

Drehscheibe gesetzt, um unspezifische Bindungsstellen der Proteine zu blockieren. Danach wurde der Puffer verworfen, der primäre AK in einer Konzentration von 0,4 µg/ml (in Block-Puffer gelöst) auf die Membran aufgetragen und für 1,5 h (wahlweise auch über Nacht) auf der Drehscheibe rotiert. Danach wurde die Membran in 3 Waschschrritten à 10 Min. mit TBS/Tween-Puffer gewaschen und schließlich der sekundäre AK (1:500 in Block-Puffer verdünnt, insg. ca. 10 ml) für 30 Min. bis 1 h auf die Membran appliziert. Hierauf erfolgten erneut 3 10-minütige Waschschrritte mit TBS/Tween-Puffer.

Abschließend wurde die mit einem Gemisch aus 5 ml Luminol-Lösung, 50 µl Cumarsäure und 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> befeuchtete Membran in einer durchsichtigen Folie in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Film in die Kassette direkt über der Membran eingesetzt, mit der Membran inkubiert und am Entwicklungsgerät entwickelt.

Um die Membran später für weitere Western Blots mit anderen AK verwenden zu können, war es nötig die Membran von den bereits applizierten AK zu befreien. Dazu wurde die Membran in einem 50 ml-Reaktionsgefäß erst für 5 Min. in TBS/Tween-Puffer gewaschen, für 10 Min. mit 10 ml Stripping-Puffer bei RT inkubiert, danach wurde der Stripping-Puffer verworfen und frischer Stripping-Puffer für 10 Min. aufgetragen. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 10 Min. mit PBS gewaschen, gefolgt von zwei fünfminütigen Waschschrritten mit TBS/Tween-Puffer. Die Membran war sodann bereit für erneutes Blocken und für eine weitere AK-Applikation.

## **2.2.11 Proteomanalyse**

### **2.2.11.1 Probenvorbereitung**

Die Zellen (mind. 50 µg Probenmaterial) wurden (wie in Kap. 2.2.1.2 beschrieben) aus den Kulturflaschen entnommen und insgesamt fünfmal für je 8 Min. bei 170 x g und 4° C zentrifugiert. Zwischen den einzelnen Zentrifugationsschrritten wurden die Zellen jeweils mit 1-2 ml vorgekühltem (4° C) PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Zellpellet noch einmal zentrifugiert um ein trockenes Pellet zu erhalten. Schließlich wurde das Zellpellet in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff oder im Gefrierschrank bei -80° C eingefroren.

Die Vorbereitung der MP erfolgte analog dieses Protokolls, wobei die MP jeweils für 30 Min. bei 17.740 x g zentrifugiert wurden.

### **2.2.11.2 Methode**

Die Proteomanalyse wurde am Genzentrum der LMU München unter der Leitung von Herrn Dr. rer. nat. Georg Arnold durchgeführt. Dazu wurde ein auf Elektrospray-Ionisation-Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie (ESI-LC-MS/MS) basierendes Verfahren angewandt.

Die Proben wurden mittels 8 M Harnstoff, Ultraschall und QUIAshredder aufgeschlossen. Anschließend wurde die Proteinbestimmung durchgeführt. Die Einsicht in die Ergebnisse der Proteomanalyse erfolgte anhand des speziellen Computerprogramms „Scaffold Viewer“ der Firma Proteome Software, Inc.

## 2.2.12 *In vivo* Versuche

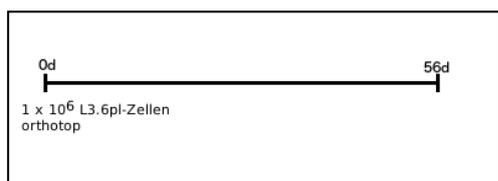
### 2.2.12.1 Fibrinbildung und Metastasierung im orthotopen und transgenen Mausmodell

#### a) Orthotopes Modell

Um die Rolle der Karzinomzellen und ihrer MP für die Fibrinbildung und Metastasierung im orthotopen Mausmodell *in vivo* zu analysieren, wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Christiane Bruns (Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg) eine Serie von Mausversuchen durchgeführt. Für diese Tierversuche sowie für alle anderen in dieser Arbeit erwähnten Tierversuche lag eine Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern vor. Für alle Versuche des orthotopen Modells wurden 10-12 Wochen alte männliche BALB/c Nacktmäuse verwendet. Bei Nacktmäusen kommt es aufgrund des Fehlens des Thymus sowie aufgrund einer verringerten Anzahl an T-Lymphozyten zur Immunsuppression. Somit erfordert die Haltung von Nacktmäusen spezielle Haltungsbedingungen wie Laminarflow-Käfige, staubfreie Einstreu sowie spezielles Futter.

Die Mäuse wurden für die Versuche mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht)/Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) i.p. narkotisiert. In einem ersten Experiment wurden Nacktmäusen in Narkose (s.o.)  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen, in 40  $\mu$ l PBS gelöst, orthotop in das Pankreas injiziert (Abb. 5 A).

**A**

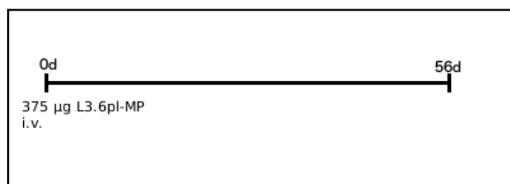


**Abb. 5 A: Versuchsschema im orthotopen Mausmodell**

Orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen in das Pankreas

Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe mit der intravenösen Injektion von L3.6pl-MP (gelöst in 40  $\mu$ l PBS) durchgeführt. Dabei wurden den Mäusen einmalig MP in einer Konzentration von 375  $\mu$ g (entspricht  $1,5 \times 10^6$  MP) (Abb. 5 B) injiziert.

**B**

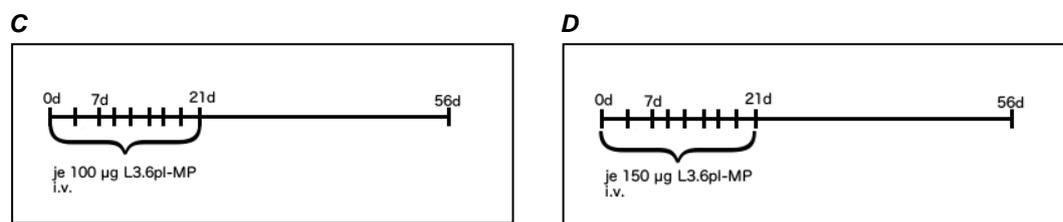


**Abb. 5 B: Versuchsschema im orthotopen Mausmodell**

I.v. Injektion von  $1 \times 375 \mu$ g L3.6pl-MP in die Schwanzvene

Im Anschluss wurden Versuche mit der Injektion von einer höheren Konzentration an MP gestartet. Hierzu wurden den Nacktmäusen über einen Zeitraum von 3 Wochen dreimal pro

Woche je 100 µg (Abb. 5 C) und einer zweiten Gruppe von Nacktmäusen über einen Zeitraum von 3 Wochen dreimal pro Woche je 150 µg L3.6pl-MP (Abb. 5 D) in die Schwanzvene gespritzt.

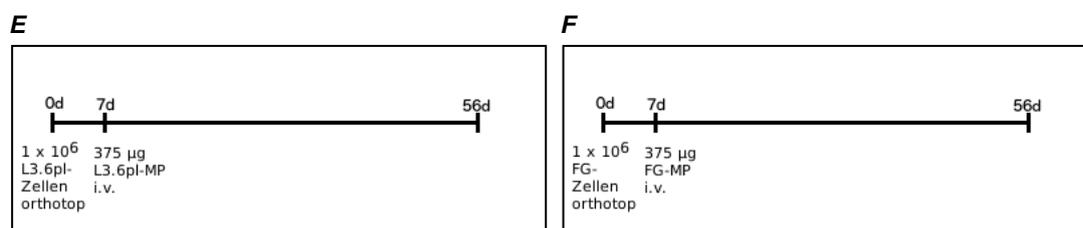


**Abb. 5 C, D: Versuchsschemata im orthotopen Mausmodell**

**C:** I.v. Injektion von 9 x 100 µg L3.6pl-MP in die Schwanzvene

**D:** I.v. Injektion von 9 x 150 µg L3.6pl-MP in die Schwanzvene

In weiteren Experimenten wurde in einer Gruppe von Mäusen durch die orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen sowie in einer zweiten Gruppe durch die orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  FG-Zellen die Bildung eines Primärtumors des Pankreas induziert. 7 Tage nach der Injektion der Zellen wurden den Mäusen der ersten Gruppe intravenös 375 µg (entspricht  $1,5 \times 10^6$  MP) L3.6pl-MP (Abb. 5 E) verabreicht und den Mäusen der zweiten Gruppe analog 375 µg FG-MP (Abb. 5 F). In einem Pilotexperiment wurden die MP in die Portalvene injiziert, in allen weiteren Versuchen jedoch in die Schwanzvene, da die Tiere unmittelbar nach der Portalveneninjektion an Lungenembolien verstarben.



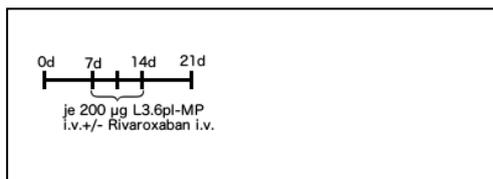
**Abb. 5 E, F: Versuchsschemata im orthotopen Mausmodell**

**E:** Orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen+i.v. Injektion von  $1 \times 375$  µg L3.6pl-MP

**F:** Orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  FG-Zellen+i.v. Injektion von  $1 \times 375$  µg FG-MP

Die Versuchsdauer betrug in allen Experimenten 56 Tage, falls aus Tierschutzgründen kein vorzeitiger Versuchsabbruch erforderlich war.

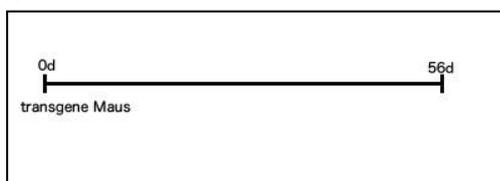
Um die Rolle der Gerinnungsaktivierung im Metastasierungsprozess zu evaluieren wurde ein abschließender Versuch mit dem direkten Faktor Xa-Inhibitor Rivaroxaban durchgeführt. In diesem Experiment wurden zwei Gruppen von Mäusen  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen orthotop ins Pankreas und 1 Woche später dreimal pro Woche je 200 µg L3.6pl-MP in die Schwanzvene gespritzt (Abb. 5 G). Einer dieser Gruppen wurde zusätzlich jeweils 4 h vor MP-Gabe 3 mg/kg Rivaroxaban in die Schwanzvene verabreicht (Abb. 5 G). Die Tiere beider Gruppen wurden aus Tierschutzgründen eine Woche nach der letzten MP-Injektion euthanasiert.

**G****Abb. 5 G: Versuchsschema im orthotopen Mausmodell**

Orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen+i.v. Injektion von  $3 \times 200 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP +/- Injektion von  $3 \text{ mg/kg}$  Rivaroxaban je 4 h vor MP-Gabe

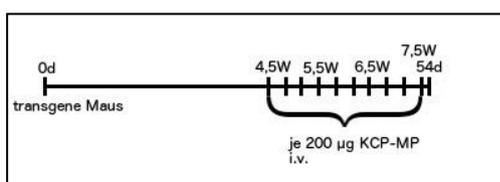
**b) Transgenes Modell**

Im Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Hana Algül (TU München) wurden unter Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern transgene Mäuse mit der Kras-Mutation G12D sowie der Deletion des Tumorsuppressorgens p53 gezüchtet, welche in ihrer 4. Lebenswoche einen Primärtumor des Pankreas entwickelten. In der Regel verendeten diese Mäuse in ihrer 8. Lebenswoche aufgrund ihres schlechten Allgemeinbefindens (Abb. 5 H).

**H****Abb. 5 H: Versuchsschema im transgenen Mausmodell**

Transgene Maus

In einer weiteren Versuchsreihe wurden den transgenen Mäusen in der 4. Lebenswoche dreimal je  $200 \mu\text{g}$  KCP-MP in die Schwanzvene gespritzt. Dieses Vorgehen wurde 2 Wochen lang bis zur 7. Lebenswoche wiederholt (Abb. 5 I). Zwei Tage nach der letzten MP-Injektion wurden die Mäuse euthanasiert, die Organe entnommen und analysiert.

**I****Abb. 5 I: Versuchsschema im transgenen Mausmodell**

Transgene Maus + i.v. Injektion von  $9 \times 200 \mu\text{g}$  KCP-MP

Die Euthanasie aller Tiere erfolgte durch die i.p. Applikation von Betäubungsmittel und Genickbruch oder durch Inhalationsnarkose und anschließendem Genickbruch. Schließlich wurden die Organe entnommen und asserviert.

**2.2.12.2 DVT-Mausmodell**

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Steffen Massberg (LMU München) wurde die Bildung der DVT nach intravenöser Verabreichung von L3.6pl- und FG-MP sowie von KCP-MP und MP aus Vollblut (=Blut-MP) in einem DVT-Modell untersucht (von Brühl *et al.* 2012).

Für diese Versuche wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse des Wildtyp (WT)-Stamms C57Bl/6J verwendet, welche ein Körpergewicht (KG) von über 21 g erreicht hatten (i.d.R. in der 13. bis 20. Lebenswoche). Die Tiere wurden mittels einer Inhalationsnarkose,

bestehend aus einem 3 %-igem Sauerstoff-Isofluran-Gemisch, Medetomidin (0,5 mg/kg KG), Fentanyl (0,05 mg/kg KG) und Midazolam (5,0 mg/kg KG) i.p. narkotisiert. In einem zweiten Schritt wurde die Vena cava caudalis der Mäuse ligiert und somit eine Restriktion des Blutflusses geschaffen. Schließlich wurde die Narkose wieder vollständig mittels Naloxon (1,2 mg/kg KG), Atipamezol (2,5 mg/kg KG) und Flumazenil (0,5 mg/kg KG) antagonisiert. Die MP wurden danach in 2 Portionen (jede Portion enthielt 150 µg MP-Protein), gelöst in 250 µl NaCl, jeweils 6 h und 18 h post Ligatur der Vena cava caudalis in die Schwanzvene injiziert. Nach insgesamt 48 h Versuchsdauer wurden die Mäuse erneut narkotisiert (s.o.), durch Inzision der Vena cava kranial der Ligatur entblutet und die Vena cava caudalis entnommen. Die in der Vene befindlichen Thromben wurden gewonnen und gewogen.

Um Aufschluss über die genaueren Mechanismen der Thrombusentstehung zu erlangen, wurden die Versuche mit Injektion von L3.6pl-MP unter Zugabe von folgenden AK durchgeführt:

- Thrombozyten Depletions-AK (2 mg/kg KG)
- Neutrophilen Depletions-AK (50 µg AK 12 h vor Ligatur, 25 µg AK 24 h nach Ligatur)
- H-D-Pro-Phe-Arg-Chloromethylketon (PCK, 10 mg/kg, unmittelbar vor Ligatur und im 24 h-Abstand nach Ligatur)
- anti-TF-AK (MP wurden vor Injektion mit 45 µg/ml AK vorinkubiert)

Die entsprechenden Kontroll-AK wurden analog appliziert.

Anstelle von C57Bl/6J Mäusen wurden in einer weiteren Versuchsgruppe P-Selectin-defiziente Mäuse verwendet und der Effekt der MP-Injektion auf die Thrombusentstehung bei diesen Tieren untersucht.

## 2.2.13 Histologie

### 2.2.13.1 Vorbereitung und Anfertigung von Kryo- und Paraffinpräparaten

Für die Anfertigung von Kryopräparaten wurden die entnommenen Organe in Flüssigstickstoff schockgefroren und schließlich im Stickstofftank in Einbettmedium (Tissue Tek) gelagert. Für die Präparation der Kryoschnitte wurde das Kryotom auf -25° C vorgekühlt und das gefrorene Organ mittels Tissue Tek auf einem Stempel befestigt. Daraufhin konnten Schnitte von 5 µm - 10 µm Dicke angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgetragen werden. Diese wurden schließlich bei -20° C aufbewahrt.

Die Organe für die Paraffineinbettung wurden zunächst in Plastikeinbettkassetten für 24 h in einer 4 %-igen Formaldehyd-Lösung gelagert. Hierauf wurden sie 20 Min. lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend in einen Behälter mit 70 %-igem Ethanol befördert. Danach wurden die Organe in einen Einbettautomaten übergeführt, welcher sie dehydrierte und in Paraffin tränkte. Nach der Entnahme aus der Maschine wurden die Organe manuell an einer Ausgießstation in Paraffin eingebettet.

Die Paraffinschnitte wurden mittels eines Mikrotoms angefertigt. Die Organe wurden auf dem Gerät befestigt und 4 µm dicke Organschnitte erstellt. Um Faltenbildung auf den Schnitten zu verhindern, wurden diese daraufhin in ein auf 65° C vorgeheiztes Wasserbad transferiert und von dort aus auf beschichtete Objektträger übertragen. Schließlich wurden die Objektträger bei 37° C im Trockenschrank über Nacht getrocknet und danach bei RT gelagert.

### **2.2.13.2 Carstair's Färbung**

Die Carstair's Färbung ist eine modifizierte HE-Färbung und dient zur Darstellung von Fibrin, Thrombozyten, Kollagen und Erythrozyten. Fibrin erscheint rosa bis rot, Kollagen blau, Thrombozyten färben sich grau an und Erythrozyten gelb bis rot. In der vorliegenden Arbeit wurde die Carstair's Färbung an Schnitten von Mausebern eingesetzt.

Die Gefrierschnitte wurden in einer Färbeschale zuerst mittels Methanol/Eisessig (3:1) für 90 Sek. fixiert. Paraffinschnitte wurden in Roticlear (Xylolersatz) entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 3 Min. in 100 %, 95 %, 80 %, 70 % Ethanol) dehydriert. Daraufhin wurden sowohl Kryo- als auch Paraffinschnitte für 3 Min. in eine mit PBS gefüllte Färbeschale gestellt. Anschließend wurden die Schnitte mit 5 %-igem Eisenammoniumsulfat für 5 Min. gefärbt und danach für 3 Min. unter fließendem dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Auch alle folgenden Waschschrte wurden unter fließendem dest. H<sub>2</sub>O durchgeführt. Daraufhin erfolgte eine Färbung mit Hämalaun nach Mayer für 5 Min. und ein 10-minütiger Waschschrte. Nach dem 45-minütigen Einwirken der Picrinsäure Orange G-Lösung wurde einmal gewaschen, für 3 Min. mit der Ponceau Fuchsin-Lösung gefärbt und erneut für 3 Min. gewaschen. Schließlich wurden die Schnitte für 3 Min. in Phosphorwolframsäure-Lösung (1 %-ig) gestellt, gewaschen und für 30 Sek. mit Anilinblau-Lösung gefärbt. Nachdem die Schnitte ein letztes Mal gründlich gewaschen worden waren, wurden sie im Falle von Paraffinschnitten in einer aufsteigenden Ethanolreihe (je 3 Min. in 70 %, 80 %, 95 %, 100 % Ethanol) dehydriert und mit Roticlear behandelt. Schließlich wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit Glycerol eingedeckt.

Für die Berechnung der Okklusion von Lebergefäßen durch Fibrin wurden pro Tier mit der am Lichtmikroskop angeschlossenen Kamera Fotos von 10 konsekutiven Gesichtsfeldern gemacht. Die Anzahl der sichtbaren Blutgefäße pro Gesichtsfeld wurde gezählt und deren Durchmesser mittels der AxioVision Rel. 4.8 Software ausgemessen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Einteilung der Gefäße gemäß ihres Gesamtdurchmessers in 3 Kategorien: Sinusoide (<25 µm Gefäßdurchmesser), mittelgroße Gefäße (25 µm - 100 µm Gefäßdurchmesser) und große Gefäße (>100 µm Gefäßdurchmesser).

Schließlich wurde am Computer die Fibrinfläche in den Blutgefäßen manuell umfahren und mittels der verwendeten Software in µm<sup>2</sup> berechnet. Nach der Ausmessung der Gesamtfläche des jeweiligen Gefäßes konnte das Ausmaß der Gefäßokklusion durch Fibrin

in Prozent der Gesamtfläche des Blutgefäßes angegeben werden. Je nach Umfang der Gefäßokklusion durch Fibrin wurden 3 Gruppen gebildet: <10 % Okklusion (keine Okklusion), 10 % - 70 % Okklusion (partielle Okklusion) und >70 % Okklusion (vollständige Okklusion, Thrombose).

### **2.2.13.3 Immunhistochemische Färbungen**

Mittels Immunhistochemie lassen sich Proteine in Schnitten von Organpräparaten sichtbar machen. Das Prinzip der Immunhistochemie beruht darauf, dass ein Primär-AK spezifisch an das Epitop eines gesuchten Proteins bindet und mittels eines Detektionssystems dargestellt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde in der Regel die indirekte Methode der Immunhistochemie verwendet. Hier bindet zunächst ein Primär-AK an das gesuchte Antigen. Danach wird ein mit einem Enzym gekoppelter Sekundär-AK (dieser richtet sich gegen die Spezies, in welcher der Primär-AK hergestellt wurde) eingesetzt, welcher mittels des Enzyms mit einem Substrat/Chromogen-Gemisch reagiert und schließlich die Färbung herbeiführt. Die gefärbten Schnitte lassen sich anschließend im Lichtmikroskop betrachten.

#### 2.2.13.3.1 Ki67-Färbung

Das Ki67-Protein ist ein mit Zellteilung assoziiertes, im Nukleus befindliches Protein. Für die Darstellung von proliferierenden Zellen wurden deshalb in einem immunhistochemischen Verfahren Ki67-positive Zellkerne in Schnitten von Mauslebern angefärbt. Für diejenigen Mäuse, welche mit humanen L3.6pl- und FG- Zellen bzw. -MP behandelt worden waren, wurde ein spezifischer anti-humaner anti-Ki67-AK, welcher nicht mit Mausstrukturen kreuzreagierte, verwendet. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei den dargestellten Ki67-positiven, proliferierenden, Zellen um Tumorzellen handelte und nicht um proliferierende Zellen der Maus.

Die Objektträger mit Paraffinschnitten wurden zunächst für 10 Min. bei 60° C inkubiert, in einer Färbeschale zweimal für je 5 Min. mit Roticlear (Xylolersatz) entparaffiniert, in einer absteigenden Ethanolreihe (zweimal je 3 Min. 100 % Ethanol, je 3 Min. 95 %, 80 % und 70 % Ethanol) dehydriert und zweimal für je 5 Min. in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Antigendemaskierung (das Lösen der durch die Formalinfixierung verursachten Proteinvernetzungen, damit das Antigen an der Oberfläche präsentiert wird und vom AK gebunden wird) der Schnitte erfolgte in der Mikrowelle in Citrat-Puffer für 20 Min., danach kühlten die Objektträger für 20 Min. in Citrat-Puffer bei RT aus.

Im Falle von Gefrierschnitten entfielen diese ersten Schritte und die Objektträger wurden erst angetaut und danach in Methanol/Eisessig (3:1) für 90 Sek. fixiert.

Paraffin- und Gefrierschnitte wurden sodann 10 Min. lang mit dest. H<sub>2</sub>O und hierauf 10 Min. lang mit 1x TBS-Tween gewaschen. Schließlich wurden die Leberschnitte mit Peroxidase in einer feuchten Färbekammer für 10 Min. bei RT geblockt und zweimal für je 10 Min. in 1x

TBS-Tween gewaschen. Zuletzt wurde der anti-Ki67-AK (1:100 in 1x Tris HCl mit 1 % BSA verdünnt) auf die Objektträger aufgetragen und in der Färbekammer bei 4° C im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zweimal für je 10 Min. in 1x TBS-Tween gewaschen und schließlich mit dem sekundären anti-rabbit AK für 30 Min. bei RT in der Färbekammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (zweimal für je 10 Min. in 1x TBS-Tween) erfolgte die Behandlung mit Substrat/Chromogen für 1-5 Min. in der abgedunkelten Färbekammer. Hierauf wurden die Schnitte für 10 Min. mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen, 10 Sek. mit Mayer's Hämalaun gefärbt und wiederum für 10 Min. unter fließendem dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Zum Schluss wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit Glycerol eingedeckt.

Für die Auszählung der Ki67-positiven Zellkerne in der Leber wurden pro Versuchsgruppe 4 Tiere analysiert. Von jedem Tier wurden konsekutive histologische Schnitte der gesamten Leber angefertigt und jeder 15. Leberschnitt angefärbt um die gesamte Leber systematisch zu untersuchen.

Pro Leberschnitt wurde die Anzahl der gesamten Gesichtsfelder am Lichtmikroskop bei 20 x Vergrößerung ausgezählt und die Zahl der Ki67-positiven Zellkerne im gesamten Schnitt gezählt. Somit konnte der Mittelwert der Ki67-positiven Zellkerne pro Gesichtsfeld ermittelt werden. Aus diesen Mittelwerten der einzelnen Leberschnitte pro Tier konnte abschließend ein Mittelwert für alle untersuchten Tiere einer Versuchsgruppe gebildet werden.

#### 2.2.13.3.2 Cytokeratin 19-Färbung

Cytokeratine gehören zu den Intermediärfilamenten und sind insbesondere in Epithelzellen exprimiert. Das Cytokeratin 19-Protein wird von Pankreaskarzinomzellen exprimiert, wohingegen es unter physiologischen Bedingungen nicht im Gastrointestinaltrakt aufzufinden ist. Aus diesem Grund gilt es dort als ein Marker für maligne Strukturen. Allerdings werden ebenso Gallengänge Cytokeratin 19-positiv angefärbt, so dass zwischen malignen Zellen und Gallengangszellen unterschieden werden muss.

Für die Färbung wurden die Paraffinschnitte der Mauslebern zunächst entparaffiniert (zweimal für je 3 Min. in Roticlear) und in einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal für je 3 Min. in 100 %-, 96 %-, 70 %-Ethanol) dehydriert. Daraufhin folgte die Antigendemaskierung in Citrat-Puffer in der Mikrowelle bei 600 W für 10 Min. Die Objektträger wurden danach für 20 Min. in Citrat-Puffer auf RT abgekühlt. Bei Kryoschnitten entfielen diese Schritte, die Objektträger wurden zunächst angetaut und anschließend in Methanol/Eisessig (3:1) für 90 Sek. fixiert.

Paraffin- und Kryoschnitte wurden sodann zweimal für je 5 Min. in dest. H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich 15 Min. mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %-ig) bei RT behandelt. Nach einem Waschschrift (dest. H<sub>2</sub>O für 5 Min. und PBS für zweimal je 5 Min.) wurden alle darauffolgenden Färbeschritte in der Färbekammer und alle Waschschriffe in einer Färbeschale durchgeführt. Zunächst wurde

eine Blocklösung (bestehend aus PBS und 5 % Kaninchenserum) für 1 h bei RT aufgetragen. Der in der Blocklösung verdünnte anti-Cytokeratin 19-AK (Endkonzentration 1,4 µg/ml) wurde im Anschluss über Nacht bei 4° C appliziert.

Am nächsten Tag wurden die Objektträger mit PBS dreimal für je 5 Min. gewaschen und 1 h mit dem biotinylierten sekundären anti-rat-AK (Endkonzentration 3 µg/ml, gelöst in PBS und 5 % Kaninchenserum) bei RT in der Färbekammer inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS (dreimal für je 5 Min.) wurde für 30 Min. eine ABC-Lösung (Avidin-Biotin-Komplex zur Detektion des biotinylierten sekundären AK) aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift (dest. H<sub>2</sub>O dreimal für je 5 Min.) wurden die Schnitte in der abgedunkeltem Färbekammer für ca. 30 Sek. mit einer Substrat/Chromogen-Lösung behandelt, bis sie eine hellbraune Farbe angenommen hatten und sogleich wieder für 5 Min. mit dest. H<sub>2</sub>O gewaschen. Zum Schluss erfolgte für 10 Sek. die Färbung mit Mayer's Hämalaun. Nach dem Waschen unter fließendem dest. H<sub>2</sub>O wurden die Paraffinschnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (zweimal für je 3 Min. 70 %-, 96 %-, 100 %-iges Ethanol) dehydriert und mit Roticlear (zweimal für je 3 Min.) entparaffiniert. Schließlich wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit Glycerol eingedeckt.

Bei der Analyse der Cytokeratin 19-Färbung der Leber wurde von jedem Tier (n=5) jeder 15. konsekutiv angefertigte Schnitt gefärbt, so dass letztlich die gesamte Leber bei einer 20 x Vergrößerung am Lichtmikroskop systematisch analysiert werden konnte. Die gesamten Leberschnitte wurden jeweils auf Cytokeratin-19 positive Strukturen untersucht.

#### 2.2.13.3.3 $\alpha$ -Smooth Muscle Actin ( $\alpha$ -SMA)-Färbung

Mit der  $\alpha$ -SMA-Färbung werden Aktinproteine in glatten Muskelzellen und Perizyten angefärbt. Außerdem ist  $\alpha$ -SMA ein Marker für Myofibroblasten. Fibroblasten wandeln sich während der Bildung einer prämetastatischen Nische in Myofibroblasten um. Somit deutet der Nachweis von  $\alpha$ -SMA in anderen Zellen als glatten Muskelzellen und Perizyten auf die Bildung von prämetastatischen Nischen hin (Spaeth *et al.* 2009, Duda *et al.* 2010).

Die Färbung des  $\alpha$ -SMA erfolgte analog des Protokolls für die Cytokeratin 19-Färbung (Kap. 2.2.13.3.2). Der primäre AK wurde in der Endkonzentration 1 µg/ml verwendet, für die Block- und AK-Lösungen wurde Ziegenserum eingesetzt.

Für die Auswertung der  $\alpha$ -SMA-Färbung wurden pro Versuchsgruppe 4 Tiere untersucht und jeder 15. konsekutiv angefertigte Schnitt einer Leber gefärbt. Pro Tier wurden am Lichtmikroskop bei 20 x Vergrößerung die Gesichtsfelder mit  $\alpha$ -SMA-positiven Strukturen sowie die Gesamtzahl der Gesichtsfelder pro Leberschnitt gezählt. Abschließend wurde die Anzahl der  $\alpha$ -SMA-positiven Gesichtsfelder pro Leberschnitt angegeben.

#### 2.2.13.3.4 Morphologisch veränderte Strukturen

Bei der Analyse der Lebern der Mäuse nach Injektion von L3.6pl-Zellen sowie nach Injektion von L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP fielen in der Histologie beim Carstair's Staining und in der Ki67-Färbung morphologisch veränderte, metastatische Strukturen auf, welche sich vom physiologischen Lebergewebe abgrenzten. Diese metastatischen Herde mit oder ohne Ki67-positive Zellkerne waren durch Stroma vom normalen Gewebe abgegrenzt. Bei den morphologischen Veränderungen handelt es sich um Zellen mit polymorphen Zellkernen bzw. polynukleäre Zellen.

In jeder Versuchsgruppe wurden 4 Mäuse untersucht. Pro Leber wurde jeder 15. konsekutiv geschnittene Leberschnitt untersucht. Bei 20 x Vergrößerung wurde die Anzahl der Gesichtsfelder des gesamten Schnittes sowie die Anzahl der Gesichtsfelder mit morphologisch veränderten Strukturen pro Schnitt gezählt und in Prozent der Gesichtsfelder des gesamten Leberschnittes angegeben.

#### **2.2.13.4 Immunfluoreszenz-Färbungen**

Die Immunfluoreszenz-Färbung unterscheidet sich von der Immunhistochemie darin, dass die AK direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Eine Enzym-Substrat/Chromogen-Reaktion ist für die Farbentstehung somit nicht mehr erforderlich. Schließlich können die gefärbten Präparate im Fluoreszenzmikroskop oder im konfokalen Laserscanmikroskop betrachtet werden. In den vorliegenden Versuchen wurden AK eingesetzt, welche mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa 488 (grüne Farbe), Alexa 550 (orange Farbe) oder Alexa 594 (rote Farbe) gelabelt waren.

##### 2.2.13.4.1 Fluoreszenz-Färbung von neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten fördern die Tumorigenese (Pekarek *et al.* 1995) sowie die Bildung einer prämetastatischen Nische (De Larco *et al.* 2004). Die Färbung der Neutrophilen erfolgte in der vorliegenden Arbeit um einen Hinweis auf die Bildung einer prämetastatischen Nische zu erhalten.

Zur Visualisierung wurden die Paraffinschnitte behandelt wie in Kap. 2.2.13.3.2 beschrieben. Die ebenso eingesetzten Gefrierschnitte wurden angetaut, in Methanol/Eisessig (3:1) für 90 Sek. fixiert und dreimal für je 3 Min. in PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte sowohl bei den Paraffin- als auch bei den Kryoschnitten das Blocken und Permeabilisieren für 30 Min. bei RT in einer Permeabilisierungs- und Blocklösung. Nach erneutem Waschen (dreimal je 3 Min. in PBS) wurde der anti-Neutrophilen-AK (1:500 in der Permeabilisierungs- und Blocklösung verdünnt) aufgetragen und in der Färbekammer bei RT über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte dreimal für je 3 Min. in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Applikation des Sekundär-AK für 1 h bei RT in der Färbekammer. Nach weiteren

Waschschritten (dreimal für je 3 Min. mit PBS und einmal für 3 Min. mit dest. H<sub>2</sub>O) wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit DAPI-haltigem Eindeckmedium eingedeckt.

Anschließend wurde am Fluoreszenzmikroskop die Anzahl der neutrophilen Granulozyten bei 20 x Vergrößerung in 10 konsekutiven Gesichtsfeldern bei 4 Tieren pro Versuchsgruppe ausgezählt.

#### **2.2.14 Markierung von MP**

Um die MP im konfokalen Laserscanmikroskop und Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, wurden sie mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff 5-(and-6)-Carboxyfluorescein Diacetate (DCF) markiert. Dazu wurden die MP im Verhältnis 1:200 mit 4,48 mM DCF für 2 Min. bei RT inkubiert und daraufhin für 30 Min. bei 17.740 x g zentrifugiert. Schließlich folgten 2 Waschschritte mit PBS.

Die grüne Fluoreszenz der MP resultierte aus der Spaltung des in die MP diffundierten Farbstoffes durch intramikropartikuläre Esterasen.

#### **2.2.15 Fluoreszenzmikroskopie**

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht prinzipiell auf demjenigen der Lichtmikroskopie. Im Gegensatz zu dieser werden hierbei jedoch Fluoreszenzfarbstoffe, sog. Fluorochrome, verwendet, welche Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und mit einer anderen Wellenlänge wieder emittieren.

Das von einer Lichtquelle abgegebene Licht trifft auf einen Anregungsfilter, welchen nur das Licht mit der für die Anregung benötigten Wellenlänge passieren kann. Hierauf wird der Lichtstrahl auf einen dichroitischen Spiegel, den Strahlteiler, gelenkt. Dieser reflektiert das kurzwellige Licht durch das Objektiv zum Präparat und somit zu den Fluorochromen. Vom Präparat wird daraufhin langwelliges Licht zum Strahlteiler und des Weiteren über einen Sperrfilter (um das verbleibende kurzwellige Licht zu eliminieren) zum Detektor geleitet. Als Detektor fungiert üblicherweise eine mit einem Computer verbundene Kamera, so dass die aufgenommenen Bilder schließlich am Computer analysiert werden können.

#### **2.2.16 Konfokale Mikroskopie**

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (kLSM), einer Form der Fluoreszenzmikroskopie, wird ein Präparat punktweise mittels eines Laserstrahls behandelt. Die Lichtquelle (der Laserstrahl) wird zunächst durch das Objektiv in eine Lochblende geleitet, um den Lichtstrahl zu fokussieren. Danach fällt das Licht auf einen dichroitischen Spiegel, welcher durchlässig ist für das Fluoreszenzlicht. Schließlich gelangt der Lichtstrahl auf das Präparat. Dieses emittiert das Fluoreszenzlicht, welches erneut über den Spiegel und eine zweite Lochblende zum Detektor, den Photomultiplier, gelenkt und von diesem

aufgenommen wird. Ein elektrisches Signal wird generiert, welches vom Computer erfasst wird.

Für die beschriebenen Versuche wurde das konfokale Laserscanmikroskop LSM 510 Meta der Firma Zeiss benutzt, welches sowohl einen Argon-Laser für die Emission von blauem bis grünem Licht als auch drei Helium-Neon-Laser für oranges bis rotes Licht besitzt.

### **2.2.17 Auswertung der mikroskopischen Aufnahmen**

Die Analyse der kLSM-Aufnahmen erfolgte mittels der Software LSM 510 Release 4.0 (Zeiss). Lichtmikroskop- sowie Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen wurden mit der AxioVision Rel. 4.8 - Software (Zeiss) untersucht und ausgewertet.

### **2.2.18 Statistik**

Zur statistischen Auswertung wurde die Software Sigma Stat<sup>TM</sup> verwendet. Der Vergleich von zwei Gruppen erfolgte bei unverbundenen und normalverteilten Stichproben mittels des t-Tests. Waren die Stichproben unverbunden und nicht normalverteilt, wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  galt als statistisch signifikant.

Die aufgeführten Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3. Ergebnisse

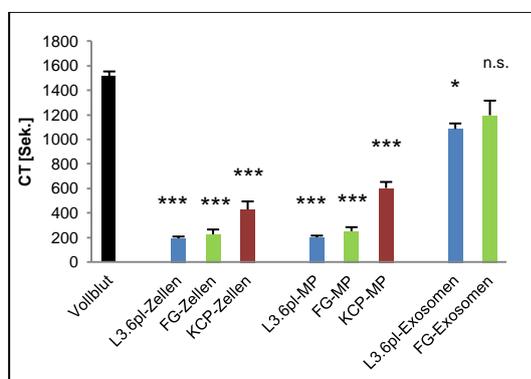
#### 3.1. Mechanismen der *in vitro* Gerinnungsaktivierung durch karzinomatöse Zellen und Mikrovesikel

Um zu prüfen, ob Pankreaskarzinomzellen und die daraus isolierten Mikrovesikel die Blutgerinnung aktivieren, wurde zunächst in *in vitro* Koagulationsassays die Bildung der Gerinnungsfaktoren Xa und XIIa gemessen und die Fibrinentstehung mit Hilfe der TEG ermittelt. Des Weiteren wurde die Beteiligung von TF, den Koagulationsfaktoren VII, IX, X und XI sowie der Proteine Mucin-1 und Mucin-4 an der Blutgerinnungsaktivierung überprüft. Die Messungen wurden mit je 50 µg/ml Exosomen bzw. MP durchgeführt. Diese Zahlen sind, davon ausgehend, dass 1 µg MP-Protein ca. 4000 MP entspricht, wie aus durchflusszytometrischen Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe hervorgeht, vergleichbar mit der Menge an karzinomatösen Mikrovesikeln im Blut von Karzinompatienten (Tesselaar *et al.* 2007, Zwicker *et al.* 2009).

##### 3.1.1 TEG

Karzinomatöse MP bzw. Zellen wurden dem Vollblut gesunder Blutspender hinzugegeben und die Clotting Time (CT) gemessen. Die CT des Vollbluts mit Vehikellösung (PBS) diente als Kontrollwert.

Nach Zugabe von L3.6pl- und FG-Zellen wurde die Zeit bis zur Fibrinbildung stark verringert. Die KCP-Zelllinie wies ebenfalls eine prokoagulatorische Aktivität auf, die jedoch gegenüber derjenigen von Zellen des orthotopen Modells abgeschwächt war (Abb. 6). Bei L3.6pl-, FG- und KCP-MP zeigte sich ebenfalls ein sehr niedriger CT-Wert und somit eine massive Fibrinbildung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 6). KCP-MP hatten einen schwächeren prokoagulatorischen Effekt als L3.6pl- und FG-MP. L3.6pl-Exosomen stimulierten die Fibrinbildung geringfügig, während FG-Exosomen die CT nicht beeinflussten (Abb. 6).



**Abb. 6: Fibrinbildung nach Zugabe von Pankreaskarzinomzellen, -MP und -Exosomen**

Je 20.000 Pankreaskarzinomzellen sowie 50 µg/ml Pankreaskarzinom-Mikrovesikel wurden citriertem Vollblut hinzugegeben und die CT mittels Thrombelastographen gemessen.

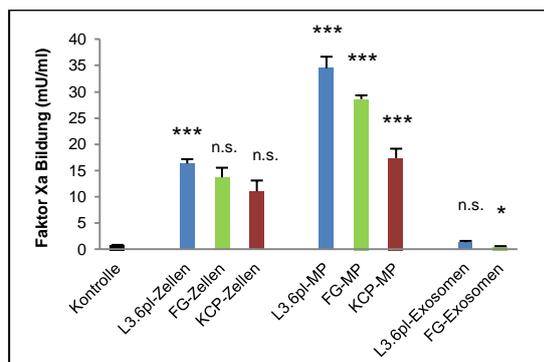
Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant,

\* p=<0,05, \*\*\* p=<0,001 gegenüber Vollblut mit PBS

##### 3.1.2 Faktor Xa Aktivitätsmessung

Um den molekularen Mechanismus der Aktivierung des Gerinnungssystems durch die karzinomatösen MP und Zellen zu bestimmen, wurde anschließend die Aktivierung des

Faktors X untersucht. Die karzinomatösen Zellen und MP induzierten generell eine gesteigerte Faktor Xa Bildung (Abb. 7). Dabei wiesen die MP beider Karzinommodelle einen stärkeren Effekt als die entsprechenden Zellen auf. L3.6pl-MP führten zur ausgeprägtesten Faktor Xa Bildung. L3.6pl- und FG-Exosomen zeigten hingegen keine Aktivierung von Faktor X (Abb. 7). Somit wurde deutlich, dass Faktor X durch Zellen und MP beider Pankreaskarzinommodelle aktiviert wird.

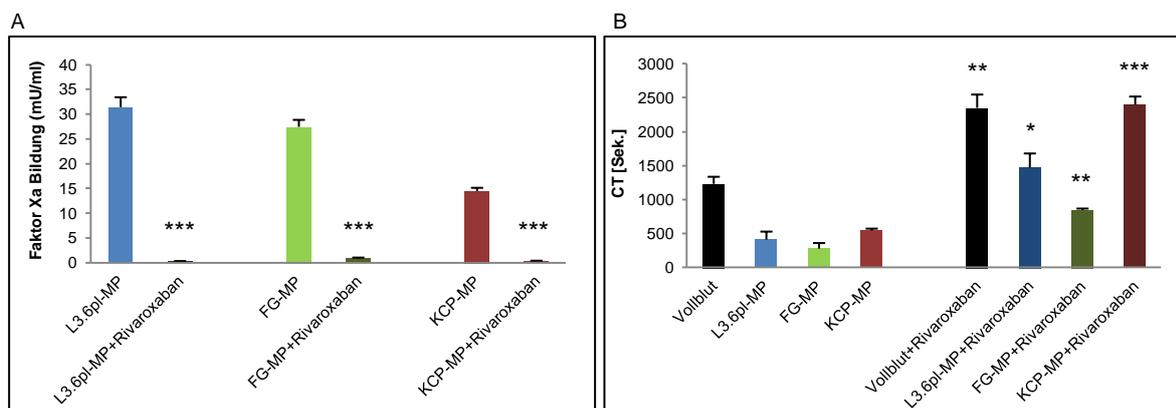


**Abb. 7: Messung der Faktor Xa Bildung durch Pankreaskarzinomzellen, -MP und -Exosomen**

Die Faktor Xa Bildung wurde nach Zugabe von jeweils 20.000 Karzinomzellen und 50 µg/ml karzinomatöser Mikrovesikel im chromogenen Assay bestimmt.

Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \* p<0,05, \*\*\* p<0,001 gegenüber Kontrolle

In Anwesenheit des direkten Faktor Xa Antagonisten Rivaroxaban (Endkonzentration 10 µM), der zur Gruppe der Oxazolidinone gehört, einer Stoffgruppe von gesättigten heterozyklischen Verbindungen, wurde die Faktor X Aktivierung durch Karzinom-MP beider Pankreaskarzinommodelle vollständig gehemmt (Abb. 8 A). Rivaroxaban inhibierte auch die durch karzinomatöse MP induzierte Fibrinbildung in Vollblut nahezu vollständig (Abb. 8 B). Daneben hemmte der Faktor Xa Antagonist auch die Koagulations-Aktivierung unter Kontrollbedingungen (Abb. 8 B).



**Abb. 8: Wirkung von Rivaroxaban auf die durch Karzinom-MP induzierte Faktor Xa-Bildung (A) und die Fibrinestehung (B)**

Je 50 µg/ml Pankreaskarzinom-MP wurden nach Zugabe von 10 µM Rivaroxaban im Faktor Xa Assay und in der TEG eingesetzt. Mittelwerte ± SEM, n=3, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 gegenüber der entsprechenden Probe ohne Zugabe von Rivaroxaban

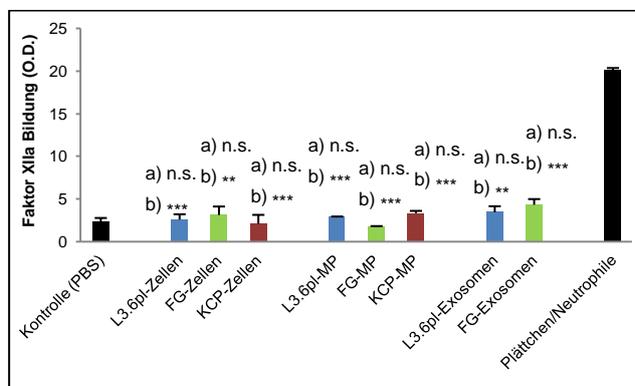
### 3.1.3 Intrinsischer und extrinsischer Blutgerinnungsweg

Da Faktor Xa sowohl durch den intrinsischen als auch durch den extrinsischen Weg des Koagulationssystems gebildet werden kann, wurden anschließend die Beteiligungen von Faktor XII und TF untersucht, die jeweils den intrinsischen bzw. den extrinsischen Weg initiieren.

#### 3.1.3.1 Intrinsischer Blutgerinnungsweg

##### 3.1.3.1.1 Faktor XIIa Aktivitätsmessung

Die karzinomatösen Zellen, -MP und -Exosomen zeigten nahezu keine Faktor XIIa Aktivität. (Abb. 9). Dabei ist zu beachten, dass als Negativkontrolle Lösungen mit PBS verwendet wurden, als Positivkontrolle Proben mit Blutplättchen/neutrophilen Granulozyten.

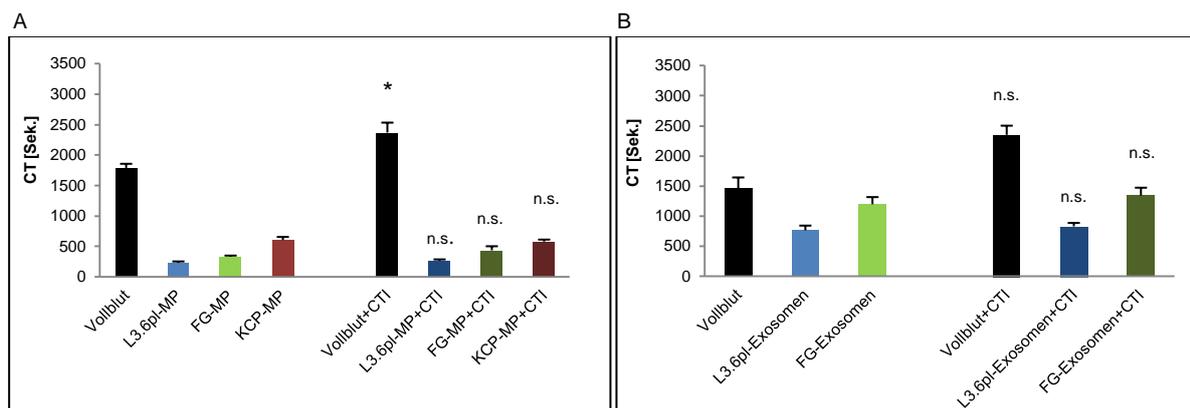


**Abb. 9: Bestimmung der Faktor XIIa Bildung durch Pankreaskarzinomzellen, -MP und -Exosomen**

Die Faktor XIIa Bildung wurde in einem chromogenen Assay bestimmt. Eingesetzt wurden jeweils 20.000 Karzinomzellen und 50 µg/ml Karzinom-Mikrovesikel. Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \*\* p=<0,01, \*\*\* p=<0,001 gegenüber a) Kontrolle (PBS), b) Plättchen/Neutrophile

##### 3.1.3.1.2 Fibrinbildung nach Zugabe von CTI

Um die Beteiligung des intrinsischen Blutgerinnungsweges weiter zu analysieren, wurde am Thrombelastographen die Fibrinbildung durch Mikrovesikel nach Zugabe des Faktor XIIa Inhibitors Corn Trypsin Inhibitor (=CTI, Endkonzentration 50 µg/ml) bestimmt. CTI inhibiert FXIIa spezifisch, indem es einen Komplex mit Faktor XIIa ausbildet. Während CTI die Fibrinbildung in der Kontrolle leicht verlängerte, wurde die deutlich erhöhte Fibrinbildung nach Zugabe der Karzinom-MP nicht durch CTI beeinflusst (Abb. 10 A). CTI hatte auch keinen Einfluss auf die Fibrinbildung in Anwesenheit der karzinomatösen Exosomen (Abb. 10 B).



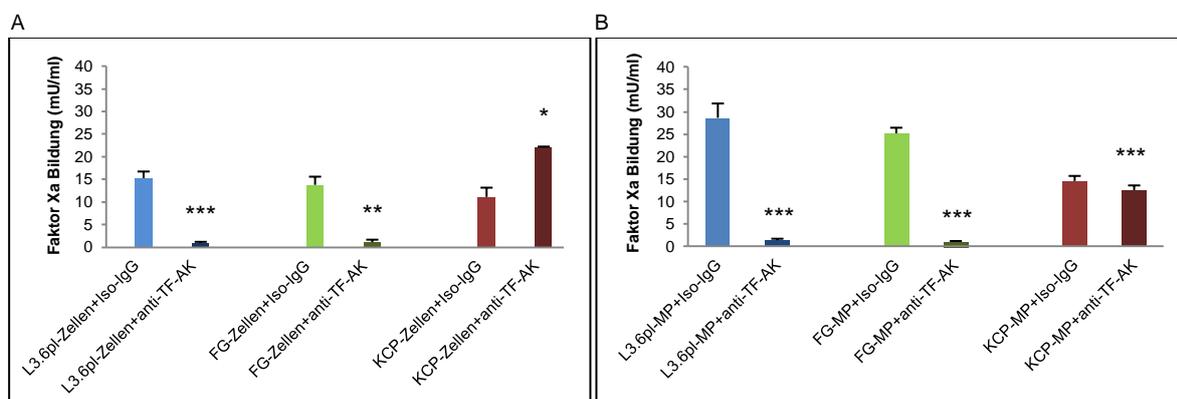
**Abb. 10: Fibrinbildung durch je 50 µg/ml Pankreaskarzinom-MP (A) und je 50 µg/ml -Exosomen (B) nach Zugabe von CTI**

Die CT wurde nach Zugabe von 50 µg/ml CTI gemessen. Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \* p=<0,05 gegenüber der entsprechenden Probe ohne CTI

### 3.1.3.2 Extrinsischer Blutgerinnungsweg

#### 3.1.3.2.1 TF

Um die Beteiligung von TF an der durch Tumorzellen sowie Tumor-Mikrovesikel induzierten Gerinnungsaktivierung zu ermitteln, wurden die prokoagulatorischen Assays in Anwesenheit eines anti-TF-AK (Endkonzentration 50 µg/ml) durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Iso-IgG (Endkonzentration 50 µg/ml) verwendet. Nach Zugabe des anti-TF-AK zeigte sich eine deutliche Hemmung der durch L3.6pl- bzw. FG-Zellen und -MP induzierten Faktor Xa Bildung. Interessanterweise wurde im Gegensatz dazu die Faktor Xa Bildung nach Zugabe von KCP-Zellen (Abb. 11 A) und -MP (Abb. 11 B) durch TF-Inhibierung nicht beeinflusst.

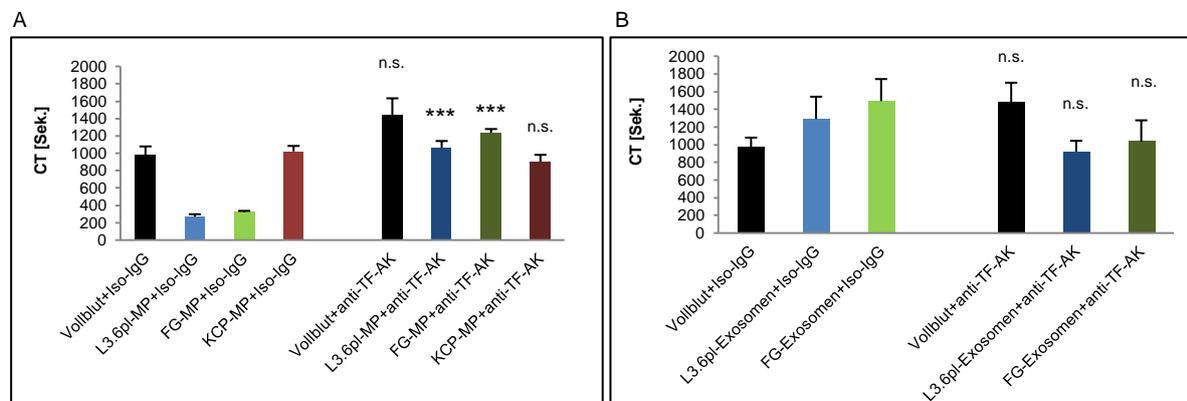


**Abb. 11: Wirkung von anti-TF-AK auf die Faktor Xa Bildung durch Karzinomzellen (A) und -MP (B)**

Die Faktor Xa Aktivierung wurde nach Zugabe von 50 µg/ml anti-TF-AK im chromogenen Faktor Xa Assay bestimmt. Es wurden je 20.000 Karzinom-Zellen sowie je 50 µg/ml Karzinom-MP verwendet. Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \* p=<0,05, \*\* p=<0,01, \*\*\* p=<0,001 gegenüber Pankreaskarzinomzellen bzw. -MP+Iso-IgG

Die Vollblut-Fibrinbildung war nach Zugabe des anti-TF-AK im Falle von L3.6pl- und FG-MP deutlich verlängert (Abb. 12 A). Im Blut, das mit L3.6pl- und FG-Exosomen versetzt worden war, wurde kein inhibitorischer Effekt des anti-TF-AK beobachtet (Abb. 12 B).

Insgesamt zeigten diese Experimente, dass die prokoagulatorischen Wirkungen der Karzinomzellen und -MP des orthotopen Modells durch TF vermittelt werden, nicht aber diejenigen des transgenen Modells.



**Abb. 12: Bestimmung der CT von Pankreaskarzinom-MP (A) und -Exosomen (B) nach Zugabe von anti-TF-AK**  
50 µg/ml anti-TF-AK wurden zu je 50 µg/ml Pankreaskarzinom-MP sowie zu je 50 µg/ml Pankreaskarzinom-Exosomen hinzugegeben und die CT in der TEG gemessen. Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \*\*\* p<0,001 gegenüber Pankreaskarzinom-MP+Iso-IgG bzw. Pankreaskarzinom-Exosomen+Iso-IgG

### 3.1.4 Koagulationsfaktor VII, IX, X und XI

Um genaueren Aufschluss über die Mechanismen der Blutgerinnungsaktivierung durch karzinomatöse MP zu erhalten, wurden als nächstes die Beteiligungen einzelner Gerinnungsfaktoren anhand von Faktor VII-, IX-, X- und XI- defizientem Blutplasma unter Zugabe von Pankreaskarzinom-MP in der TEG untersucht.

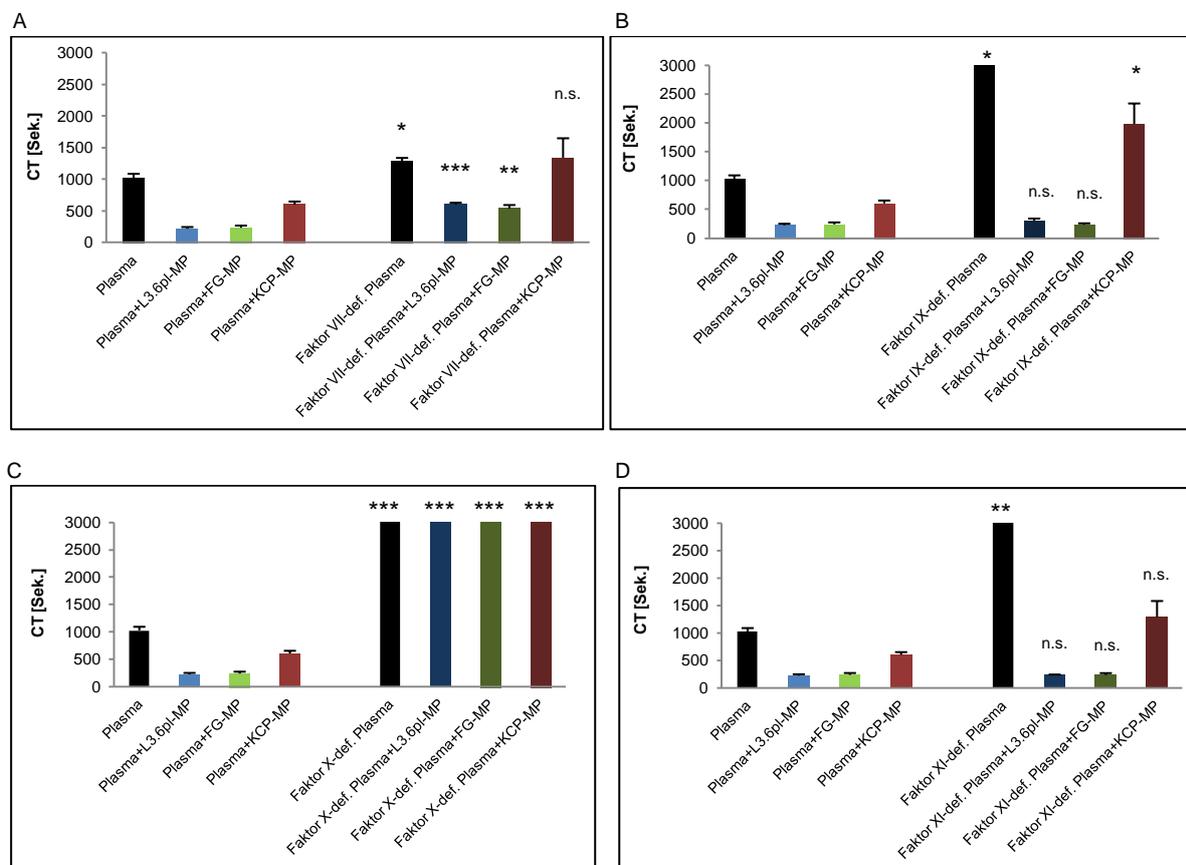
Dabei zeigte sich, dass die Zeit bis zur Bildung eines Blutgerinnsels in Anwesenheit von L3.6pl- und FG-MP im Faktor VII-defizienten Plasma im Verhältnis zur Kontrolle verlängert war (Abb. 13 A). Dies bestätigte die Abhängigkeit der MP des orthotopen Modells vom extrinsischen Gerinnungssystem (Kap. 3.1.3.2).

Im Faktor IX-defizienten Plasma kam es zu keiner ausgeprägten Beeinträchtigung der Fibrinbildung durch die MP des orthotopen Modells (Abb. 13 B). Im Gegensatz dazu war die CT bei KCP-MP im Faktor IX-defizienten Plasma deutlich verlängert (Abb. 13 B). Die MP des transgenen Modells sind folglich in ihrer Gerinnungsaktivierung bis zu einem gewissen Grad abhängig von Faktor IX und somit auch vom intrinsischen Blutgerinnungsweg.

Nach Einsatz von Faktor X-defizientem Plasma wurde keine Gerinnungsaktivierung durch die karzinomatösen MP beobachtet (Abb. 13 C). Dies zeigte, dass die Gerinnungsaktivierung durch MP beider Pankreaskarzinommodelle vollständig von Faktor X abhängig ist.

Zusätzlich wurde das Gerinnungsverhalten der karzinomatösen MP auch im Faktor XI-defizienten Plasma untersucht. Im Falle der MP des orthotopen Modells war die CT im Faktor XI-defizienten Plasma nicht beeinträchtigt (Abb. 13 D). Im Falle der KCP-MP war die Fibrinbildung tendenziell verlängert (Abb. 13 D). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die MP des orthotopen Modells die Blutgerinnung über einen Faktor VII- und Faktor X-

abhängigen Gerinnungsweg aktivieren, die MP des transgenen Modells hingegen über einen Faktor X- und Faktor IX-abhängigen Gerinnungsweg.



**Abb. 13: Fibrinbildung durch Pankreaskarzinom-MP im Faktor VII- (A), Faktor IX- (B), Faktor X- (C) und Faktor XI- (D) defizienten (def.) Plasma**

Die CT wurde in diversen TEG im def. Plasma nach Zugabe von je 50 µg/ml Pankreaskarzinom-MP ermittelt. Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 gegenüber der entsprechenden Probe mit Plasma

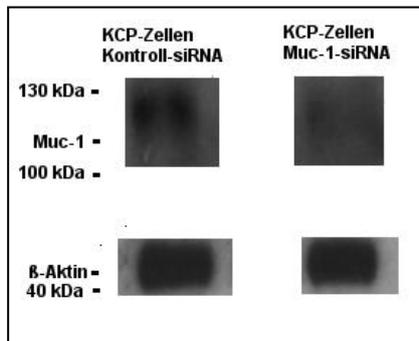
### 3.1.5 Mucin-1 (Muc-1)

Das Transmembranprotein Muc-1 wird von Karzinomen epithelialen Ursprungs wie dem Pankreaskarzinom überexprimiert und dient somit als zuverlässiger Marker für diese Erkrankungen. Muc-1 wird auch im Zusammenhang mit der Entstehung von Thrombosen bei Pankreaskarzinompatienten diskutiert (Tesselaar *et al.* 2007, Wang *et al.* 2012).

Da im transgenen Mausmodell ein TF-unabhängiger Mechanismus bei der MP- sowie Zell-induzierten Gerinnungsaktivierung involviert zu sein schien, war es von besonderem Interesse die Rolle von Muc-1 auf KCP-Zellen und -MP zu ergründen.

### 3.1.5.1 Nachweis der Expression von Muc-1 auf KCP-Zellen

Um herauszufinden, ob Muc-1 auf KCP-Zellen exprimiert wurde, wurden zunächst Western Blots durchgeführt. Dabei wurde eine Muc-1-spezifische Bande in KCP-Zellen nachgewiesen (Abb. 14). Durch spezifische siRNA für Muc-1-mRNA konnte die Expression von Muc-1 deutlich reduziert werden.



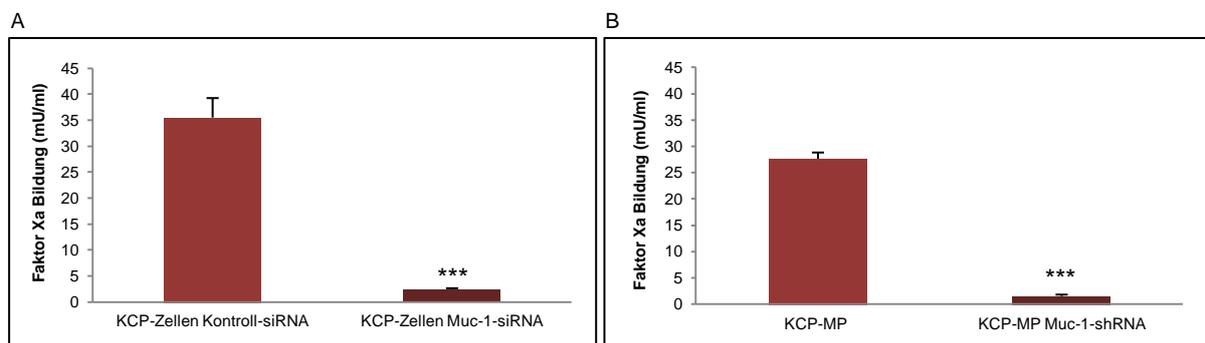
**Abb. 14: Western Blot zur Muc-1 Expression auf KCP-Zellen**

200 µg KCP-Zellen wurden mit 100 nM Muc-1-siRNA transfiziert. Ein Western Blot wurde mit diesen Zellen durchgeführt. Als Kontrolle dienten mit Kontroll-siRNA (100 nM) transfizierte KCP-Zellen.

### 3.1.5.2 Bedeutung von Muc-1 für die Koagulation

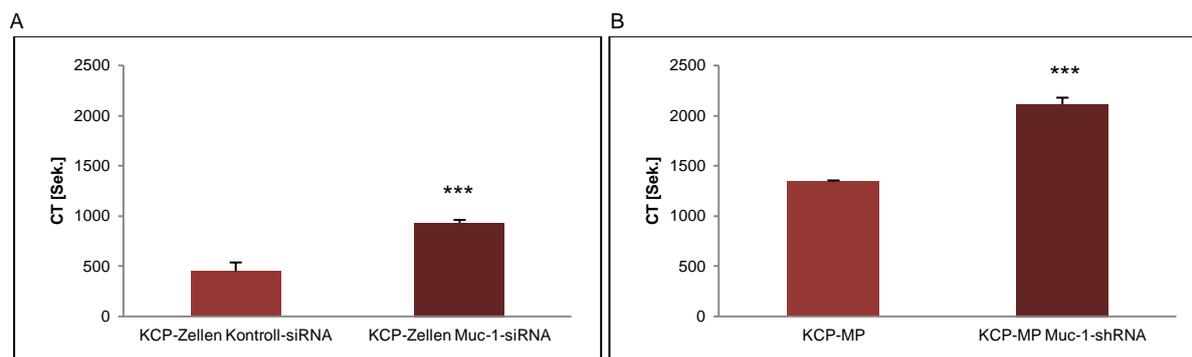
In einem weiteren Schritt wurde die prokoagulatorische Aktivität von mit Muc-1-siRNA transfizierten KCP-Zellen bzw. Kontrollzellen getestet. Des Weiteren wurden KCP-Zellen mit 2 µg Muc-1-shRNA transfiziert und eine stabil transfizierte Zelllinie generiert. Aus den Zellkultur-Überständen dieser Zellen wurden KCP-MP isoliert und für Koagulationsassays verwendet. Die Gerinnungsaktivierung der mit Muc-1-siRNA bzw. Muc-1-shRNA transfizierten Zellen und MP war gegenüber der Aktivierung durch die jeweiligen Kontrollzellen bzw. -MP deutlich verringert. Dies galt sowohl für die Bildung von Faktor Xa (Abb. 15 A, B) als auch für die Fibrinbildung in Vollblut (Abb. 16 A, B).

Die prokoagulatorische Wirkung der KCP-Zellen und -MP konnte somit zu einem erheblichen Teil auf das Muc-1 Protein zurückgeführt werden.



**Abb. 15: Messung der Faktor Xa Bildung durch mit Muc-1-siRNA bzw. mit Muc-1-shRNA transfizierte KCP-Zellen (A) und KCP-MP (B)**

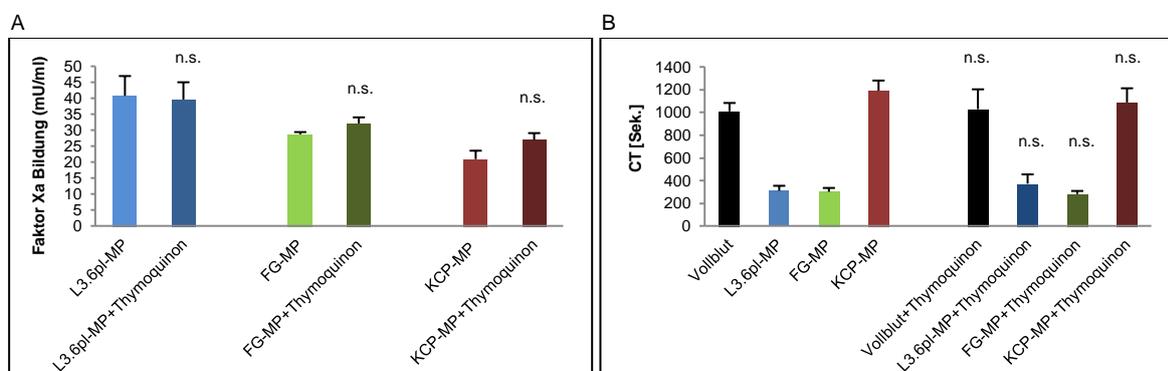
KCP-Zellen wurden mit 100 nM Muc-1-siRNA (A) bzw. mit 2 µg Muc-1-shRNA transfiziert, MP isoliert (B) und die Faktor Xa Bildung untersucht. Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$ , \*\*\*  $p<0,001$  gegenüber mit Kontroll-siRNA transfizierten KCP-Zellen bzw. nicht-transfizierten KCP-MP



**Abb. 16: Fibrinbildung durch mit Muc-1-siRNA bzw. mit Muc-1-shRNA transfizierte KCP-Zellen (A) und KCP-MP (B)**  
Die CT von transfizierten KCP-Zellen und KCP-MP wurde in der TEG gemessen. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3, \*\*\* p<0,001 gegenüber mit Kontroll-siRNA transfizierten KCP-Zellen bzw. nicht-transfizierten KCP-MP

### 3.1.6 Mucin-4 (Muc-4)

Das Glykoprotein Muc-4 wird bei Pankreaskarzinomen überexprimiert und ist unter physiologischen Bedingungen nicht im Pankreas zu finden. Muc-4 wird ebenfalls mit der Tumor-assoziierten Blutgerinnungsaktivierung in Zusammenhang gebracht (Zwicker *et al.* 2009). Mit Hilfe des Muc-4 Inhibitors Thymoquinon (Torres *et al.* 2010), einem phytochemischen Substrat aus dem Schwarzkümmelöl, wurde in der vorliegenden Arbeit getestet, ob Muc-4 an der prokoagulatorischen Aktivität der MP beteiligt ist. Jedoch zeigte Thymoquinon keinen Effekt auf die prokoagulatorischen Eigenschaften der MP beider Pankreaskarzinommodelle (Abb. 17). Folglich gab es keinen Hinweis darauf, dass das Protein Muc-4 in die durch karzinomatöse MP induzierte Gerinnungsaktivierung involviert ist.



**Abb. 17: Einfluss von Thymoquinon auf die Faktor Xa Bildung (A) und Fibrinbildung (B) durch karzinomatöse MP**  
Die Messung der Faktor Xa Bildung bzw. der CT erfolgte bei je 50  $\mu$ g/ml Pankreaskarzinom-MP nach Zugabe von 100  $\mu$ M Thymoquinon. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant gegenüber der entsprechenden Probe ohne Thymoquinon

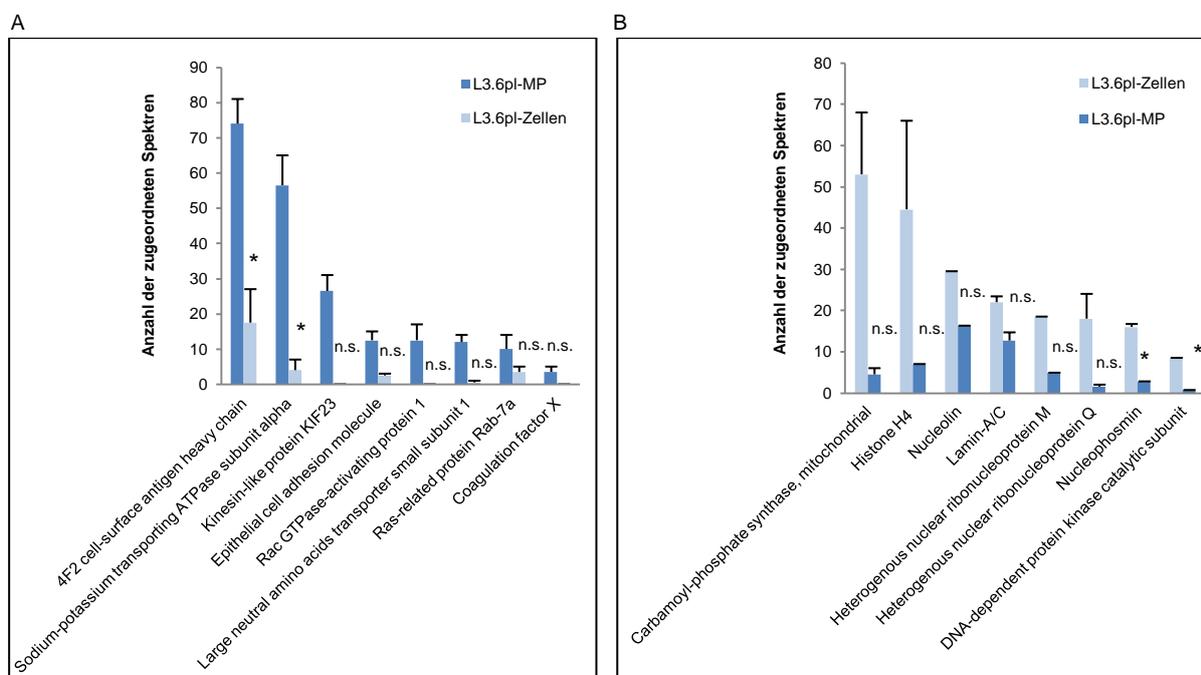
## 3.2 Proteomanalyse der Zellen und MP des orthotopen und transgenen Modells

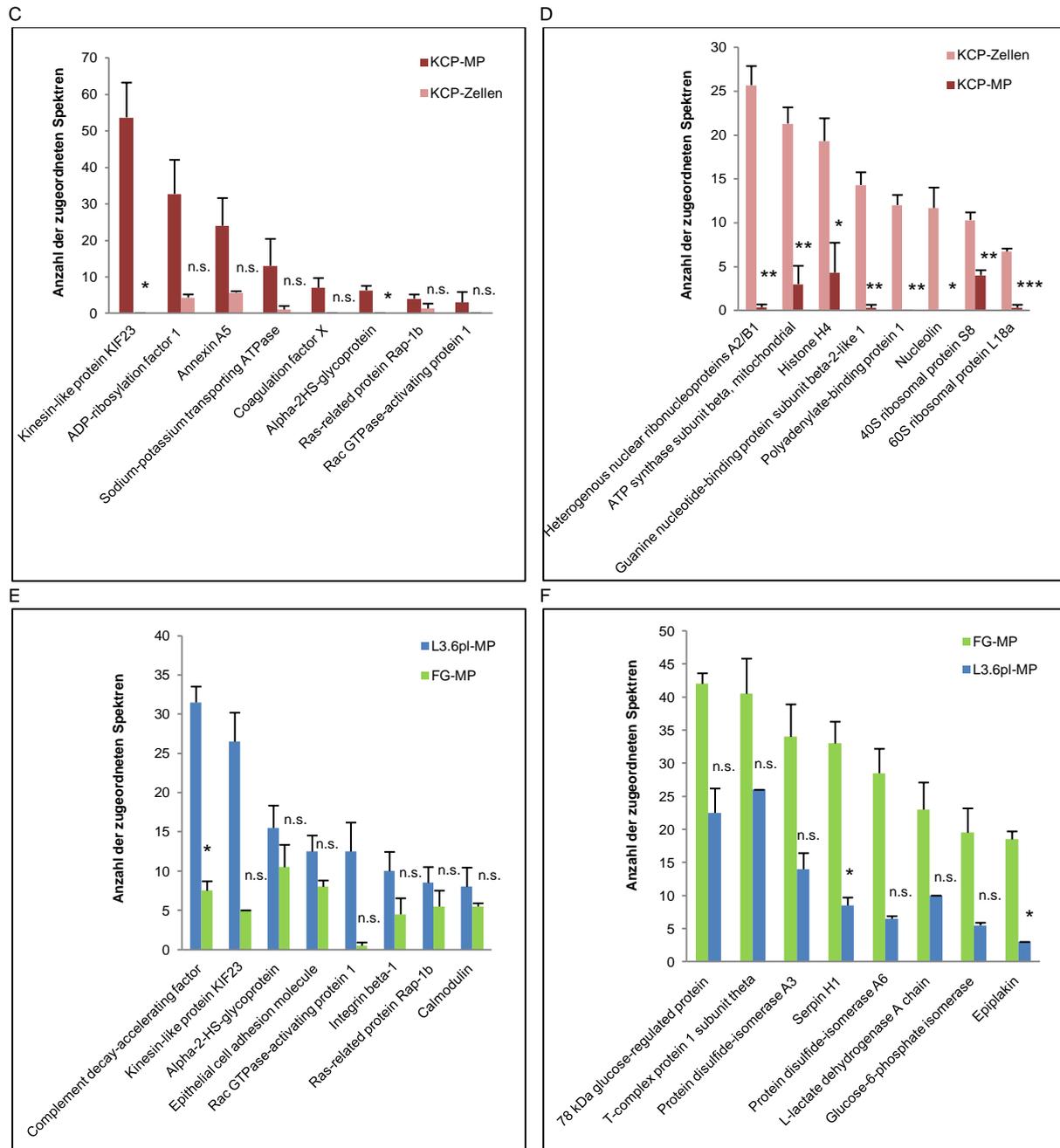
Das Proteom von L3.6pl-Zellen und L3.6pl-MP, FG-Zellen und FG-MP sowie KCP-Zellen und KCP-MP wurde mittels Proteomanalyse (Kap. 2.2.11) untersucht. Insgesamt wurde in jeder Gruppe die Expression von 350 Proteinen analysiert. Dabei wurde auf potentielle Unterschiede in der Expression von Proteinen zwischen Zellen und den daraus freigesetzten MP fokussiert. Im Verhältnis zu den Elternzellen waren bei den MP beider Pankreaskarzinommodelle vor allem Adhäsionsproteine wie z.B. epithelial cell adhesion molecule, 4F2 cell-surface antigen heavy chain (bei L3.6pl-MP, Abb. 18 A) bzw. andere

Membranproteine wie Na-K-ATPase (bei L3.6pl- und KCP-MP, Abb. 18 A, C) erhöht. Interessanterweise waren sowohl in den MP des orthotopen als auch in denjenigen des transgenen Pankreaskarzinommodells folgende Proteine stärker exprimiert als in den Zellen: Na-K-ATPase, Kinesin-like Protein 23 (KIF23), Rac GTPase-activating protein 1 (RacGAP1) und Koagulationsfaktor X (Abb. 18 A, C).

Auch zwischen L3.6pl-MP und FG-MP traten Unterschiede bezüglich der Expression von Proteinen auf. So waren bei L3.6pl-MP z.B. die Proteine complement decay accelerating factor, KIF23 und Alpha-2-HS-Glykoprotein stärker exprimiert als bei FG-MP (Abb. 18 E). Umgekehrt waren in den FG-MP beispielsweise 78 kDa glucose-regulated protein, T-complex protein 1 subunit theta und protein disulfide-isomerase A3 im Vergleich zu den L3.6pl-MP erhöht exprimiert (Abb. 18 F).

In den Pankreaskarzinomzellen beider Modelle hingegen waren nukleäre Proteine deutlich stärker exprimiert als in den jeweiligen MP (Heterogenous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 bei KCP-Zellen, Histone H4 bei KCP- und L3.6pl-Zellen, Heterogenous nuclear ribonucleoprotein M und DNA-dependent protein kinase catalytic subunit bei L3.6pl-Zellen). Ebenso galt dies für Proteine, die an der Transkription (Nukleolin und Histone H4 bei KCP- und L3.6pl-Zellen, DNA-dependent protein kinase catalytic subunit bei L3.6pl-Zellen) bzw. Translation (Polyadenylate-binding protein 1 bei KCP-Zellen) beteiligt sind sowie für ribosomale Proteine (40S ribosomal protein S8, 60S ribosomal protein L18a bei KCP-Zellen) (Abb. 18 B, D).





**Abb. 18: Proteine mit deutlichen Unterschieden an Expressionslevels zwischen Karzinomzellen und -MP bzw. zwischen verschiedenen MP**

In der Proteomanalyse wurde die Anzahl der zugeordneten Spektren von in Pankreaskarzinomzellen sowie -MP exprimierten Proteinen gemessen.

Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber:

A: L3.6pl-MP, B: L3.6pl-Zellen, C: KCP-MP, D: KCP-Zellen, E: L3.6pl-MP, F: FG-MP

A: L3.6pl-MP vs. L3.6pl-Zellen

B: L3.6pl-Zellen vs. L3.6pl-MP

C: KCP-MP vs. KCP-Zellen

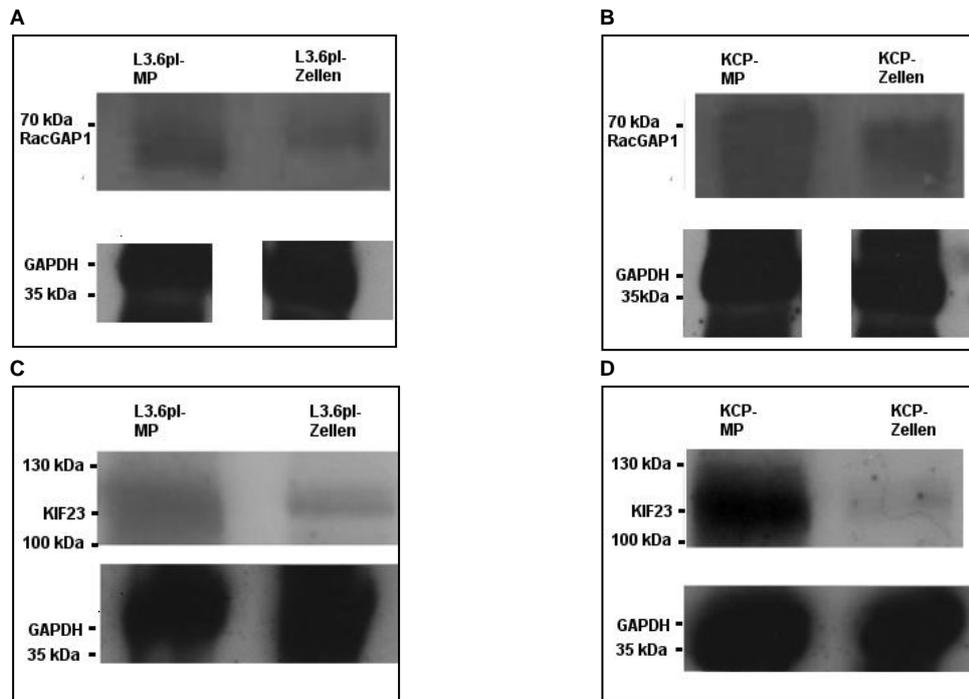
D: KCP-Zellen vs. KCP-MP

E: L3.6pl-MP vs. FG-MP

F: FG-MP vs. L3.6pl-MP

### 3.2.1 Nachweis von RacGAP1 und KIF23 in Pankreaskarzinomzellen und -MP mittels Western Blot

Um die Ergebnisse der Proteomanalyse mittels einer unabhängigen Methode zu verifizieren, wurden Western Blots mit den Karzinomzellen und den von ihnen freigesetzten MP durchgeführt. Dabei wurde insbesondere auf RacGAP1 und KIF23 fokussiert, da diese Proteine in den Proteomanalysen von MP beider Tumormodelle gegenüber den Ausgangszellen erhöht waren und als nukleäre Proteine von besonderem Interesse waren. Dies wurde durch die Western Blots bestätigt (Abb. 19). In MP beider Pankreaskarzinommodelle konnte im Vergleich zu den dazugehörigen Zellen eine stärkere Bande im Bereich des entsprechenden Molekulargewichtes (RacGAP1: ca. 70 kDa, KIF23: ca. 110 kDa) beobachtet werden. Die Resultate der Proteomanalyse waren somit reproduzierbar. Als Kontrolle dienten Western Blots mit GAPDH, da GAPDH (im Gegensatz zu  $\beta$ -Aktin) auch in MP deutlich exprimiert wird.



**Abb. 19: KIF23- und RacGAP1- Expression in Tumorzellen und -MP**

Je 200  $\mu$ g L3.6pl- und KCP-Zellen sowie L3.6pl- und KCP-MP wurden im Western Blot eingesetzt und auf die Expression von KIF23- sowie RacGAP1-Protein geprüft.

**A:** RacGAP1 Western Blot von L3.6pl-MP/L3.6pl-Zellen, dazugehöriger GAPDH Western Blot von L3.6pl-MP/L3.6pl-Zellen

**B:** RacGAP1 Western Blot von KCP-MP/KCP-Zellen, dazugehöriger GAPDH Western Blot von KCP-MP/KCP-Zellen

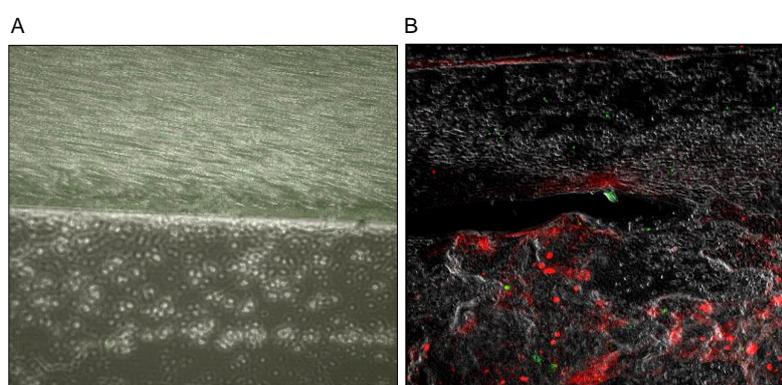
**C:** KIF23 Western Blot von L3.6pl-MP/L3.6pl-Zellen, dazugehöriger GAPDH Western Blot von L3.6pl-MP/L3.6pl-Zellen

**D:** KIF23 Western Blot von KCP-MP/KCP-Zellen, dazugehöriger GAPDH Western Blot von KCP-MP/KCP-Zellen

### 3.3 Wirkungen der karzinomatösen MP auf die Thrombenbildung und Thrombose *ex vivo* und *in vivo*

#### 3.3.1 Karzinomatöse MP im Flusskammermodell

Im Flusskammermodell wurde die Wirkung von L3.6pl-MP auf die Thrombusbildung im PRP *ex vivo* analysiert. Als Kontrolle diente PRP unter Zugabe von PBS. In Abwesenheit der MP wurde keine Thrombenbildung beobachtet (Abb. 20 A). In Anwesenheit von MP kam es bereits nach 5 Min. zur Bildung von Thromben, welche charakteristischerweise MP einschlossen. Nach 25 Min. lag eine fast 80 %-ige Okklusion der Flusskammer vor (Abb. 20 B).



**Abb. 20: Thrombenbildung in der Flusskammer**

Nach Zugabe von PBS (A) bzw. L3.6pl-MP (140 µg/ml) (B) wurde die Entstehung von Thromben in der Flusskammer untersucht.

Dauer des Experimentes: 25 Min., rot=Fibrinogen,

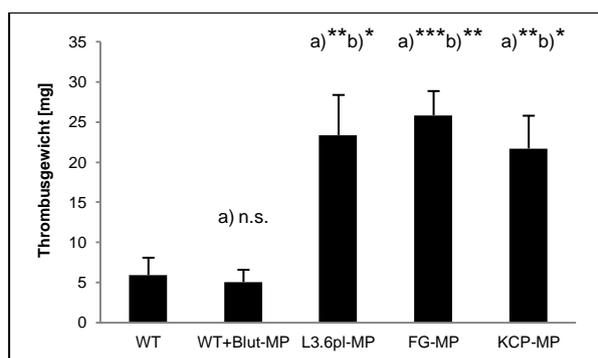
grün=DCF-gelabelte L3.6pl-MP

A: PRP ohne L3.6pl-MP

B: PRP plus 140 µg/ml L3.6pl-MP

#### 3.3.2 Induktion der DVT durch karzinomatöse MP *in vivo*

Bekannterweise ist das Pankreaskarzinom häufig mit DVT assoziiert (Zwicker *et al.* 2007, Davila *et al.* 2008). Um die Rolle der karzinomatösen MP bei der DVT zu ermitteln, wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Steffen Massberg (LMU München) ein neu entwickeltes *in vivo* Modell der DVT (von Brühl *et al.* 2012) eingesetzt. Dabei erfolgte die Injektion von karzinomatösen MP in 2 Portionen jeweils 6 h und 18 h nach der Ligatur der Vena cava caudalis in die Schwanzvene von WT-Mäusen. Die in der Vena cava caudalis entstandenen Thromben wurden nach insg. 48 h Versuchsdauer entnommen und gewogen. Nach Injektion von karzinomatösen MP beider Pankreaskarzinommodelle waren die Thrombusgewichte deutlich erhöht (Abb. 21). Zur Kontrolle wurden den Mäusen i.v. NaCl oder aus dem Vollblut gesunder Blutspender isolierte Blut-MP injiziert (Abb. 21).



**Abb. 21: Thrombusgewichte [mg] nach Injektion von karzinomatösen MP im DVT-Modell**

Nach Ligatur der Vena cava caudalis wurden WT-Mäusen zweimal je 150 µg L3.6pl-MP in die Schwanzvene injiziert. Nach insg. 48 h Versuchsdauer wurden die in der Vena cava caudalis entstandenen Thromben entnommen und analysiert.

Mittelwerte ± SEM, n=4, n.s.=nicht signifikant,

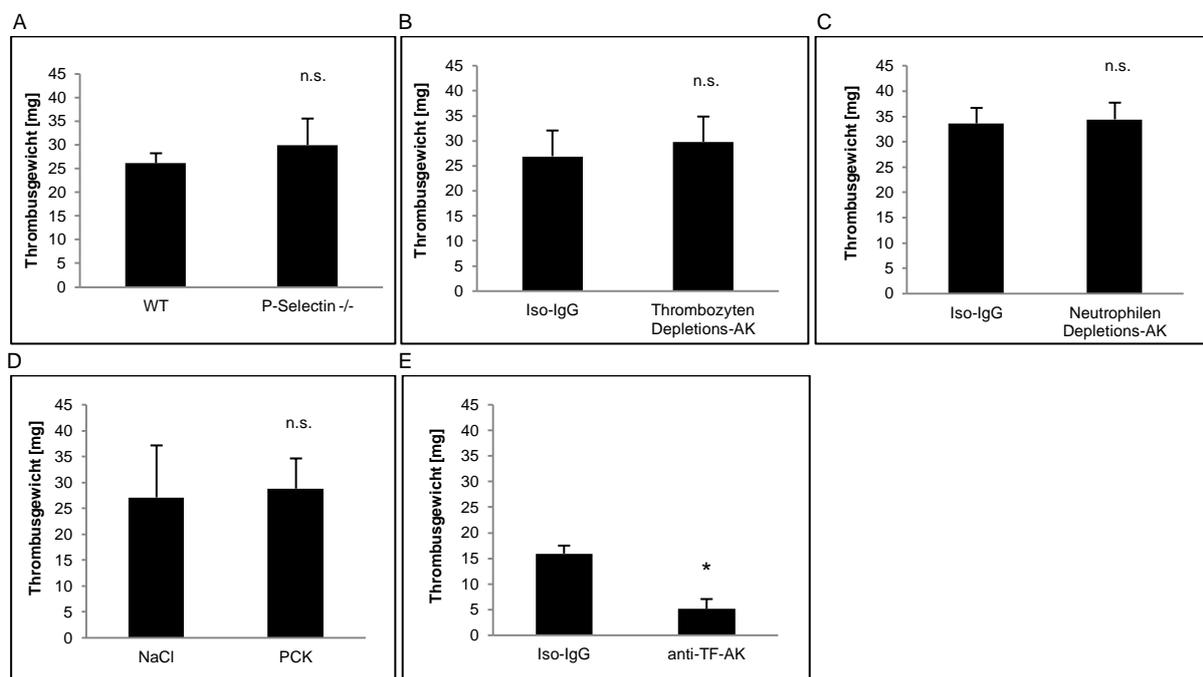
\* p=<0,05, \*\* p=<0,01, \*\*\* p=<0,001 gegenüber

a) WT+NaCl bzw. b) WT+Blut-MP

In weiteren Experimenten wurden zusätzlich Thrombozyten Depletions-AK, Neutrophilen Depletions-AK, Faktor XII Inhibitor H-D-Pro-Phe-Arg-chloromethylketone (PCK), anti-TF-AK sowie P-Selectin<sup>-/-</sup> Mäuse verwendet (Kap. 2.2.12.2).

Auch hier wurden karzinomatöse MP jeweils 6 h und 18 h nach der Ligatur der Vena cava caudalis in die Schwanzvene injiziert und nach 48 h Versuchsdauer wurden die in der Vena cava caudalis entstandenen Thromben untersucht.

In P-Selectin-defizienten Mäusen wurde die durch Karzinom-MP induzierte DVT nicht beeinflusst (Abb. 22 A). P-Selectin ist ein Zelladhäsionsmolekül auf Endothelzellen, welches die Rekrutierung von Thrombozyten an die Gefäße nach einem Endothelschaden vermittelt. Das ließ darauf schließen, dass die MP-induzierte DVT Thrombozyten-unabhängig ist. Auch die Zugabe von Thrombozyten Depletions-AK (Abb. 22 B), Neutrophilen Depletions-AK (Abb. 22 C) und von PCK (Abb. 22 D) beeinträchtigte die Thrombusbildung nicht. Dies deutete erneut darauf hin, dass Thrombozyten nicht an der durch Karzinom-MP bedingten-DVT beteiligt sind. Auch zeigte sich somit, dass neutrophile Granulozyten und Faktor XII bei der MP-induzierten DVT keine Rolle spielen. Hingegen waren die Thromben nach Zugabe von anti-TF-AK im Vergleich zur Kontrolle deutlich kleiner (Abb. 22 E). Folglich ist TF maßgeblich an der Thrombusbildung durch L3.6pl-MP beteiligt.



**Abb. 22: Thrombusgewichte [mg] nach Injektion von zweimal je 150 µg L3.6pl-MP im DVT-Modell**

L3.6pl-MP wurden in die Schwanzvene von WT- bzw. P-Selectin-defizienten Mäusen injiziert und die Bildung der DVT unter verschiedenen experimentellen Bedingungen getestet. Die Analysen der Thromben erfolgten nach insg. 48 h Versuchsdauer.

Mittelwerte ± SEM, n=3, n.s.=nicht signifikant, \* p<0,05 gegenüber der entsprechenden Kontrolle

**A:** P-Selectin<sup>-/-</sup>

**B:** Thrombozyten Depletions-AK

**C:** Neutrophilen Depletions-AK

**D:** PCK

**E:** anti-TF-AK

### 3.4 Fibrinbildung und mikrovaskuläre Thrombose im orthotopen und transgenen Tiermodell

*In vivo* wurde die Fibrinbildung in der Leber mittels Carstairs' Staining analysiert. Die hepatischen Gefäße wurden in kleine Gefäße mit einem Durchmesser von  $<25 \mu\text{m}$  (Sinusoide), mittelgroße Gefäße ( $25 \mu\text{m}$ - $100 \mu\text{m}$ ) und große Gefäße mit einem Durchmesser  $>100 \mu\text{m}$  unterteilt.

Das Ausmaß des Verschlusses der Lebergefäße wurde pro Leberschnitt in 10 konsekutiven Gesichtsfeldern in allen sichtbaren Gefäßen bei 20-facher Vergrößerung des Objektivs ausgemessen und folgendermaßen kategorisiert:  $<10 \%$  Okklusion (keine Okklusion),  $10 \%$ - $70 \%$  Okklusion (partielle Okklusion) und  $>70 \%$  Okklusion (vollständige Okklusion=Gefäßthrombose).

Im orthotopen Modell wurde bei der Untersuchung der Sinusoide in allen Versuchsreihen die Bildung von Mikrogefäßthrombosen deutlich (Abb. 23 A-C, Abb. 35 A-C, Abb. 36 B-I). Nach der orthotopen Injektion von L3.6pl-Zellen wurden, ähnlich wie bei unbehandelten WT-Mäusen (Abb. 23 A, Abb. 36 A), nur wenige Mikrogefäßthrombosen beobachtet (Abb. 23 A, Abb. 35 A, Abb. 36 B). Zu den meisten Mikrogefäßthrombosen kam es nach der Injektion von L3.6pl-MP. Mit steigender Konzentration an injizierten L3.6pl-MP stieg auch das Ausmaß der Gefäßokklusion an (Abb. 23 A, B, Abb. 35 B, C, F, Abb. 36 C, F, G). Auch die Injektion von L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP (bzw. FG-Zellen plus FG-MP) induzierte Mikrogefäßthrombosen, insbesondere die Verabreichung von L3.6pl-Zellen plus  $3 \times 200 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP (Abb. 23 A, C, Abb. 35 C, Abb. 36 D, E, H). Rivaroxaban verhinderte die durch Karzinom-MP induzierten Mikrogefäßthrombosen (Abb. 23 C, Abb. 36 I).

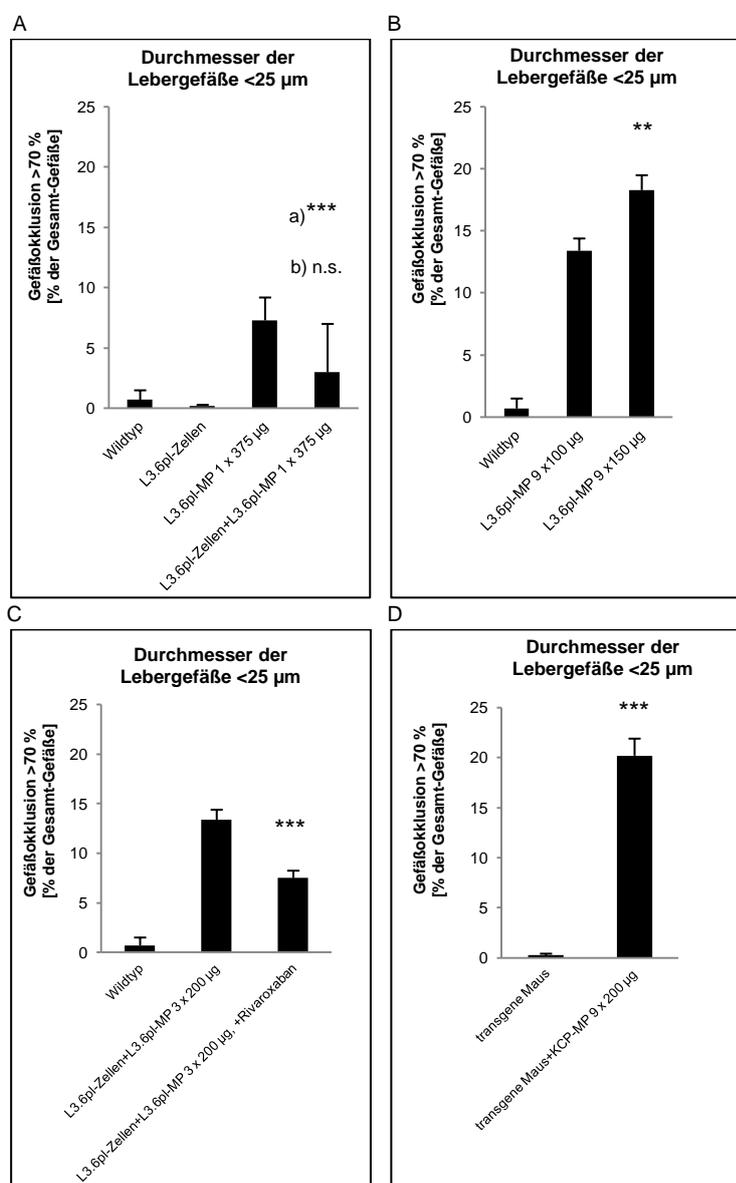
Nach der Injektion von L3.6pl-Zellen alleine wurde, ähnlich wie bei unbehandelten WT-Mäusen (Abb. 24 A, Abb. 25 A, Abb. 36 A), kein Verschluss von mittelgroßen und großen Lebergefäßen induziert (Abb. 24 A, Abb. 25 A, Abb. 35 F, K, Abb. 36 B). Diese Lebergefäße waren nach der Injektion von  $9 \times 100 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP bzw.  $9 \times 150 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP zum Teil verschlossen (Abb. 24 B, Abb. 25 B, Abb. 36 F, G), nicht aber nach der Injektion von  $1 \times 375 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP (Abb. 24 A, Abb. 25 A, Abb. 35 G, L, Abb. 36 C). Die Injektion von L3.6pl-Zellen plus den entsprechenden MP (bzw. von FG-Zellen plus FG-MP) in sowohl niedriger als auch hoher Konzentration induzierte die vollständige Okklusion von großen und mittelgroßen Lebergefäßen (Abb. 24 A, C, Abb. 25 A, C, Abb. 35 H, M, Abb. 36 D, E, H), jedoch teils in geringerem Ausmaß als die Injektion von hohen Dosen an L3.6pl-MP alleine (Abb. 24 B, Abb. 25 B, Abb. 36 G). Nach Gabe von Rivaroxaban kam es zu einer deutlichen Reduktion der Thrombosierung in mittelgroßen und großen Lebergefäßen (Abb. 24 C, Abb. 25 C, Abb. 36 I).

Mit Ausnahme der Injektion von L3.6pl-Zellen plus 3 x 200 µg L3.6pl-MP +/- Rivaroxaban (21 Tage Versuchsdauer) erfolgten alle oben erwähnten Analysen nach insg. 56 Tagen Versuchsdauer.

Auch in den transgenen Mäusen wurden nach der Injektion von KCP-MP verstärkt Mikrogefäßthrombosen in der Leber beobachtet (Abb. 23 D, Abb. 35 D, E, Abb. 36 J, K).

Die vollständige Okklusion der mittelgroßen Gefäße stieg nach Injektion von KCP-MP hingegen nicht an (Abb. 24 D, Abb. 35 I, J, Abb. 36 J, K). Große Gefäße waren bei transgenen Mäusen nicht okkludiert (Abb. 25 D, Abb. 35 N, Abb. 36 J). Nach Gabe von 9 x 200 µg KCP-MP kam es jedoch auch zur Thrombusbildung in großen Gefäßen (Abb. 25 D, Abb. 35 O, Abb. 36 K).

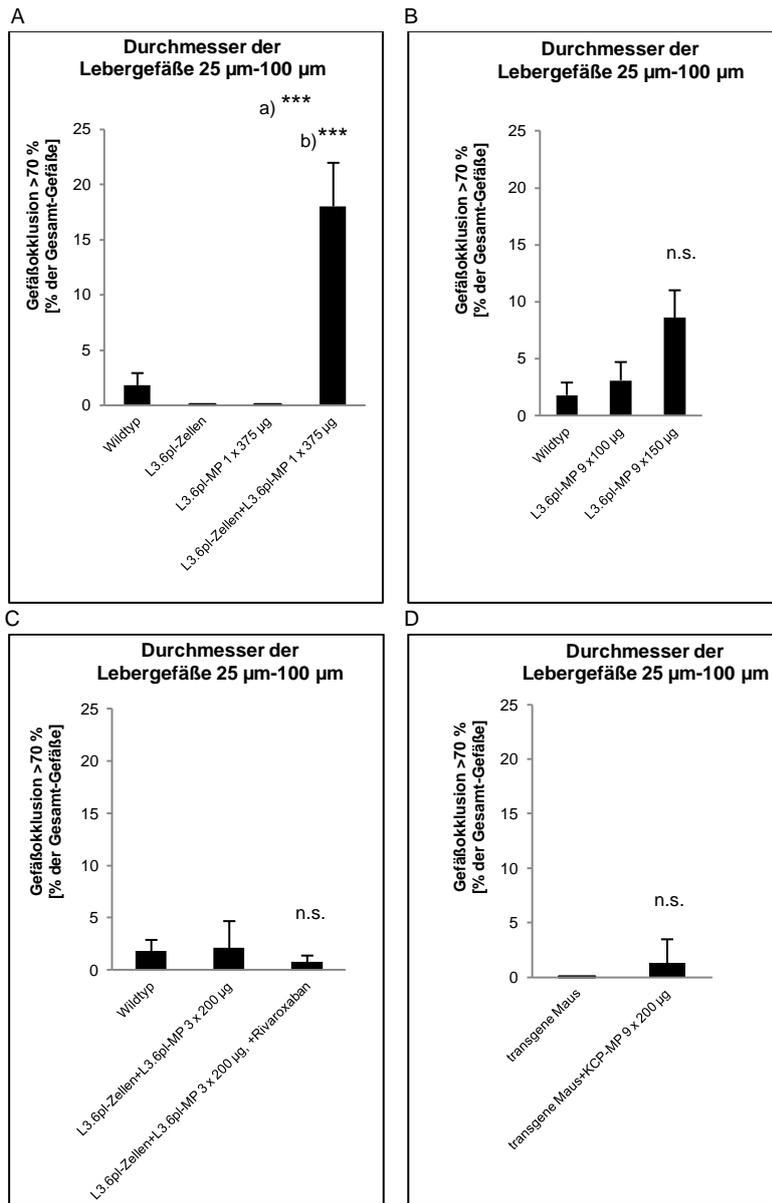
Die Lebern der transgenen Mäuse wurden nach 56 Tagen Versuchsdauer, die Lebern der transgenen Mäuse plus Injektion von KCP-MP nach 54 Tagen analysiert.



#### Abb. 23: Bildung von Mikrogefäßthrombosen im orthotopen und transgenen Mausmodell

Die Quantifizierung der Mikrogefäßthrombosen in der Leber erfolgte im Carstair's Staining. Versuchsdauer Abb. A, B: 56 d, Abb. C: 21 d, Abb. D: transgene Maus 56 d, transgene Maus+KCP-MP: 54 d Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, n.s.=nicht signifikant, \*\* p=<0,01, \*\*\* p=<0,001 gegenüber:

- A: a) L3.6pl-Zellen,  
b) L3.6pl-MP 1 x 375 µg  
B: L3.6pl-MP 9 x 100 µg  
C: L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg  
D: transgene Maus



**Abb. 24: Bildung von Thromben in Gefäßen mit einem Durchmesser von 25 µm-100 µm im orthotopen und transgenen Mausmodell**

Mittels Carstair's Staining wurden die Thrombosen in Gefäßen von 25 µm-100 µm Durchmesser in der Leber quantifiziert.

Versuchsdauer Abb. A, B: 56 d, Abb. C: 21 d, Abb. D: transgene Maus 56 d, transgene Maus+KCP-MP: 54 d

Mittelwerte ± SEM, n=4, n.s.=nicht signifikant, \*\*\* p<0,001 gegenüber:

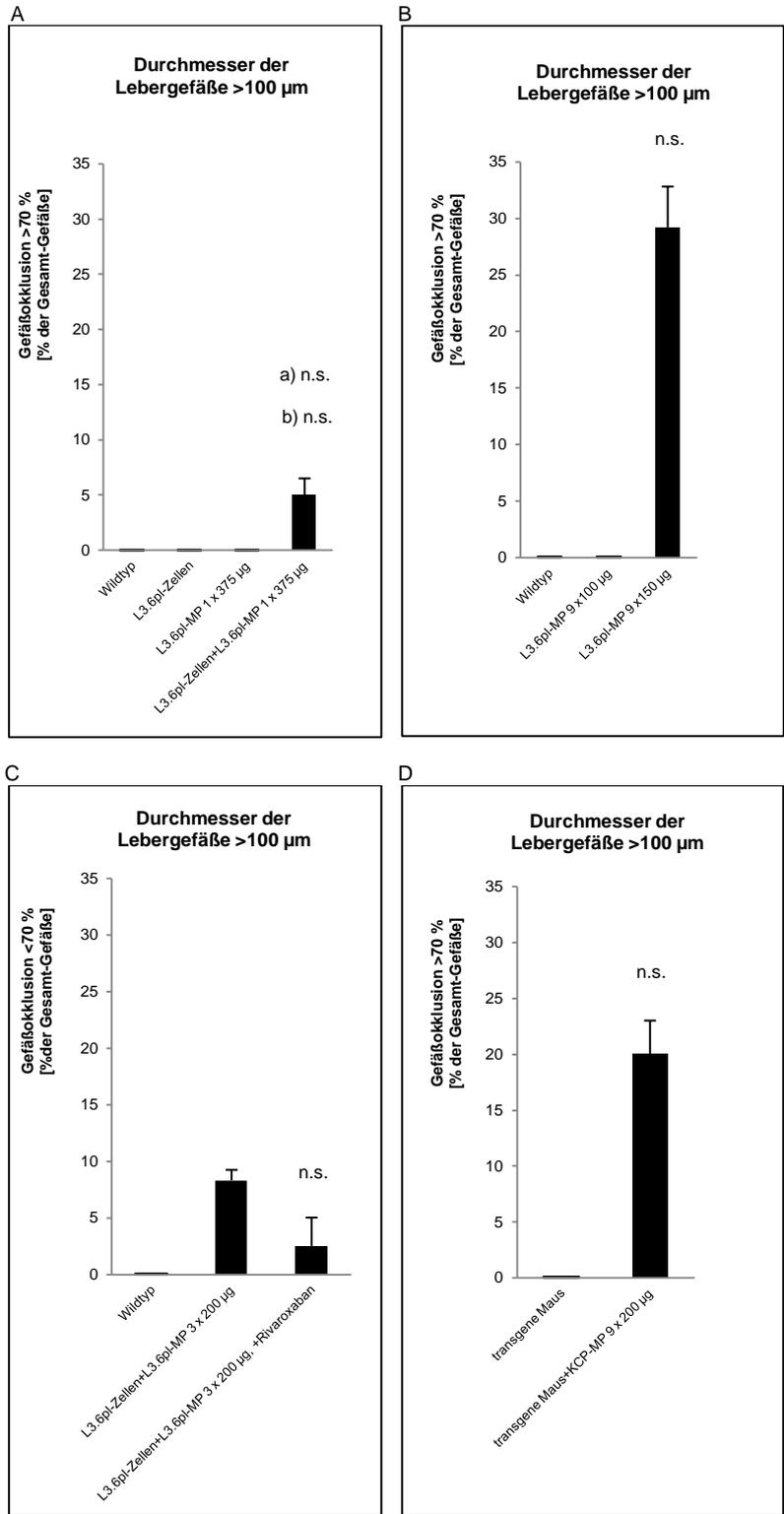
**A:** a) L3.6pl-Zellen,

b) L3.6pl-MP 1 x 375 µg

**B:** L3.6pl-MP 9 x 100 µg

**C:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg

**D:** transgene Maus



**Abb. 25: Thrombusentstehung in Gefäßen mit einem Durchmesser von >100 μm im orthotopen und transgenen Mausmodell**

Die Quantifizierung der Thrombosen in Gefäßen von >100 μm Durchmesser in der Leber wurde mithilfe des Carstairs Stainings durchgeführt.

Versuchsdauer Abb. A, B: 56 d, Abb. C: 21 d, Abb. D: transgene Maus 56 d, transgene Maus+KCP-MP: 54 d Mittelwerte ± SEM, n=4, n.s.=nicht signifikant gegenüber:

**A:** a) L3.6pl-Zellen,

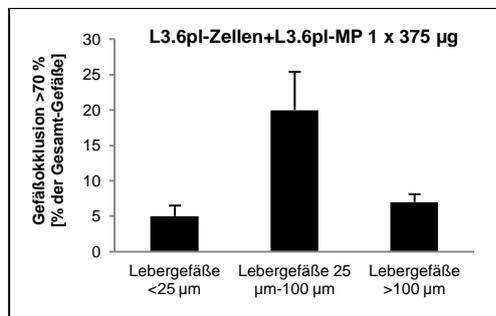
b) L3.6pl-MP 1 x 375 μg

**B:** L3.6pl-MP 9 x 100 μg

**C:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 μg

**D:** transgene Maus

Die mittels Carstair's Färbung gewonnenen Ergebnisse wurden schließlich mit Experimenten verglichen, in denen die Fibrinbildung der Lebergefäße mittels Fibrin/Fibrinogen-Färbung analysiert wurde (Abb. 26, Abb. 37). Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse beider Methoden eng miteinander übereinstimmten.



**Abb. 26: Gefäßokklusion in der Leber durch karzinomatöse MP im Fibrin/Fibrinogen-Staining**

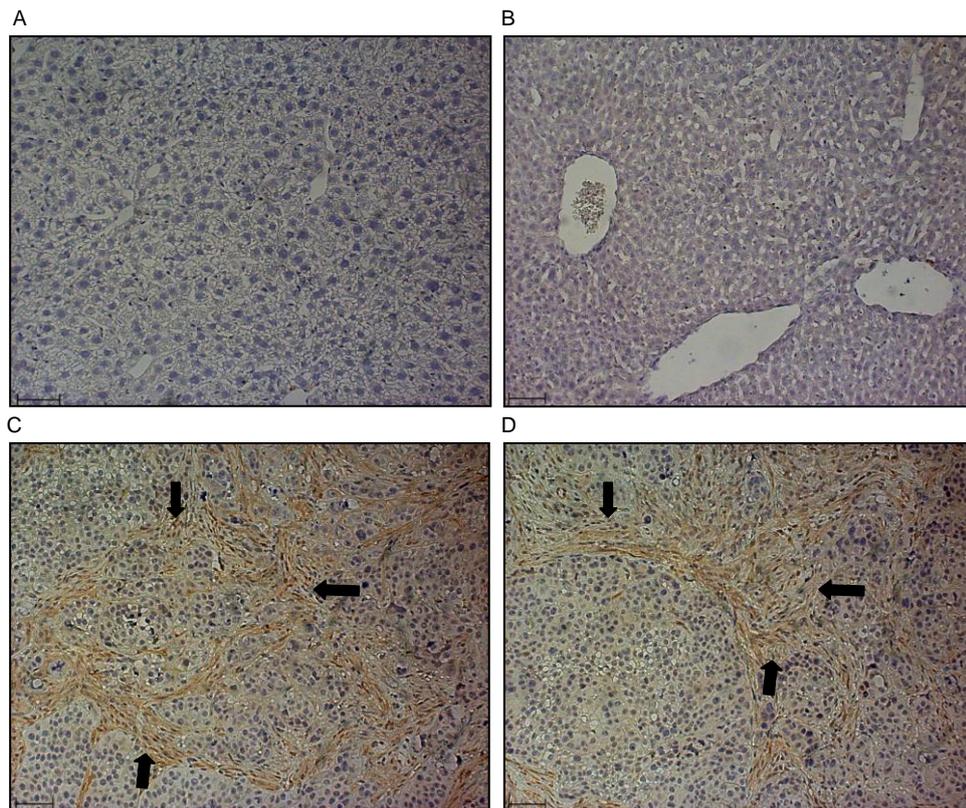
Die Lebern der Mäuse nach Injektion von L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg wurden in einem Fibrin/Fibrinogen-Staining gefärbt und der Gefäßverschluss >70 % durch Fibrin/Fibrinogen quantifiziert. n=4, Mittelwerte ± SEM

### 3.5 MP-induzierte Bildung prämetastatischer Nischen

Um zu prüfen, ob Tumor-MP die Bildung von prämetastatischen Nischen beeinflussen, wurde analysiert, ob die MP folgende, für prämetastatische Nischen typische, Parameter verändern: die Bildung von Myofibroblasten sowie die Infiltration von Neutrophilen in der Leber.

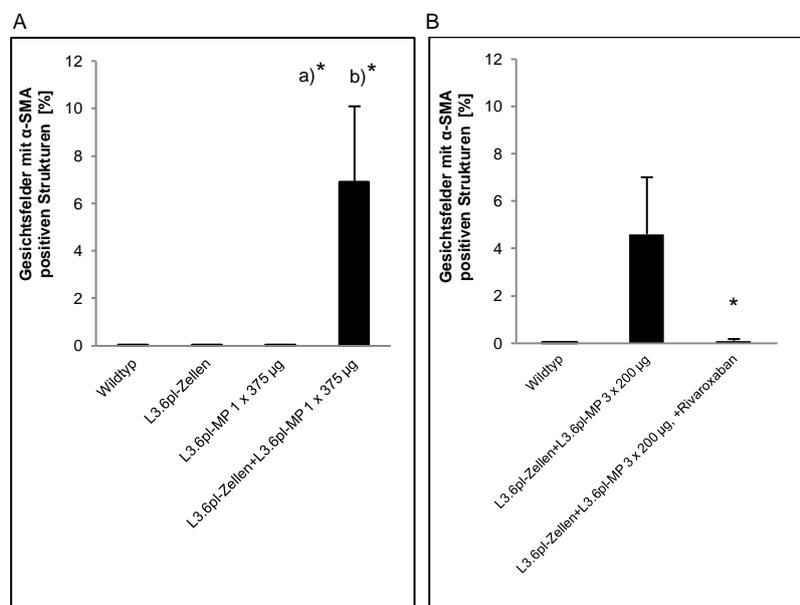
#### 3.5.1 α-SMA

Um die Bildung von Myofibroblasten zu prüfen, wurden die Lebern der Versuchstiere des orthotopen und transgenen Mausmodells auf das Vorkommen von α-SMA-positiven Strukturen untersucht. Während in Kontrolltieren und mit Tumorzellen alleine behandelten Tieren (orthotopes Modell) keine α-SMA-positiven Strukturen detektierbar waren (Abb. 27 A, B, Abb. 28 A), war nach zusätzlicher Gabe der Tumor-MP eine deutliche α-SMA-Färbung erkennbar (Abb. 27 C, D, Abb. 28 A, B). Nach Verabreichung von Rivaroxaban sank die Anzahl der α-SMA-positiven Strukturen in der Leber (Abb. 28 B). Die Analysen wurden nach 56 Tagen Versuchsdauer durchgeführt, bei der Injektion von L3.6pl-Zellen plus 3 x 200 µg L3.6pl-MP ± Rivaroxaban nach 21 Tagen. Im transgenen Mausmodell wurden weder bei transgenen Mäusen (Versuchsdauer 56 Tage) noch bei transgenen Mäusen nach Verabreichung von KCP-MP (Versuchsdauer 54 Tage) positive Strukturen sichtbar.



**Abb. 27: Darstellung von Myofibroblasten in der Leber**

Schwarze Pfeile kennzeichnen  $\alpha$ -SMA-positive Strukturen. Versuchsdauer Abb. A-C: 56 d, Abb. D: 21 d  
**A:** WT, **B:** L3.6pl-Zellen, **C:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375  $\mu$ g, **D:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200  $\mu$ g,  
 Größenindikator=50  $\mu$ m



**Abb. 28: Quantifizierung der  $\alpha$ -SMA-positiven Strukturen in der Leber**

In den angegebenen Versuchsgruppen wurden die Gesichtsfelder mit  $\alpha$ -SMA-positiven Strukturen in der Leber gezählt und in Prozent der Gesamtzahl der Gesichtsfelder pro Leberschnitt angegeben. Die Versuchsdauer betrug bei den Gruppen in Abb. A 56 d, bei den Gruppen in Abb. B 21 d.

Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \* p=<0,05 gegenüber:

**A:** a) L3.6pl-Zellen,

b) L3.6pl-MP 1 x 375  $\mu$ g

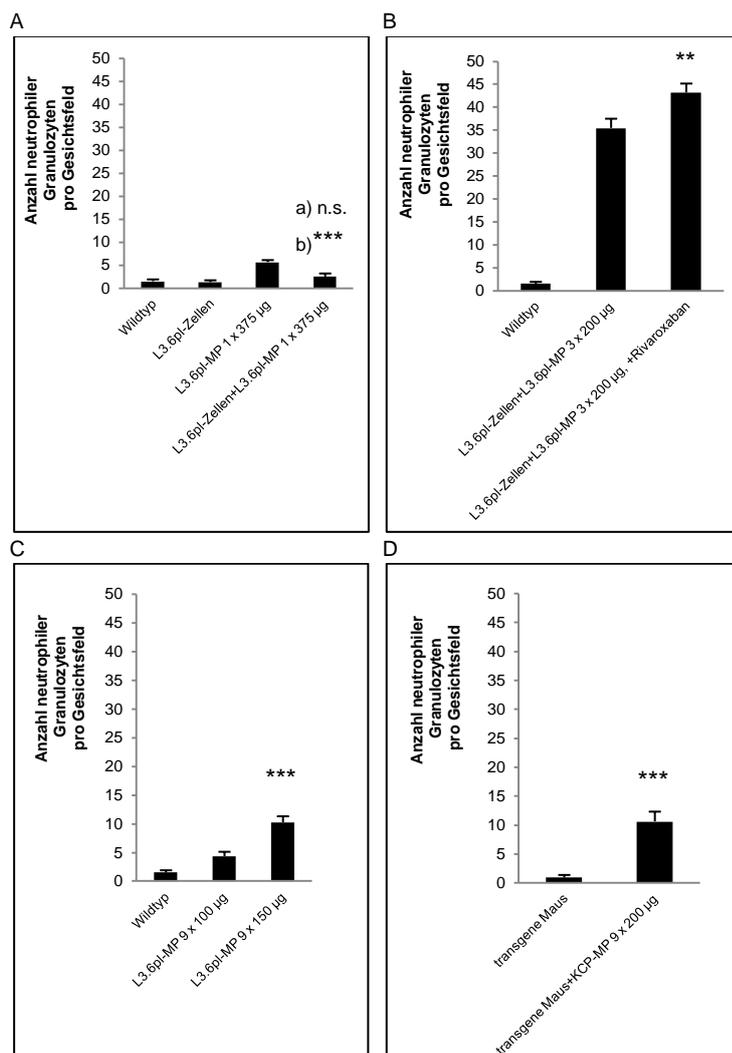
**B:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200  $\mu$ g

### 3.5.2 Neutrophile Granulozyten

Bei der Färbung der Neutrophilen in den Lebern zeigte sich, dass in Tieren, die mit Karzinomzellen plus Tumor-MP in niedriger Dosis (1 x 375 µg L3.6pl-MP) behandelt worden waren, die Infiltration gegenüber den WT-Tieren und gegenüber denjenigen Tieren, welchen L3.6pl-Zellen alleine injiziert worden waren, nicht verändert war (Abb. 29 A, Abb. 38 A, B). Die Lebensdauer in den erwähnten Tiergruppen betrug 56 Tage. Nach Injektion von L3.6pl-Zellen plus einer höheren Menge an MP (3 x 200 µg L3.6pl-MP) waren die gewebeassoziierten Neutrophilen erhöht (Abb. 29 B, Abb. 38 E). Interessanterweise stieg durch die Verabreichung von Rivaroxaban die Anzahl der Neutrophilen an (Abb. 29 B, Abb. 38 F). Hier wurden die Lebern nach 21 Tagen Versuchsdauer analysiert. Hohe Gewebespiegel an neutrophilen Granulozyten wurden auch nach alleiniger Injektion von hohen Dosen an L3.6pl-MP (9 x 100 µg L3.6pl-MP bzw. 9 x 150 µg L3.6pl-MP) beobachtet (Abb. 29 C, Abb. 38 D). Die Versuchsdauer lag bei 56 Tagen.

Im transgenen Modell wurden im Vergleich zu unbehandelten transgenen Mäusen nach Injektion von KCP-MP ebenfalls mehr Neutrophile pro Gesichtsfeld in der Leber gezählt (Abb. 29 D, Abb. 38 G, H). Die Lebern wurden bei transgenen Tieren nach 56 Tagen Versuchsdauer untersucht, bei transgenen Tieren, welchen KCP-MP injiziert worden waren, nach 54 Tagen.

Intravasal wurden unter allen Bedingungen nur sehr wenige Neutrophile gefunden (Daten nicht gezeigt).



### Abb. 29: Quantifizierung von neutrophilen Granulozyten in der Leber

In den Mausebern aller Versuchsreihen wurden Ly6G (+) - neutrophile Granulozyten gezählt. Die Versuchsdauer betrug in Abb. A 56 d, in Abb. B 21 d, in Abb. C 56 d und in Abb. D bei transgenen Mäusen 56 d, bei transgenen Mäusen nach Injektion von KCP-MP 54 d. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, n.s.=nicht signifikant, \*\* p=<0,01, \*\*\* p=<0,001 gegenüber:

**A:** a) L3.6pl-Zellen, b) L3.6pl-MP 1 x 375 µg

**B:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg

**C:** L3.6pl-MP 9 x 100 µg

**D:** transgene Maus

## 3.6 Metastasierung des Pankreaskarzinoms im orthotopen und transgenen Tiermodell

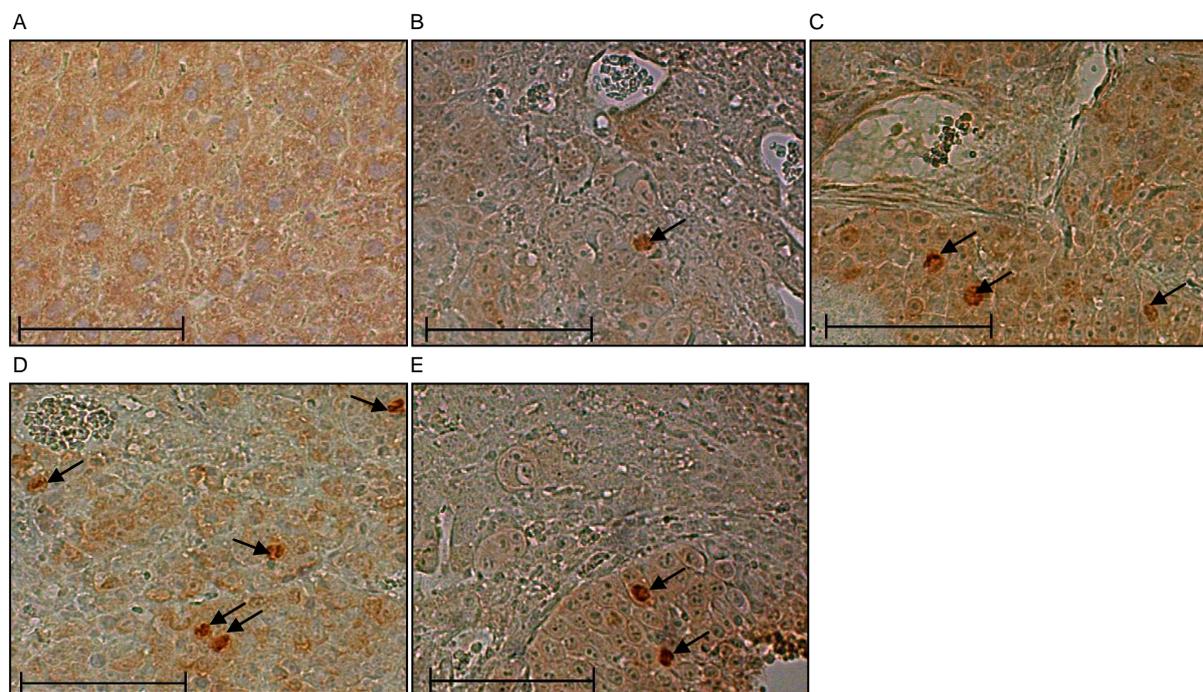
### 3.6.1 Ki67-Färbung

Zur Analyse mikroskopisch sichtbarer Metastasen wurde eine Ki67-Färbung von Leberschnitten der Mäuse der Versuchsgruppen des orthotopen Mausmodells durchgeführt. Mittels der Ki67-Färbung werden proliferierende Zellkerne und somit auch Tumorzellen dargestellt. Der hierbei verwendete anti-Ki67-AK detektierte spezifisch humane Zellen ohne mit Mausstrukturen kreuzzureagieren. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass positiv angefärbte Zellkerne tatsächlich Tumorzellen darstellen und auf die injizierten humanen karzinomatösen Zellen bzw. MP zurückzuführen waren.

Nach Injektion von L3.6pl-Zellen wurden wenige Ki67-positive Zellkerne gefunden (Abb. 30 B, Abb. 31 A), während in den Lebern von WT-Mäusen keine Ki67-positiven Nuklei detektiert wurden (Abb. 30 A, Abb. 31 A). Die meisten Ki67-positiven Zellkerne wurden nach Injektion von L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP gefunden (Abb. 30 C, D, Abb. 31 A, B). Die Zahl der

positiven Zellkerne stieg umso mehr, je höhere Mengen an L3.6pl-MP injiziert wurden (Abb. 30 D, Abb. 31 B). Wurde Rivaroxaban vor der Injektion von L3.6pl-MP verabreicht, sank die Zahl der Ki67-positiven Zellkerne deutlich ab (Abb. 30 E, Abb. 31 B).

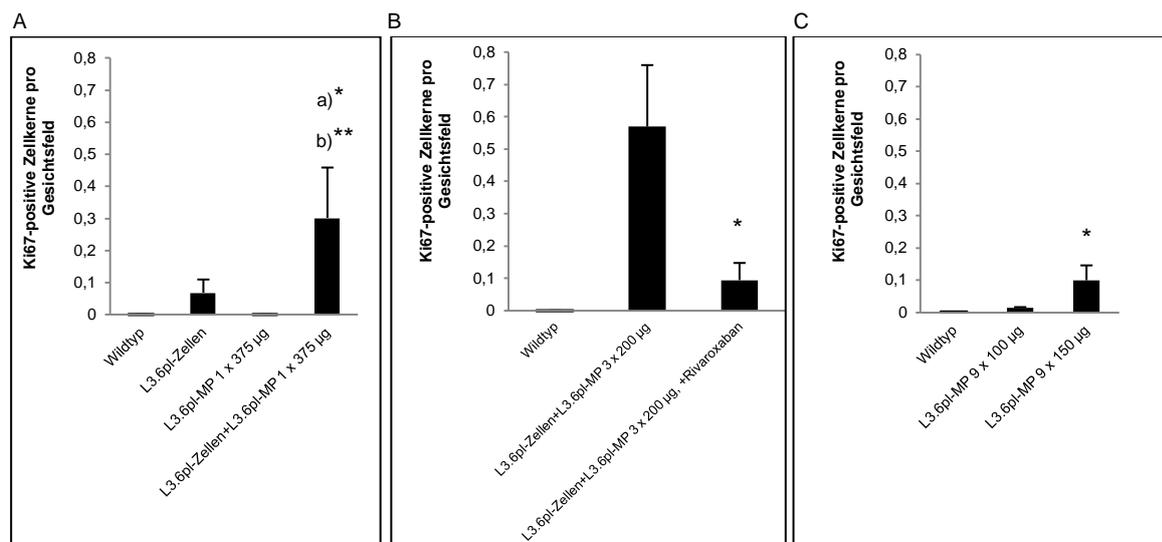
Wurden den Mäusen L3.6pl-MP alleine gespritzt, so konnten bei niedrigen MP-Mengen (375 µg) keine Ki67-positiven Zellkerne in der Leber gefunden werden (Abb. 31 A). Nach Injektion von hohen Mengen an L3.6pl-MP wurden jedoch Ki67-positive Zellkerne detektiert (Abb. 31 C). Die Lebern wurden nach insg. 56 Tagen Versuchsdauer analysiert. Die Lebern der Tiere in den Versuchsgruppen L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, mit und ohne Verabreichung von Rivaroxaban, wurden nach 21 Tagen Versuchsdauer untersucht.



**Abb. 30: Zellkerne mit Positivität für humanes Ki67 in Leberschnitten**

Von den Leberschnitten der Tiere des orthotopen Modells wurde eine Färbung zur Detektion von Ki67-positiven Zellkernen durchgeführt. Versuchsdauer Abb. A-C: 56 d, Abb. D, E: 21 d

**A:** WT, **B:** L3.6pl-Zellen, **C:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg, **D:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, **E:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, +Rivaroxaban, Größenindikator=100 µm



**Abb. 31: Quantifizierung von Ki67-positiven Zellkernen in der Leber**

In diversen Versuchsansätzen wurden L3.6pl-Zellen bzw. -MP injiziert. Nach Versuchsende wurden in den Lebern Ki67-positive Zellkerne detektiert. Die Versuchsdauer betrug in den Versuchsgruppen der Abb. A und C 56 d, in den Gruppen der Abb. B 21 d.

Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  gegenüber:

**A:** a) L3.6pl-Zellen, b) L3.6pl-MP 1 x 375  $\mu$ g

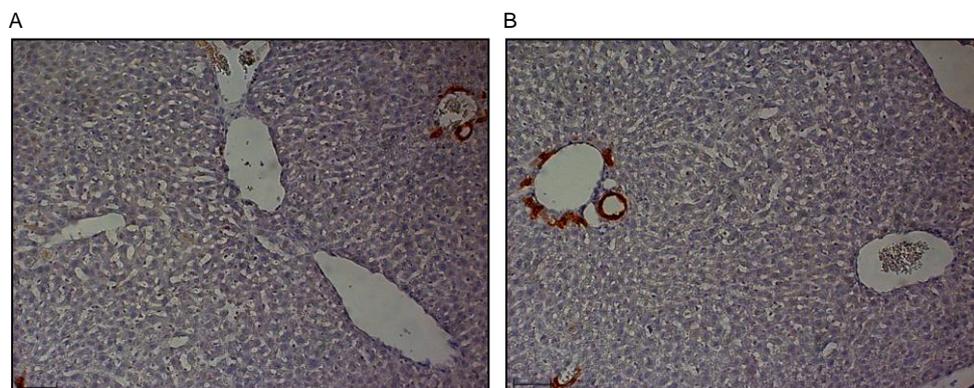
**B:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200  $\mu$ g

**C:** L3.6pl-MP 9 x 100  $\mu$ g

### 3.6.2 Cytokeratin 19-Färbung

Um mikroskopisch sichtbare Metastasen im transgenen Mausmodell zu detektieren, wurde eine Cytokeratin 19-Färbung der Leberschnitte durchgeführt. Diese Färbung wurde verwendet, da es in der Ki67-Färbung nicht möglich war murine nicht-karzinomatöse Strukturen von murinen karzinomatösen Strukturen, welche von den transgenen Mäusen oder KCP-MP stammten, zu unterscheiden.

In den Lebern der transgenen Mäuse konnten, nach insg. 56 Tagen Versuchsdauer, keine Cytokeratin 19-positiven Strukturen gefunden werden (Abb. 32 A). Ebenfalls keine Cytokeratin 19-positiven Strukturen wiesen nach 54 Tagen Versuchsdauer die Lebern der transgenen Mäuse auf, welchen KCP-MP injiziert worden waren (Abb. 32 B).



**Abb. 32: Cytokeratin 19-Färbung der Leberschnitte des transgenen Modells**

Die Lebern der transgenen Mäuse wurden mittels der immunhistochemischen Cytokeratin 19-Färbung auf metastatische Strukturen untersucht. Die Versuchsdauer betrug bei transgenen Mäusen 56 d, bei transgenen Mäusen nach KCP-MP-Injektion 54 d.

**A:** transgene Maus, **B:** transgene Maus+KCP-MP 9 x 200  $\mu$ g

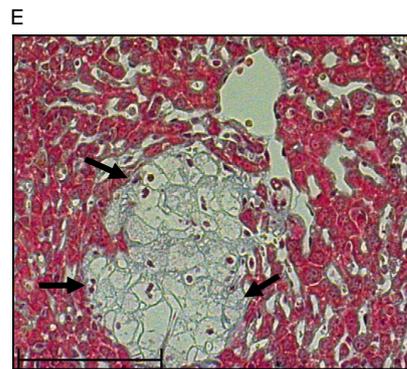
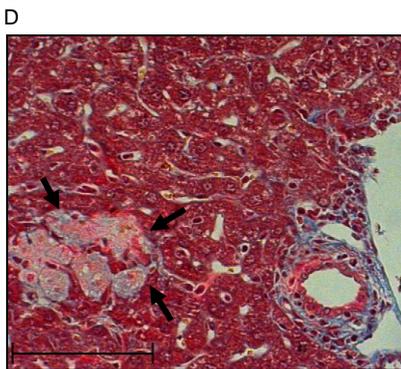
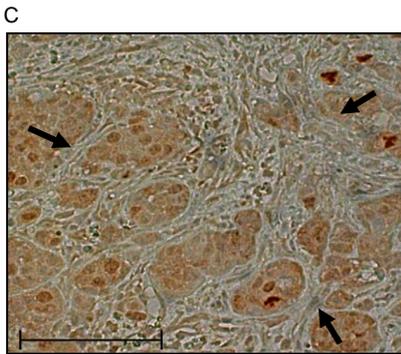
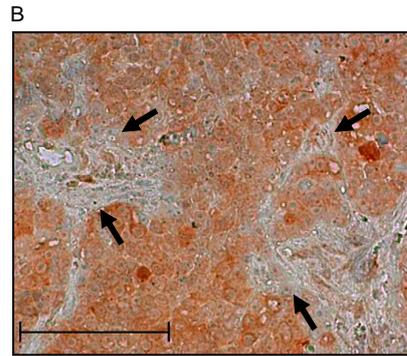
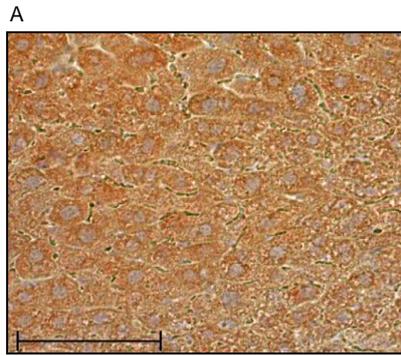
Größenindikator=50  $\mu$ m

### 3.6.3 Morphologisch veränderte Leberstrukturen

Bei der Färbung der Lebern wurden morphologisch veränderte, metastatische Strukturen in den Lebern der Mäuse nach Injektion von L3.6pl-Zellen sowie nach der Injektion von L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP und bei transgenen Mäusen sowie bei transgenen Mäusen nach Injektion von KCP-MP sichtbar.

Die Quantifizierung der Gesichtsfelder mit diesen Strukturen zeigte das erhöhte Auftreten von solchen Herden nach Injektion von L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP (Abb. 33 C, Abb. 34 A, B) im Vergleich zu dem Auftreten dieser metastatischen Herde nach der Injektion von L3.6pl-Zellen (Abb. 33 B, Abb. 34 A). Nach Injektion von L3.6pl-MP alleine wurden keine morphologisch veränderten Strukturen gefunden (Abb. 33 A, Abb. 34 A). Die Versuchsdauer betrug 56 Tage, bei den Tieren der Versuchsgruppen L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, mit und ohne Verabreichung von Rivaroxaban, 21 Tage.

Auch bei den transgenen Mäusen, welche mit KCP-MP behandelt worden waren (54 Tage Versuchsdauer), fiel im Vergleich zu unbehandelten transgenen Mäusen (56 Tage Versuchsdauer) ein Anstieg der morphologisch veränderten Gesichtsfelder in der Leber auf (Abb. 33 D, E, Abb. 34 C).



**Abb. 33: Darstellung von metastatischen Strukturen in der Leber**

A-C: morphologisch veränderte Gesichtsfelder im Ki67-Staining (orthotopes Modell), D-E: morphologisch veränderte Gesichtsfelder im Carstairs Staining (transgenes Modell). Die Pfeile zeigen die veränderten metastatischen Strukturen an.

Versuchsdauer Abb. A-D: 56 d,

Abb. E: 54 d

A: L3.6pl-MP 1 x 375 µg

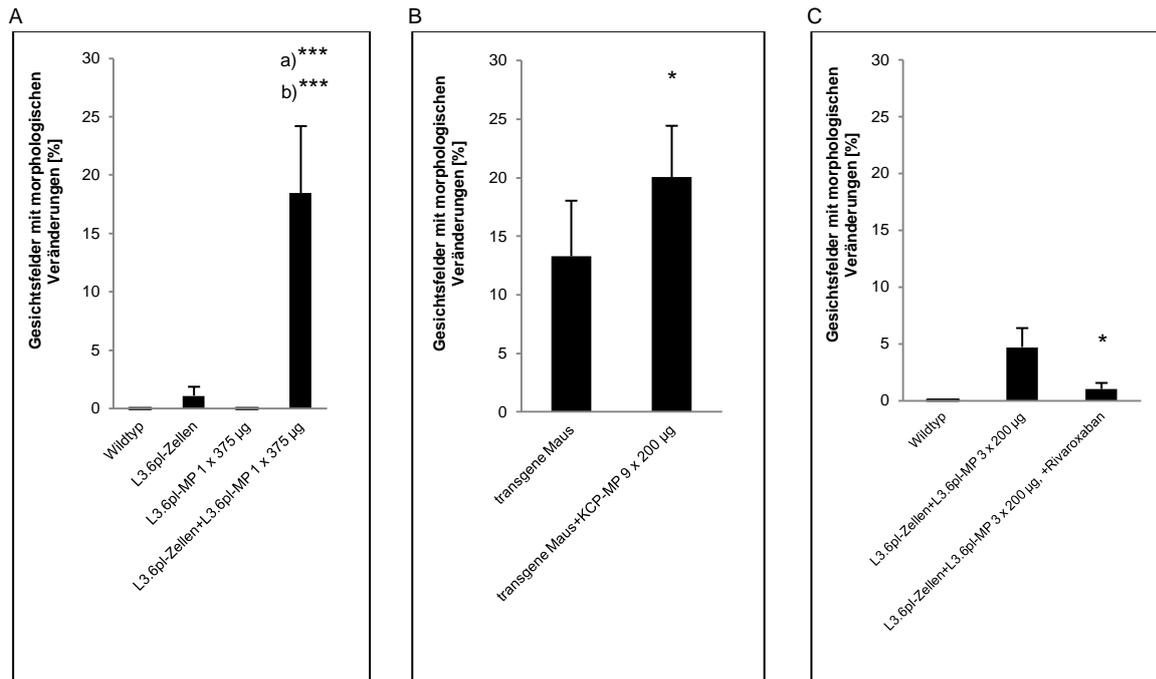
B: L3.6pl-Zellen

C: L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg

D: transgene Maus

E: transgene Maus+KCP-MP 9 x 200 µg

Größenindikator=100 µm



**Abb. 34: Quantifizierung von morphologisch veränderten Gesichtsfeldern in der Leber**

Nacktmäusen wurden in verschiedenen Experimenten L3.6pl-Zellen bzw. L3.6pl-MP und transgenen Mäusen KCP-MP verabreicht. Die Versuchsdauer betrug in den Gruppen der Abb. A 56 d, der Abb. B 21 d, der Abb. C bei transgenen Mäusen 56 d und bei transgenen Mäusen+KCP-MP 54 d. Nach Versuchsende wurden die Gesichtsfelder mit metastatischen Strukturen in der Leber gezählt und in Prozent der Gesamtzahl der Gesichtsfelder pro Leberschnitt angegeben. Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4, \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber:

**A:** a) L3.6pl-Zellen, b) L3.6pl-MP 1 x 375 µg

**B:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg

**C:** transgene Maus

## 4. Diskussion

### 4.1 Mausmodelle des Pankreaskarzinoms

Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Pankreaskarzinom-Modelle analysiert, ein orthotopes sowie ein transgenes Modell. Mittels der hoch metastatischen L3.6pl-Zelllinie kann orthotop eine Form des Pankreaskarzinoms etabliert werden, die eine frühzeitige Metastasierung induziert und damit charakteristisch ist für das hohe metastatische Potential dieses Karzinomtyps. Das transgene Pankreaskarzinommodell, das auf Kras-Mutationen und der p53-Inaktivierung beruht, eignet sich ebenso für die Analyse des Pankreaskarzinoms im Tiermodell, da Mutationen des Kras-Gens und eine Deletion des p53-Proteins zu den häufigsten Mutationen des Pankreaskarzinoms zählen (Lesina *et al.* 2011).

Da in der vorliegenden Arbeit Pankreaskarzinomzellen und -MP dieser sehr unterschiedlichen Tumormodelle eingesetzt wurden, sind die Gemeinsamkeiten in der Gerinnungsaktivierung und Metastasierung, welche in beiden Modellen festgestellt wurden (Kap. 4.2 - 4.7), von besonderem Stellenwert.

### 4.2 Aktivierung der Koagulation durch Pankreaskarzinomzellen und -Mikrovesikel *in vitro*

Im ersten Teil der Dissertation wurde untersucht, inwiefern Pankreaskarzinomzellen sowie -Mikrovesikel (d.h. MP und Exosomen) die Blutgerinnung aktivieren. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Pankreaskarzinomzellen und -MP generell prothrombogen wirken. Im Gegensatz zu MP weisen Exosomen eine schwächere prokoagulatorische Wirkung auf.

In Assays der Vollblutgerinnung kam es bei tumorösen Zellen und Mikrovesikeln zur gesteigerten Fibrinbildung (Abb. 6). Analysen der Faktor Xa-Bildung zeigten darüber hinaus, dass die Gerinnungsaktivierung bei den Zellen und MP des transgenen und des orthotopen Pankreaskarzinommodells strikt von Faktor X abhängig ist (Abb. 7, Abb. 8, Abb. 13 C). Die Aktivierung von Faktor X kann prinzipiell über den TF/Faktor VIIa-Komplex sowie durch den intrinsischen Tenase-Komplex (bestehend aus Faktor IXa, Faktor VIII, Calcium und Phospholipiden) erfolgen.

Die Bildung von Thromben wurde zudem nach Zugabe von L3.6pl-MP zu Vollblut im Flusskammermodell analysiert (Kap. 3.3.1). Im Gegensatz zur Kontrolle induzierten die karzinomatösen MP Thromben, in welchen MP eingeschlossen waren. Dies deutet darauf hin, dass MP unter Flussbedingungen in einem *ex vivo* Modell maßgeblich an der Fibrinbildung beteiligt sind.

#### 4.2.1 Aktivierung des extrinsischen Blutgerinnungsweges durch Pankreaskarzinomzellen und -MP

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass Zellen und MP des orthotopen Pankreaskarzinommodells die Fibrinbildung TF-abhängig aktivieren und somit der extrinsische Blutgerinnungsweg gestartet wird (Abb. 11, Abb. 12). In der Tat erfolgte *in vitro* in Anwesenheit des anti-TF-AK eine nahezu vollständige Inhibition der Gerinnung. Somit ist TF für die prokoagulatorische Wirkung der Zellen und MP des orthotopen Pankreaskarzinommodells entscheidend verantwortlich. Demzufolge kommt dem sog. Cancer Procoagulant (Gordon *et al.* 1981), das TF- und Faktor IX- unabhängig den Faktor X aktiviert, möglicherweise nur eine geringere Rolle für die prokoagulatorische Wirkung im orthotopen Modell zu.

Bereits in früheren Untersuchungen wurde TF als eines der wichtigsten prothrombogenen Proteine der Pankreaskarzinomzellen und -MP charakterisiert (Mackman *et al.* 2004, Tesselaar *et al.* 2007, Zwicker *et al.* 2009). Zusätzlich wurde in den hier beschriebenen Experimenten bei den MP des orthotopen Modells eine partielle Abhängigkeit von Faktor VII beobachtet, dem Liganden von TF, was die Abhängigkeit vom extrinsischen Gerinnungssystem bestätigt (Abb. 13 A). Wang *et al.* (2012) beschreiben die Expression von TF auf zwei Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie -MP. Allerdings zeigen sie, dass die Blutgerinnung durch den TF der Karzinomzellen und weniger durch TF-exprimierende MP aktiviert wird. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Versuchen der vorliegenden Arbeit, in welchen die Blutgerinnung zwar durch den TF der Tumorzellen, jedoch zu einem erheblichen Teil auch durch den TF der MP des Pankreaskarzinoms aktiviert wurde. Diese Unterschiede könnten darauf zurückzuführen sein, dass für die Untersuchungen unterschiedliche Zelllinien verwendet wurden.

Im Allgemeinen werden auch Exosomen prokoagulatorische Eigenschaften zugeschrieben (van Doormaal *et al.* 2009). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, da es zu einer Fibrinbildung durch Exosomen kam (Abb. 6). In einigen Studien wird die Expression von TF auf Exosomen beschrieben (Garnier *et al.* 2012, Park *et al.* 2012). Hingegen war in den Experimenten der vorliegenden Arbeit keine TF-Abhängigkeit der prokoagulatorischen Wirkungen der Exosomen festzustellen (Abb. 12 B). Auch diese Unterschiede zu früheren Untersuchungen sind vermutlich durch die unterschiedlichen verwendeten Zelllinien bedingt. Bei den Zellen und MP des transgenen Modells führte eine Inhibition von TF zu keiner Beeinträchtigung der Gerinnung (Abb. 11, Abb. 12 A). Somit könnte in diesem Modell Faktor X in der Tat direkt aktiviert werden, z.B. durch das Cancer Procoagulant (s.o.). Im Gegensatz zu TF war keine nennenswerte Beteiligung von Faktor XII an der Gerinnungsaktivierung durch Tumorzellen und -MP beider Pankreaskarzinommodelle festzustellen, so dass davon

auszugehen ist, dass das Kontaktaktivierungssystem für die Tumor-induzierte Fibrinbildung von geringer Bedeutung ist (Abb. 9, Abb. 10).

Allerdings zeigte sich im transgenen Modell (insbesondere bei KCP-MP) eine partielle Abhängigkeit von Faktor IX und Faktor XI (Abb. 13 B, D). Dies deutet darauf hin, dass es in diesem Modell möglicherweise über Thrombin (dieses aktiviert Faktor VIII, den Cofaktor für Faktor IXa, sowie Faktor XI), nicht aber über Faktor XIIIa, zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungsweges kommen kann.

#### **4.2.2 Bedeutung von Mucinen für die Blutgerinnungsaktivierung durch Pankreaskarzinomzellen und -Mikrovesikel**

Mucine werden bei diversen Karzinomen epithelialer Herkunft, so z.B. beim Mamma- und Pankreaskarzinom, überexprimiert. Laut vorangegangener Untersuchungen könnten Mucine die Gerinnung fördern (Tesselaar *et al.* 2007, Wang *et al.* 2012). In Interaktion mit P-Selectin können Mucine am Trousseau Syndrom (einer rezidivierenden superfiziellen migratorischen Thrombophlebitis) bei Krebspatienten beteiligt sein (Wahrenbrock *et al.* 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Zelllinien bzw. MP des transgenen Tiermodells das glykosylierte Transmembranprotein Muc-1 als prokoagulatorisch wirkendes Protein identifiziert (Abb. 14-16).

Hingegen war Muc-4 nicht an der Gerinnungsaktivierung durch MP beteiligt (Abb. 17). Beim Pankreaskarzinom ist zwar die Überexpression von Muc-4 und dessen Bedeutung für das Primärtumorwachstum und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms beschrieben (Singh *et al.* 2004, Ansari *et al.* 2013). Jedoch ist bislang, im Einklang zu den vorliegenden Experimenten, noch keine Assoziation zwischen der Thrombosierung und der Expression von Muc-4 festgestellt worden.

#### **4.3 Proteomanalyse von Pankreaskarzinomzellen und -MP**

Mittels Proteomanalyse wurden mehr als 350 Proteine in den Zellen bzw. MP der beiden Tiermodelle identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass in den MP Adhäsions- und Transportproteine stärker exprimiert waren als in den entsprechenden Elternzellen. Die Zellen hingegen wiesen im Verhältnis zu den jeweiligen MP eine ausgeprägtere Expression von nukleären und zytoplasmatischen, mit Transkription und Translation assoziierten Proteinen sowie ribosomalen Proteinen auf.

Interessanterweise waren aber auch in den MP bestimmte nukleäre Proteine nachweisbar, die prinzipiell an der durch MP bedingten Metastasierung und Transformation von Zellen beteiligt sein könnten (u.a. KIF 23, Kap. 3.2, Abb. 18, Abb. 19).

#### 4.4 Bildung von DVT durch MP des Pankreaskarzinoms *in vivo*

Bei Patienten mit Pankreaskarzinom werden häufig DVT diagnostiziert, welche eine zusätzliche Komplikation der Erkrankung darstellen (Khorana *et al.* 2004, Zwicker *et al.* 2007, Davila *et al.* 2008). Die Prognose für die Patienten wird durch die Bildung dieser Thrombosen deutlich verschlechtert. In einem DVT-Modell wurde die Situation, wie sie bei der Bildung der DVT bei Pankreaskarzinompatienten vorliegt, nachgebildet. Durch die Ligatur der murinen Vena cava caudalis wurde ein reduzierter Blutfluss erzeugt ohne einen nennenswerten Endothelschaden an der Vene zu verursachen. Die anschließende Injektion von Tumor-MP führte zu einer massiven Thrombusbildung in der Vena cava caudalis. Hingegen führte die Injektion von MP aus dem Blut von gesunden Blutspendern zu Thromben mit geringerem Gewicht (Abb. 21). Demzufolge wurde gezeigt, dass Tumor-MP *in vivo* DVT auslösen.

In der Literatur wurden bereits Experimente mit DVT-Mausmodellen beschrieben. Wang *et al.* (2012) beobachteten bei Mäusen mit orthotopen Pankreastumoren, welchen exogen Tumor-MP zugeführt wurden, dass es bei einer MP-Konzentration, welche 40x höher war als die endogene MP-Konzentration, zur Thrombosierung kam. In einem FeCl<sub>3</sub>-induzierten Modell der Venösen Thrombose zeigte sich hingegen eine vermehrte Thrombenbildung auch ohne exogene Tumor-MP-Zufuhr. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Tumor-MP zur Bildung der DVT beitragen können. Die Daten können jedoch nicht direkt mit den Ergebnissen der hier dargestellten Experimente verglichen werden. In den DVT-Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden keine Tumorzellen, sondern nur MP injiziert. Schon geringe Mengen an Karzinom-MP führten in unseren Versuchen zu einer massiven Thrombenbildung. Auch unterschieden sich die experimentellen Bedingungen. So wurden bei Wang *et al.* die Mäuse bereits 3 h nach Venenligatur, in den vorliegenden Experimenten aber erst 48 h nach Venenligatur euthanasiert. Durch die längere Versuchsdauer kann die Thrombusentstehung über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Zum anderen wurden in den vorliegenden Experimenten WT-Mäuse und in den Versuchen der Studie von Wang *et al.* immunsupprimierte Mäuse verwendet. Immunsupprimierte Mäuse unterscheiden sich u.U. deutlich von WT-Mäusen. Zudem entspricht das von Wang *et al.* angewandte FeCl<sub>3</sub>-Modell nicht den Vorgängen bei der Entstehung der DVT und könnte, unabhängig von der Injektion von Tumor-Zellen bzw. -MP, durch den induzierten Endothelschaden bereits eine Aktivierung der Gerinnung induzieren.

Die Thrombosen, welche durch MP des orthotopen Pankreaskarzinommodells hervorgerufen werden, waren TF-abhängig (Abb. 22 E). Diese Beobachtung ist in weitgehender Übereinstimmung mit Untersuchungen an Patienten mit Pankreaskarzinomen, bei denen eine Assoziation zwischen MP-TF-Aktivität und der Ausbildung von DVT beschrieben wurde (Tesselaar *et al.* 2007, Khorana *et al.* 2008). Wang *et al.* (2012) berichten im Gegensatz

dazu, dass wahrscheinlich der TF des Primärtumors und nicht der TF der MP ausschlaggebend für die Thrombosierung ist.

In einem weiteren DVT-Modell, in welchem die venöse Thrombose durch FeCl<sub>3</sub>- und Laserbehandlung induziert und somit ein Endothelschaden herbeigeführt wurde, wurde neben TF auch P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) auf karzinomatösen MP als Aktivator der DVT identifiziert. Demnach rekrutiert PSGL-1 über die Interaktion mit P-Selectin von Thrombozyten und Endothelzellen die MP an die Thrombosierungsstelle, während TF für die eigentliche Aktivierung der Blutgerinnung ausschlaggebend ist (Thomas *et al.* 2009).

Unsere Ergebnisse können diese Befunde nicht bestätigen, da nach Injektion von Tumor-MP in P-Selectin<sup>-/-</sup>-Mäusen die Thrombusentstehung nicht verändert wurde (Abb. 22 A). Dies könnte daran liegen, dass die Versuchsbedingungen der Studie von Thomas *et al.* von denen der vorliegenden Arbeit abweichen. Bei Thomas *et al.* wurden WT-Mäuse herangezogen und ein Venenendothelschaden hervorgerufen. Durch FeCl<sub>3</sub> könnte ein anderer Gerinnungs-Mechanismus induziert worden sein als durch die Restriktion des Blutflusses wie in der vorliegenden Arbeit.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass den Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten sowie dem Gerinnungsfaktor XII keine Rolle für die Bildung der DVT zukommt (Abb. 22 A-D). Im Gegensatz dazu tragen myeloide Zellen und Thrombozyten zur DVT in Abwesenheit der Tumor-MP bei (von Brühl *et al.* 2012). Demzufolge unterscheiden sich die Mechanismen der durch Tumor-MP induzierten Thrombusentstehung von denjenigen, welche DVT nach Stase induzieren. Schließlich könnten aber auch andere Proteine als TF für die Gerinnungsaktivierung durch Tumor-MP verantwortlich sein. In dieser Arbeit zeigte sich, dass KCP-MP, welche nicht TF-abhängige prokoagulatorische Aktivitäten aufweisen (Abb. 11 B, 12 A), ebenfalls DVT hervorrufen (Abb. 21).

#### **4.5 Bildung von Mikrogefäßthrombosen in Lebergefäßen durch karzinomatöse MP *in vivo***

Im Carstair's Staining wurde analysiert, in welchem Ausmaß große und kleine Lebergefäße bei den verschiedenen Modellen des Pankreaskarzinoms durch Fibrin okkludiert werden. Dies war deshalb von besonderer Bedeutung, da Voruntersuchungen gezeigt haben, dass Mikrogefäßthromben in der hepatischen Mikrozirkulation gebildet werden, um Pathogene einzuschließen und deren weitere Disseminierung zu verhindern (Massberg *et al.* 2010, Engelmann & Massberg 2013, Pfeiler *et al.* 2014). Analog hierzu könnte das durch Wirtszellen gebildete Fibrin im Rahmen eines *Host Response Mechanismus* auch die Verbreitung von Tumorzellen unterbinden und anti-metastatisch fungieren.

In den vorliegenden Experimenten wurde sowohl im orthotopen als auch im transgenen Tiermodell beobachtet, dass Tumor-MP Mikrogefäßthrombosen in der Leber induzieren

(Abb. 23). Dabei werden die Mikrogefäßthrombosen definiert als ein mind. 70 %-iger Verschluss von Gefäßen mit einem Durchmesser unter 25 µm. Nach Injektion von karzinomatösen Zellen waren die Mikrogefäßthrombosen deutlich weniger ausgeprägt als nach Injektion der MP (Abb. 23). Wurden Zellen plus MP injiziert, so wurden in den Sinusoiden sowie auch in mittelgroßen und großen Gefäßen Thrombosen beobachtet (Abb. 23-25). Tumorzellen verstärkten die gerinnungsfördernde Wirkung der MP. Dies war sowohl bei der L3.6pl-Zelllinie und FG-Zelllinie, als auch bei der KCP-Zelllinie der Fall.

Dies zeigt, dass MP alleine Mikrogefäßthrombosen und in sehr hohen Dosen auch Thrombosen in größeren Gefäßen verursachen können. Gemeinsam mit Tumorzellen haben die MP jedoch auch in niedriger Dosierung das Potential eine Fibrinbildung in Gefäßen mit einem Durchmesser >25 µm auszulösen. Zusammen mit den vorangegangenen Beobachtungen, welche zeigen, dass MP stark prokoagulatorisch wirken und DVT auslösen können, liegt es somit nahe anzunehmen, dass Tumor-MP Fibrin in Mikrogefäßen bilden, um durch einen *Immune Escape Mechanismus* dem Immunsystem zu entgehen und auf diesem Weg zur Metastasierung beitragen.

#### **4.6 Bildung einer prämetastatischen Nische durch Tumor-MP *in vivo***

Aktivierte Fibroblasten, sog. Myofibroblasten, unterstützen die Tumorprogression, Metastasierung und Angiogenese (Tanaka *et al.* 1988, Orimo *et al.* 2005). Auch sind sie an der Ausbildung einer prämetastatischen Nische beteiligt (Spaeth *et al.* 2009, Duda *et al.* 2010). Im Gegensatz zu nicht aktivierten Fibroblasten sind Myofibroblasten  $\alpha$ -SMA-positiv. Daher kann  $\alpha$ -SMA als Marker für Myofibroblasten verwendet werden.  $\alpha$ -SMA-positive Myofibroblasten wurden in den vorliegenden Experimenten ausschließlich bei denjenigen Mäusen gefunden, welchen L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP injiziert worden waren (Abb. 27, Abb. 28). Da in den übrigen Versuchsgruppen keine  $\alpha$ -SMA-positiven Strukturen gefunden wurden, deutet dies darauf hin, dass die Bildung der prämetastatischen Nischen durch die gleichzeitige Anwesenheit von Tumor-MP und Karzinomzellen induziert wird. Nach zusätzlicher Verabreichung von Rivaroxaban wurden weniger  $\alpha$ -SMA-positive Strukturen gefunden (Abb. 28 B). Somit wird die Bildung von prämetastatischen Nischen durch die Inhibition der Gerinnung teilweise verhindert.

Im transgenen Modell wurden in keiner der untersuchten Gruppen  $\alpha$ -SMA-positive Strukturen in der Leber beobachtet (Kap. 3.5.1). Dies könnte darauf hindeuten, dass im transgenen Modell keine Bildung einer prämetastatischen Nische durch Injektion von Tumor-MP erfolgt. Andererseits könnte die  $\alpha$ -SMA-Färbung auch nicht alle Karzinom-assoziierten Fibroblasten identifizieren (Sugimoto *et al.* 2006).

Da neutrophile Granulozyten an der Bildung der prämetastatischen Nische beteiligt sein können (Psaila *et al.* 2009), wurde in den betroffenen Lebern nach diesen Immunzellen

gefahndet. Die höchste Neutrophilen-Zahl im Lebergewebe wurde nach Injektion von L3.6pl-Zellen plus L3.6pl-MP (3 x 200 µg) ermittelt (Abb. 29 B). Dies könnte darauf hindeuten, dass Karzinomzellen und Tumor-MP für die Bildung einer prämetastatischen Nische nötig sind, wie schon mittels  $\alpha$ -SMA-Färbung nachgewiesen wurde. Wurden nur MP injiziert, so wurden mit steigender Konzentration an injizierten Tumor-MP zunehmend gewebeassoziierte Neutrophile beobachtet (Abb. 29 A, C). Somit könnten karzinomatöse MP u.U. auch alleine an der Bildung einer prämetastatischen Nische beteiligt sein. Auch nach Injektion von L3.6pl-Zellen wurden neutrophile Granulozyten entdeckt (Abb. 29 A), jedoch in signifikant geringerem Ausmaß als nach Injektion von L3.6pl-MP.

Nach Rivaroxaban-Gabe stieg die Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der Leber an (Abb. 29 B). Dies könnte zum einen darauf hindeuten, dass Rivaroxaban und somit eine Faktor Xa Inhibition nicht die Ausbildung einer prämetastatischen Nische hemmt. Neutrophile Granulozyten könnten aber auch durch die Rivaroxaban-Injektion per se rekrutiert worden sein, unabhängig von der Bildung der prämetastatischen Nische. Den Neutrophilen könnte in diesem Zusammenhang allerdings auch eine gänzlich andere, derzeit ungeklärte Funktion zukommen.

Vergleichbar dem orthotopen Modell wurden im transgenen Mausmodell ebenfalls mehr leberassoziierte Neutrophile nach Injektion von Tumor-MP gezählt (Abb. 29 D).

Diese Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass Interaktionen von Tumor-MP mit Tumor-Zellen die Ausbildung einer prämetastatischen Nische fördern, wobei u.U. auch Tumor-MP alleine die Entstehung von prämetastatischen Nischen begünstigen könnten.

#### **4.7 Steigerung der Metastasierung durch karzinomatöse MP *in vivo***

Bei Pankreaskarzinom-Patienten wurde beobachtet, dass sich zum Zeitpunkt der Metastasierung nur wenige karzinomatöse Zellen im Blut befinden (Talmadge *et al.* 2010). Daher könnten insbesondere karzinomatöse MP, die möglicherweise früher in das Blut abgegeben werden als Karzinomzellen, eine tragende Rolle im Metastasierungsprozess spielen.

Ein Überblick über die Ergebnisse der Ki67-Färbung der vorliegenden Arbeit zeigt, dass MP den pro-metastatischen Effekt der Zellen verstärken (Abb. 30 B-D, Abb. 31 A, B) und in niedriger Konzentration alleine nicht zur Metastasierung beitragen (Abb. 31 A).

Nach Verabreichung von sehr hohen Mengen an L3.6pl-MP alleine wurden zwar einige Ki67-positive Zellkerne gefunden (Abb. 31 C). MP könnten in hohen Mengen nach ihrer Migration ins Gewebe gesunde Zellen karzinomatös transformieren. Es sind jedoch sowohl Tumor-Zellen als auch -MP nötig, um eine robuste Metastasierung zu induzieren. Da auch die Fibrinbildung und Thrombosierung der Mikrogefäße der Leber durch Tumor-MP plus

Tumorzellen sehr stark gefördert wurden, könnte die Fibrinbildung an der Metastasierung des Pankreaskarzinoms beteiligt sein.

Im Einklang mit dieser Hypothese stehen die Resultate der Experimente mit Rivaroxaban. Die Inhibition der Fibrinbildung hatte einen klaren anti-metastatischen Effekt (Abb. 30 D, E, Abb. 31 B). Damit könnten die Tumor-MP über eine verstärkte Fibrinbildung dazu beitragen, dass sie selbst sowie Tumorzellen von der Immunantwort des Wirtsorganismus nicht erkannt werden und auf diesem Wege die Disseminierung des Pankreaskarzinoms unterstützen.

In den Experimenten mit transgenen Mäusen wurden in der Cytokeratin-19-Färbung nach Injektion der KCP-MP keine metastatischen Strukturen in der Leber gefunden. Da diese Mäuse generell bereits nach 8 Wochen Lebensdauer an den Folgen des Primärtumors versterben, ist es möglich, dass in dieser kurzen Zeitspanne keine Cytokeratin-19-positiven Metastasen ausgebildet werden können (Kap. 3.6.2).

Die pro-metastatische Wirkung der Tumor-MP wurde auch anhand von morphologisch veränderten metastatischen Gewebestrukturen in den Lebern ermittelt. Analog zu den Ergebnissen der Ki67-Färbung wurden morphologisch veränderte Leberstrukturen nach Injektion von L3.6pl-Zellen und in einem höheren Ausmaß nach zusätzlicher Injektion von L3.6pl-MP gefunden (Abb. 33 B, C, Abb. 34 A, B). Bei den mit Rivaroxaban behandelten Mäusen zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger metastatische Strukturen (Abb. 34 B). Dies stimmt ebenfalls mit den Ergebnissen der Ki67-Färbung überein. Nach Verabreichung von L3.6pl-MP alleine wurden diese metastatischen Herde nicht entdeckt (Abb. 33 A, Abb. 34 A). Auch im transgenen Modell wurden mehr morphologisch veränderte Gewebestrukturen nach der zusätzlichen Injektion von KCP-MP beobachtet (Abb. 33 D, E, Abb. 34 C). Somit scheinen ebenfalls im transgenen Modell pro-metastatische Effekte der MP nachweisbar zu sein. Denkbar wäre, dass die morphologisch veränderten Strukturen in einem früheren Stadium der Metastasierung auftreten als Cytokeratin-19 positive Strukturen.

#### **4.8 Mechanismen der Metastasierung des Pankreaskarzinoms durch karzinomatöse MP**

Da also karzinomatöse MP die Gerinnung aktivieren und gleichzeitig pro-metastatisch agieren, stellt sich die Frage, welche Mechanismen die Blutgerinnung und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms möglicherweise fördern. Hierbei könnten Protease-aktivierte Rezeptoren, sog. PARs, beteiligt sein, welche in die Tumorigenese und die Bildung von Metastasen involviert sein können. PARs werden durch extrazelluläre Serinproteasen aktiviert und dienen als Signalmoleküle, welche zelluläre Vorgänge mittels G-Proteingekoppelter Rezeptoren steuern. Der TF/Faktor VIIa-Komplex und der daraus resultierende Faktor Xa aktivieren beispielsweise PAR-2 (Camerer *et al.* 2000). Somit könnte ein PAR-2-Rho-Aktivierungsmechanismus bei den L3.6pl-Zellen und -MP zum Tragen kommen.

Hingegen wird PAR-1 u.a. durch den Faktor Xa aktiviert (Gieseler *et al.* 2013) und könnte somit an der pro-metastatischen Wirkung der KCP-Zellen und -MP beteiligt sein. PAR-1, PAR-3 und PAR-4 werden durch Thrombin aktiviert (Coughlin 1999). Da durch Zellen und Mikrovesikel beider Pankreaskarzinommodelle Thrombin gebildet wird, wäre auch dieser Aktivierungsweg möglich. In der Tat konnte gezeigt werden, dass PAR-1, PAR-2 und PAR-4 an der Tumorigenese und Angiogenese beteiligt sind (Han *et al.* 2011, Gieseler *et al.* 2013). Es ist also denkbar, dass außer den Tumor-Zellen auch Tumor-Mikrovesikel über PAR-Rezeptoren die Fibrinbildung und Metastasierung beeinflussen könnten. Es wäre somit interessant in weiterführenden Experimenten die potentielle Aktivierung von PAR-Rezeptoren durch Zellen und Mikrovesikel des orthotopen und transgenen Modells zu untersuchen.

Bereits früh wurde erkannt, dass die Expression von TF mit der Progression des Pankreaskarzinoms einher gehen kann (Kakkar *et al.* 1995). Des Weiteren kann Mikrovesikel-TF die Aggressivität, das metastatische Potential und die Wachstumsrate des Mammakarzinoms steigern (Lima *et al.* 2013). Dabei könnten u.U. durch die TF-abhängige Fibrinbildung natürliche Killerzellen davon abgehalten werden, Mikrometastasen zu bekämpfen (Palumbo *et al.* 2007). Dass TF auch in den Experimenten dieser Arbeit eine wichtige Rolle für die Metastasierung des Pankreaskarzinoms spielen könnte ist sehr wahrscheinlich, da im TF-abhängigen orthotopen Modell ein sehr hohes Metastasierungspotential beobachtet wurde. Im TF-unabhängigen transgenen Modell scheint hingegen ein anderer Mechanismus zum Tragen zu kommen, an dem möglicherweise das sog. Cancer Procoagulant beteiligt ist.

## 5. Zusammenfassung

Pankreaskarzinompatienten leiden an einer frühzeitigen Metastasierung des Tumors und weisen zudem gehäuft Tiefe Venenthrombosen (Deep Vein Thrombosis=DVT) auf. Es wurde beschrieben, dass Pankreaskarzinomzellen sog. Mikrovesikel (MP und Exosomen) sezernieren, welche u.a. prokoagulatorische Eigenschaften besitzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde an zwei unterschiedlichen Pankreaskarzinommodellen, einem orthotopen und einem transgenen Modell, die Rolle von Mikrovesikeln für die Fibrinbildung und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms untersucht. Beide Modelle unterscheiden sich hinsichtlich des Metastasierungspotentials und dadurch, dass die beteiligten Zellen humaner bzw. muriner Abstammung sind.

Die Experimente zeigten, dass MP beider Pankreaskarzinommodelle die Blutgerinnung und Thrombosierung in der Mikrozirkulation der Leber sowie in der Vena cava caudalis fördern. Im orthotopen Modell geschah dies TF-abhängig, im transgenen Modell hingegen TF-unabhängig unter Beteiligung von Muc-1. MP des transgenen Modells aktivierten partiell den intrinsischen Blutgerinnungsweg. In einem geringeren Ausmaß agierten auch Exosomen des orthotopen Modells prokoagulatorisch, allerdings schien TF nicht an dieser Wirkung beteiligt zu sein.

Interessanterweise wurden in beiden Modellen *in vitro* und *in vivo* ausgeprägte Gemeinsamkeiten bezüglich der Thrombosierung festgestellt. So wurde in beiden Modellen beobachtet, dass für die Thrombosierung durch MP und Zellen der Gerinnungsfaktor Xa unerlässlich ist. Zudem wurde durch die MP beider Modelle die Bildung von Mikrogefäßthrombosen in der Leber gefördert. Hohe Mengen an MP bzw. die Interaktion von Tumorzellen und -MP induzierten ebenfalls Thrombosen in großen Lebergefäßen. Auch verursachten MP des orthotopen sowie des transgenen Modells die Bildung von DVT. Diese entwickelten sich im orthotopen Modell TF-abhängig.

Bezüglich der Metastasierung konnten ebenfalls Übereinstimmungen in beiden Modellen gefunden werden. MP ermöglichen offensichtlich über eine Steigerung der Fibrinbildung die Ausbildung einer prämetastatischen Nische und die Metastasierung des Pankreaskarzinoms in der Leber. Der pro-metastatische Effekt ist am größten, wenn Tumor-MP gemeinsam mit Tumorzellen agieren. Im orthotopen Modell konnte zudem gezeigt werden, dass die Inhibierung der Gerinnung eine reduzierte Metastasierung zur Folge hat.

## 6. Summary

Patients suffering from pancreatic carcinoma are known to develop early metastasis as well as deep vein thrombosis. It has been described previously that pancreatic cancer cells release so-called microvesicles (microparticles and exosomes) that possess procoagulant properties. In this thesis, the role of microvesicles for fibrin formation and metastasis of pancreatic cancer was examined in two different pancreatic carcinoma models, an orthotopic and transgenic model. These models differ in their metastatic potential and in their origin (human vs. murine).

The results presented in the thesis show that microparticles of both cancer models display a pronounced procoagulant activity that induces both microvascular thrombosis and DVT. In the orthotopic model coagulation occurred in a TF-dependent manner, in the transgenic model the procoagulant effect was TF-independent but mucin-1-dependent. Microparticles of the transgenic model also supported the intrinsic coagulation pathway. To a lesser extent, also exosomes were found to be procoagulant which was TF-independent.

The results showed strong similarities in the prothrombotic mechanisms *in vivo* and *in vitro* promoted by these distinctly different cancer models. In particular, in both models, the procoagulant and prothrombotic effects were entirely dependent on factor Xa. Microparticles from both models promoted microthrombosis in liver. High amounts of microparticles as well as cancer cells plus microparticles caused also occlusion of larger liver vessels. Furthermore, microparticles contributed to the development of deep vein thrombosis in both models. In the orthotopic model this proved to be TF-dependent.

There were also marked similarities in the prometastatic effects of both models of pancreatic cancer. Microparticles were found to support premetastatic niche formation and liver metastasis. The most prominent prometastatic effect was observed when both tumor cells and microparticles were present. In the orthotopic model inhibition of coagulation prevented metastasis.

## 7. Literaturverzeichnis

Abid Hussein MN, Böing AN, Sturk A, Hau CM, Nieuwland R (2007). Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost* **98**, 1096-107

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol* **10**, 619-24

Andersson R, Vagianos CE, Williamson RC (2004). Preoperative staging and evaluation of resectability in pancreatic ductal adenocarcinoma. *HPB (Oxford)* **6**, 5-12

Ansari D, Urey C, Gundewar C, Bauden MP, Andersson R (2013). Comparison of MUC4 expression in primary pancreatic cancer and paired lymph node metastases. *Scand J Gastroenterol* **48**, 1183-7

Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, Holowka DA, Cerione RA (2011). Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4852-7

Antonyak MA, Wilson KF, Cerione RA (2012). R(h)oads to microvesicles. *Small GTPases* **3**, 219-24

Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran J, Urbanowicz B, Brański P, Ratajczak MZ, Zembala M (2006). Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother* **55**, 808–18

Berckmans RJ, Nieuwland R, Boing AN, Romijn FP, Hack A, Sturk A (2001). Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* **85**, 639-46

Bevers EM, Comfurius P, Dekkers DW, Zwaal RF (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1439**, 317-30

Bharthuar A, Khorana AA, Hutson A, Wang JG, Key NS, Mackman N, Iyer RV (2013). Circulating microparticle tissue factor, thromboembolism and survival in pancreaticobiliary cancers. *Thromb Res* **132**, 180-4

Björkqvist J, Jämsä A, Renné T (2013). Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thromb Haemost* **110**, 399-407

Blom JW, Vanderschoot JP, Oostindiër MJ, Osanto S, van der Meer FJ, Rosendaal FR (2006). Incidence of venous thrombosis in a large cohort of 66,329 cancer patients: results of a record linkage study. *Thromb Haemost* **4**, 529-35

Bobek V, Boubelik M, Fiserová A, L'uptovcová M, Vannucci L, Kacprzak G, Kolodziej J, Majewski AM, Hoffman RM (2005). Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer* **47**, 215-23

Borg A, Sandberg T, Nilsson K, Johannsson O, Klinker M, Måsbäck A, Westerdahl J, Olsson H, Ingvar C (2000). High frequency of multiple melanomas and breast and pancreas carcinomas in CDKN2A mutation-positive melanoma families. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1260-6

Bruns CJ, Harbison MT, Kuniyasu H, Eue I, Fidler IJ (1999). In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia* **1**, 50-62

Camerer E, Huang W, Coughlin SR (2000) Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 5255-60

Camerer E, Qazi AA, Duong DN, Cornelissen I, Advincula R, Coughlin SR (2004). Platelets, protease-activated receptors, and fibrinogen in hematogenous metastasis. *Blood* **104**, 397-401

Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH (2006). Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med* **166**, 458-64

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463-9

Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF (2001). Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* **3**, 339-45

Coughlin SR (1999). How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11023-7

Davila M, Amirkhosravi A, Coll E, Desai H, Robles L, Colon J, Baker CH, Francis JL (2008). Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *Thromb Haemost* **6**, 1517-24

De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT (2004). The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. *Clin Cancer Res* **10**, 4895-900

de Oliveira Ada S, Lima LG, Mariano-Oliveira A, Machado DE, Nasciutti LE, Andersen JF, Petersen LC, Francischetti IM, Monteiro RQ (2012). Inhibition of tissue factor by ixolaris reduces primary tumor growth and experimental metastasis in a murine model of melanoma. *Thromb Res* **130**, e163-70

Engelmann B, Massberg S (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 34-45

Esumi N, Fan D, Fidler IJ (1991). Inhibition of murine melanoma experimental metastasis by recombinant desulfatohirudin, a highly specific thrombin inhibitor. *Cancer Res* **51**, 4549-56

Everhart J, Wright D (1995). Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA* **273**, 1605-9

Flick MJ, Du X, Witte DP, Jirousková M, Soloviev DA, Busuttill SJ, Plow EF, Degen JL (2004). Leukocyte engagement of fibrin(ogen) via the integrin receptor alphaMbeta2/Mac-1 is critical for host inflammatory response in vivo. *J Clin Invest* **113**, 1596-606

Furie B, Furie BC (2006). Cancer-associated thrombosis. *Blood Cells Mol Dis* **36**, 177-81

Garnier D, Magnus N, Lee TH, Bentley V, Meehan B, Milsom C, Montermini L, Kislinger T, Rak J (2012). Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *J Biol Chem* **87**, 43565-72

Gay LJ, Felding-Habermann B (2011). Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **11**, 123-34

Geiger TR, Peeper DS (2009). Metastasis mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1796**, 293-308

Gemmell CH, Sefton MV, Yeo EL (1993). Platelet-derived microparticle formation involves glycoprotein IIb-IIIa. Inhibition by RGDS and a Glanzmann's thrombasthenia defect. *J Biol Chem* **268**, 14586-9

Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) -- focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal* **11**, 86

Gordon SG, Cross BA (1981). A factor X-activating cysteine protease from malignant tissue. *J Clin Invest* **67**, 1665-71

Gordon SG (1981). A proteolytic procoagulant associated with malignant transformation. *J Histochem Cytochem* **29**, 457-63

Grange C, Tapparo M, Collino F, Vitillo L, Damasco C, Deregibus MC, Tetta C, Bussolati B, Camussi G (2011). Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res* **71**, 5346-56

Graves LE, Ariztia EV, Navari JR, Matzel HJ, Stack MS, Fishman DA (2004). Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res* **64**, 7045-9

Han N, Jin K, He K, Cao J, Teng L (2011). Protease-activated receptors in cancer: A systematic review. *Oncol Lett* **2**, 599-608

Hahn SA, Bartsch DK (2005). Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Clin Lab Med* **25**, 117-33

Haubold K, Rink M, Spath B, Friedrich M, Chun FK, Marx G, Amirkhosravi A, Francis JL, Bokemeyer C, Eifrig B, Langer F (2009). Tissue factor procoagulant activity of plasma microparticles is increased in patients with early-stage prostate cancer. *Thromb Haemost* **101**, 1147-55

Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ (1999). Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**, 3791-9

Hemker HC, Béguin S (1995). Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* **74**, 134-8

Hood JL, San Roman S, Wickline SA (2011). Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* **71**, 3792-801

Hron G, Kollars M, Weber H, Sagaster V, Quehenberger P, Eichinger S, Kyrle PA, Weltermann A (2007). Tissue factor-positive microparticles: cellular origin and association with coagulation activation in patients with colorectal cancer. *Thromb Haemost* **97**, 119-23

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **61**, 69-90

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J Biol Chem*. **262**, 9412-20

Jung T, Castellana D, Klingbeil P, Cuesta Hernández I, Vitacolonna M, Orlicky DJ, Roffler SR, Brodt P, Zöller M (2009). CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia* **11**, 1093–10

Kahlert C, Kalluri R (2013). Exosomes in tumor microenvironment influence cancer progression and metastasis. *J Mol Med (Berl)* **91**, 431-7

Kakkar AK, Lemoine NR, Scully MF, Tebbutt S, Williamson RC (1995). Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer. *Br J Surg* **82**, 1101-4

Kambas K, Mitroulis I, Apostolidou E, Girod A, Chrysanthopoulou A, Pneumatikos I, Skendros P, Kourtzelis I, Koffa M, Kotsianidis I, Ritis K (2012). Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis. *PLoS One* **7**, e45427

Kaplan RN, Psaila B, Lyden D (2006). Bone marrow cells in the 'pre-metastatic niche': within bone and beyond. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 521-9

Kaplan RN, Rafii S, Lyden D (2006). Preparing the "soil": the premetastatic niche. *Cancer Res* **66**, 11089-93

Kaplan RN, Riba RD, Zacharoulis S, Bramley AH, Vincent L, Costa C, MacDonald DD, Jin DK, Shido K, Kerns SA, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port JL, Altorki N, Port ER, Ruggero D, Shmelkov SV, Jensen KK, Rafii S, Lyden D (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820-7

Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, Kahu H, Pettersson I, Telemo E (2001). "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* **31**, 2892-900

Key NS, Chanrathammachart P, Moody PW, Chang JY (2010). Membrane microparticles in VTE and cancer. *Thromb Res* **125**, S80-3

Khorana AA, Connolly GC (2009). Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer. *J Clin Oncol* **27**, 4839-47

Khorana AA, Fine RL (2004). Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol* **5**, 655-63

Khorana AA, Francis CW, Culakova E, Lyman GH (2005). Risk factors for chemotherapy-associated venous thromboembolism in a prospective observational study. *Cancer* **104**, 2822-9

Khorana AA, Francis CW, Menzies KE, Wang J-G, Hyrien O, Hathcock J, Mackman N, Taubman MB (2008). Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer. *Thromb Haemost* **6**, 1983-5

Khorana AA, Rao MV (2007). Approaches to risk-stratifying cancer patients for venous thromboembolism. *Thromb Res* **120**, S41-50

Klein AP, Lindström S, Mendelsohn JB, Steplowski E, Arslan AA, Bueno-de-Mesquita HB, Fuchs CS, Gallinger S, Gross M, Helzlsouer K, Holly EA, Jacobs EJ, Lacroix A, Li D, Mandelson MT, Olson SH, Petersen GM, Risch HA, Stolzenberg-Solomon RZ, Zheng W, Amundadottir L, Albanes D, Allen NE, Bamlet WR, Boutron-Ruault MC, Buring JE, Bracci PM, Canzian F, Clipp S, Cotterchio M, Duell EJ, Elena J, Gaziano JM, Giovannucci EL, Goggins M, Hallmans G, Hassan M, Hutchinson A, Hunter DJ, Kooperberg C, Kurtz RC, Liu S, Overvad K, Palli D, Patel AV, Rabe KG, Shu XO, Slimani N, Tobias GS, Trichopoulos D, Van Den Eeden SK, Vineis P, Virtamo J, Wactawski-Wende J, Wolpin BM, Yu H, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A, Chanock SJ, Hoover RN, Hartge P, Kraft P (2013). An absolute risk model to identify individuals at elevated risk for pancreatic cancer in the general population. *PLoS One* **8**, e72311

Konstantopoulos K, McIntire LV (1996). Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion. *J Clin Invest* **98**, 2661-5

Kozlowski EO, Pavao MS, Borsig L (2011). Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin. *Thromb Haemost* **9**, 1807-15

Krejs GJ (2010). Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis* **28**, 355-8

Labelle M, Begum S, Hynes RO (2011). Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell* **20**, 576-90

Lane DA, Philippou H, Huntington JA (2005). Directing thrombin. *Blood* **106**, 2605-12

Larson MC, Woodliff JE, Hillery CA, Kearl TJ, Zhao M (2012). Phosphatidylethanolamine is externalized at the surface of microparticles. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 1501-7

Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG (1994). A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* **269**, 23357-66

Lee AY & Levine MN (2003). Venous thromboembolism and cancer: risks and outcomes. *Circulation* **107**, 117-21

Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, Rose-John S, Treiber M, Klöppel G, Yoshimura A, Reindl W, Sipos B, Akira S, Schmid RM, Algül H (2011). Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* **19**, 456-69

Leung L, Radulovich N, Zhu CQ, Wang D, To C, Ibrahimov E, Tsao MS (2013). Loss of canonical Smad4 signaling promotes KRAS driven malignant transformation of human pancreatic duct epithelial cells and metastasis. *PLoS One* **8**, e84366

Lima LG, Chammas R, Monteiro RQ, Moreira ME, Barcinski MA (2009). Tumor-derived microvesicles modulate the establishment of metastatic melanoma in a phosphatidylserine-dependent manner. *Cancer Lett* **283**, 168-75

Lima LG, Leal AC, Vargas G, Porto-Carreiro I, Monteiro RQ (2013). Intercellular transfer of tissue factor via the uptake of tumor-derived microvesicles. *Thromb Res* **132**, 450-6

Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, Dimagno EP, Andrén-Sandberg A, Domellöf L (1993). Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. International Pancreatitis Study Group. *N Engl J Med* **328**, 1433-7

Luo D, Szaba FM, Kummer LW, Plow EF, Mackman N, Gailani D, Smiley ST (2011). Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1, and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram-negative bacterium *Yersinia enterocolitica*. *J Immunol* **187**, 1866-76

Mackman N (2004). Role of tissue factor in hemostasis, thrombosis, and vascular development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1015-22

Mackman N (2012). New insights into the mechanisms of venous thrombosis. *J Clin Invest* **122**, 2331-2336

Marzesco AM, Janich P, Wilsch-Bräuninger M, Dubreuil V, Langenfeld K, Corbeil D, Huttner WB (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker

prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *J Cell Sci* **118**, 2849-58

Massberg S, Grahl L, von Bruehl ML, Manukyan D, Pfeiler S, Goosmann C, Brinkmann V, Lorenz M, Bidzhekov K, Khandagale AB, Konrad I, Kennerknecht E, Reges K, Holdenrieder S, Braun S, Reinhardt C, Spannagl M, Preissner KT, Engelmann B. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat Med* **16**, 887-96

Martins VR, Dias MS, Hainaut P (2013). Tumor-cell-derived microvesicles as carriers of molecular information in cancer. *Curr Opin Oncol* **25**, 66-75

McDonald B, Spicer J, Giannais B, Fallavollita L, Brodt P, Ferri LE (2009). Systemic inflammation increases cancer cell adhesion to hepatic sinusoids by neutrophil mediated mechanisms. *Int J Cancer* **125**, 1298-305

Michaud DS, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Stampfer MJ, Fuchs CS (2001). Physical activity, obesity, height, and the risk of pancreatic cancer. *JAMA* **286**, 921-9

Miyazaki Y, Nomura S, Miyake T, Kagawa H, Kitada C, Taniguchi H, Komiyama Y, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S (1996). High shear stress can initiate both platelet aggregation and shedding of procoagulant containing microparticles. *Blood* **88**, 3456-64

Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, Capelli P, Rigaud G, Falconi M, Bassi C, Lemoine NR, Scarpa A (2001). Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis. *Br J Cancer* **84**, 253-62

Müller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* **17**, 476-478

Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, Ruf W (1992). Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11832-6

Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, Hruban RH, Kern SE (2002). Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res* **62**, 3789-93

Nguyen DG, Booth A, Gould SJ, Hildreth JE (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**, 52347-54

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Böing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A (2000). Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* **95**, 930-5

- Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Eijnsman L, Hack CE, Sturk A (1997). Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* **96**, 3534-41
- Nomura S, Shouzu A, Omoto S, Hayakawa T, Kagawa H, Nishikawa M, Inada M, Fujimura Y, Ikeda Y, Fukuhara S (1998). Effect of cilostazol on soluble adhesion molecules and platelet-derived microparticles in patients with diabetes. *Thromb Haemost* **80**, 388-92
- Oppenheimer SB (2006). Cellular basis of cancer metastasis: A review of fundamentals and new advances. *Acta Histochem* **108**, 327-34
- Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* **121**, 335-48
- Otten HM, Mathijssen J, ten Cate H, Soesan M, Inghels M, Richel DJ, Prins MH (2004). Symptomatic venous thromboembolism in cancer patients treated with chemotherapy: an underestimated phenomenon. *Arch Intern Med* **164**, 190-4
- Otten HM, Prins MH (2001). Venous thromboembolism and occult malignancy. *Thromb Res* **102**, V187-94
- Paget S (1989). The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* **8**, 98-101
- Palumbo JS, Kombrinck KW, Drew AF, Grimes TS, Kiser JH, Degen JL, Bugge TH (2000). Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells. *Blood* **96**, 3302-9
- Palumbo JS, Talmage KE, Massari JV, La Jeunesse CM, Flick MJ, Kombrinck KW, Hu Z, Barney KA, Degen JL (2007). Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* **110**, 133-41
- Park JA, Sharif AS, Tschumperlin DJ, Lau L, Limbrey R, Howarth P, Drazen JM (2012). Tissue factor-bearing exosome secretion from human mechanically stimulated bronchial epithelial cells in vitro and in vivo. *J Allergy Clin Immunol* **130**, 1375-83
- Paulson AS, Tran Cao HS, Tempero MA, Lowy AM (2013). Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology* **144**, 1316-26
- Pekarek LA, Starr BA, Toledano AY, Schreiber H (1995). Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med* **181**, 435-40
- Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M (2004). Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol* **12**, 310-6

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* **18**, 883-91

Peraramelli S, Thomassen S, Heinzmann A, Rosing J, Hackeng TM, Hartmann R, Scheifflinger F, Dockal M (2013). Direct inhibition of factor VIIa by TFPI and TFPI constructs. *Thromb Haemost* **11**, 704-14

Pfeiler S, Massberg S, Engelmann B (2014). Biological basis and pathological relevance of microvascular thrombosis. *Thromb Res* **133 Suppl 1**, S35-7

Piccin A, Murphy WG, Smith OP (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* **21**, 157-71

Prandoni P, Lensing AW, Piccioli A, Bernardi E, Simioni P, Girolami B, Marchiori A, Sabbion P, Prins MH, Noventa F, Girolami A (2002). Recurrent venous thromboembolism and bleeding complications during anticoagulant treatment in patients with cancer and venous thrombosis. *Blood* **100**, 3484-8

Preston RA, Jy W, Jimenez JJ, Mauro LM, Horstmann LL, Valle M, Aime G, Ahn YS (2003). Effects of severe hypertension on endothelial and platelet microparticles. *Hypertension* **41**, 211-17

Psaila B, Lyden D (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nat Rev Cancer* **9**, 285-93

Radisky DC, Kenny PA, Bissell MJ (2007). Fibrosis and cancer: do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT? *J Cell Biochem* **101**, 830-9

Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**, 1161-72

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ (2006). Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* **20**, 1487-95

Reininger AJ, Heijnen HFG, Schumann H, Specht H, Schramm W, Ruggeri ZM (2006). Mechanism of platelet adhesion to von Willebrand factor and microparticle formation under high shear stress. *Blood* **107**, 3537-45

Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ (2012). EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell* **148**, 349-61

Schmaier AH, Røjkjaer R, Shariat-Madar Z (1999). Activation of the plasma kallikrein/kinin system on cells: a revised hypothesis. *Thromb Haemost* **82**, 226-33

Schorey JS, Bhatnagar S (2008). Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology. *Traffic* **9**, 871-81

Schulte A, Pandeya N, Tran B, Fawcett J, Fritschi L, Risch HA, Webb PM, Whiteman DC, Neale RE; Queensland Pancreatic Cancer Study Group (2014). Cigarette smoking and pancreatic cancer risk: More to the story than just pack-years. *Eur J Cancer* **S0959-8049**, 01108-8

Schulz C, Engelmann B, Massberg S (2013). Crossroads of coagulation and innate immunity: the case of deep vein thrombosis. *Thromb Haemost* **11**, 233-41

Shin SH, Kim SC, Hong SM, Kim YH, Song KB, Park KM, Lee YJ (2013). Genetic alterations of K-ras, p53, c-erbB-2, and DPC4 in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival. *Pancreas* **42**, 216-22

Shojaei F, Singh M, Thompson JD, Ferrara N (2008). Role of Bv8 in neutrophil-dependent angiogenesis in a transgenic model of cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2640-5

Siljander P, Carpen O, Lassila R (1996). Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. *Blood* **87**, 4651-63

Singh AP, Moniaux N, Chauhan SC, Meza JL, Batra SK (2004). Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis. *Cancer Res* **64**, 622-30

Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F (2009). Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One* **4**, e4992

Stoek A, Keller S, Riedle S, Sanderson MP, Runz S, Le Naour F, Gutwein P, Ludwig A, Rubinstein E, Altevogt P (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of L1 and CD44. *Biochem J* **393**, 609-18

Stoorvogel W, Kleijmeer MJ, Geuze HJ, Raposo G (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic* **3**, 321-30

Stoorvogel W, Strous GJ, Geuze HJ, Oorschot V, Schwartz AL (1991). Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**, 417-27

Sugimoto H, Mundel TM, Kieran MW, Kalluri R (2006). Identification of fibroblast heterogeneity in the tumor microenvironment. *Cancer Biol Ther* **5**, 1640-6

Talmadge JE, Fidler IJ (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* **70**, 5649-69

Tanaka H, Mori Y, Ishii H, Akedo H (1988). Enhancement of metastatic capacity of fibroblast-tumor cell interaction in mice. *Cancer Res* **48**, 1456-9

Tanase CP, Neagu AI, Necula LG, Mambet C, Enciu AM, Calenic B, Cruceru ML, Albuлесcu R (2014). Cancer stem cells: Involvement in pancreatic cancer pathogenesis and perspectives on cancer therapeutics. *World J Gastroenterol* **20**, 10790-10801

Tesselaar ME, Romijn FP, van der Linden IK, Prins FA, Bertina RM, Osanto S (2007). Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *Thromb Haemost* **5**, 520-7

Thaler J, Ay C, Mackman N, Bertina RM, Kaider A, Marosi C, Key NS, Barcel DA, Scheithauer W, Kornek G, Zielinski C, Pabinger I (2012). Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *Thromb Haemost* **10**, 1363-70

Thaler J, Ay C, Mackman N, Metz-Schimmerl S, Stift J, Kaider A, Müllauer L, Gnant M, Scheithauer W, Pabinger I (2013). Microparticle-associated tissue factor activity in patients with pancreatic cancer: correlation with clinicopathological features. *Eur J Clin Invest* **43**, 277-85

Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1999). Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* **147**, 599-610

Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C (2009). Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med* **206**, 1913-27

Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, Batra SK (2010). Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: implications for the development of novel cancer therapies. *Mol Cancer Ther* **9**, 1419-31

Trams EG, Lauter CJ, Salem N Jr, Heine U (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochim Biophys Acta* **645**, 63-70

Trousseau A. Plegmasia alba dolens (1865). Lectures on clinical medicine, delivered at the Hotel-Dieu, Paris. **5**:281-332

van Doormaal F, Kleinjan A, Berckmans R, Mackman N, Manly D, Kamphuisen P, Richel DJ, Büller HR, Sturk A, Nieuwland R (2012). Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An exploratory prospective study. *J Thromb Haemost* **108**, 160-5

van Doormaal F, Kleinjan A, Di Nisio M, Büller HR, Nieuwland R (2009). Cell-derived microvesicles and cancer. *Neth J Med* **67**, 266-73

van Doormaal F, Kleinjan A, Berckmans RJ, Mackman N, Manly D, Kamphuisen PW, Richel DJ, Büller HR, Sturk A, Nieuwland R (2012). Coagulation activation and microparticle-associated coagulant activity in cancer patients. An exploratory prospective study. *Thromb Haemost* **108**, 160-5

van Wijk MJ, Van Bavel E, Sturk A, Nieuwland R (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* **59**, 277-87

Vella LJ, Hill AF (2008). Generation of cell lines propagating infectious prions and the isolation and characterization of cell-derived exosomes. *Methods Mol Biol* **459**, 69-82

Vezeridis MP, Tzanakakis GN, Meitner PA, Doremus CM, Tibbetts LM, Calabresi P (1992). In vivo selection of a highly metastatic cell line from a human pancreatic carcinoma in the nude mouse. *Cancer* **69**, 2060-3

von Brühl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Köllnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med* **209**, 819-35

Wahrenbrock M, Borsig L, Le D, Varki N, Varki A (2003). Selectin-mucin interactions as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas. *J Clin Invest* **112**, 853-62

Wang JG, Geddings JE, Aleman MM, Cardenas JC, Chanrathammachart P, Williams JC, Kirchhofer D, Bogdanov VY, Bach RR, Rak J, Church FC, Wolberg AS, Pawlinski R, Key NS, Yeh JJ, Mackman N (2012). Tumor-derived tissue factor activates coagulation and enhances thrombosis in a mouse xenograft model of human pancreatic cancer. *Blood* **119**, 5543-52

Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R (2002). Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem* **302**, 191-8

Wiedmer T, Shattil SJ, Cunningham M, Sims PJ (1990). Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. *Biochemistry* **29**, 623-32

Wiedmer T, Sims PJ (1991). Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. *Blood* **78**, 2880-6

Wolf P (1967). The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* **13**, 269-88

Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **7**, 297-303

Wörmann SM, Diakopoulos KN, Lesina M, Algül H (2014). The immune network in pancreatic cancer development and progression. *Oncogene* **33**, 2956-67

Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, Apte MV (2014). Pancreatic cancer and its stroma: A conspiracy theory. *World J Gastroenterol* **20**, 11216-11229

Yates KR, Welsh J, Ehrlich HH, Greenman J, Maraveyas A, Madden LA (2011). Pancreatic cancer cell and microparticle procoagulant surface characterization: involvement of membrane-expressed tissue factor, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. *Blood Coagul Fibrinolysis* **22**, 680-7

Yeo TP, Hruban RH, Leach SD, Wilentz RE, Sohn TA, Kern SE, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Goggins M, Canto MI, Abrams RA, Laheru D, Jaffee EM, Hidalgo M, Yeo CJ (2002). Pancreatic cancer. *Curr Probl Cancer* **26**, 176-275

Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R (2007). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* **67**, 10123-8

Zwaal RF, Schroit AJ (1997). Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* **89**, 1121-32

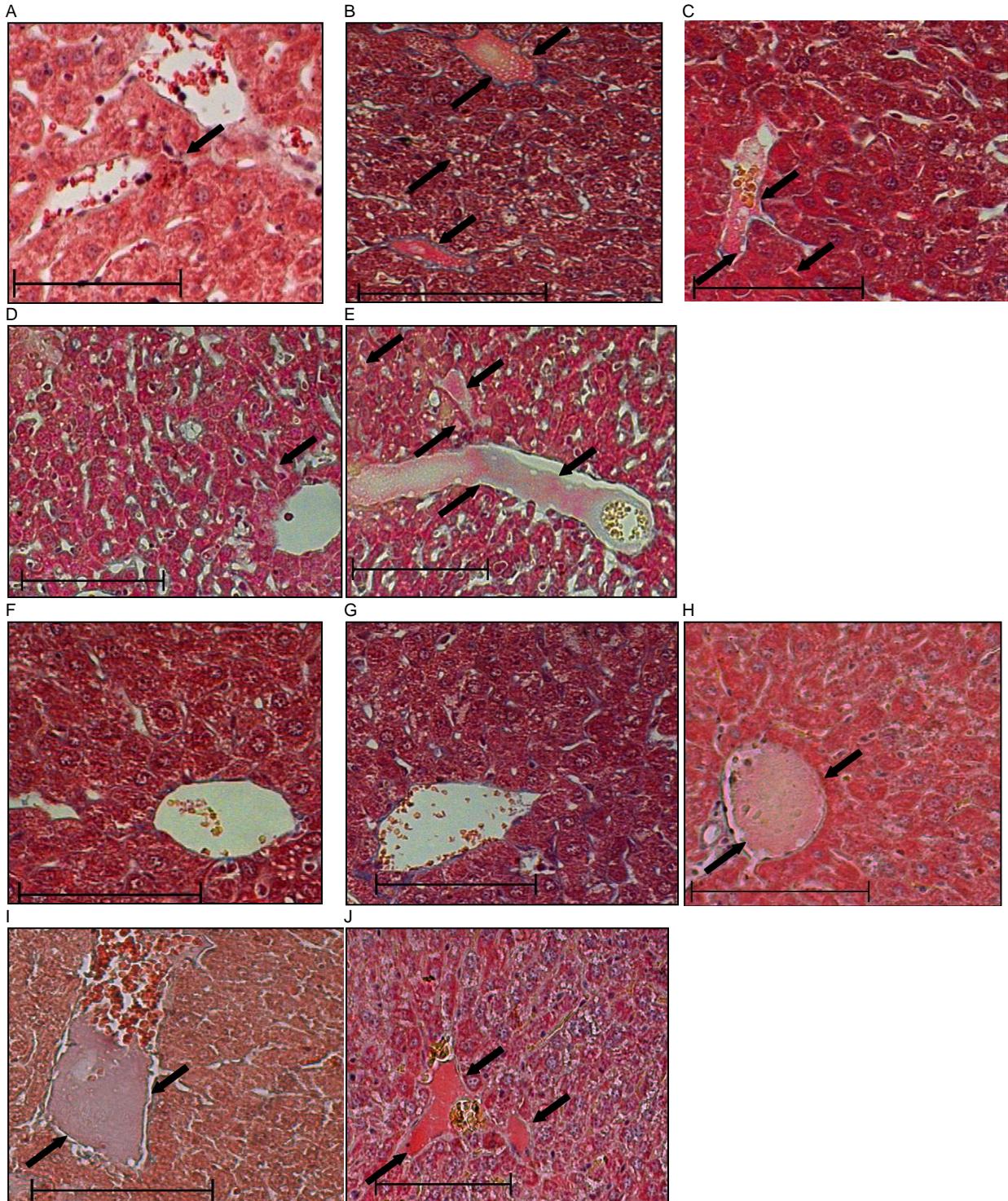
Zwicker JI (2008). Tissue factor-bearing microparticles and cancer. *Semin Thromb Hemost* **34**, 195-8

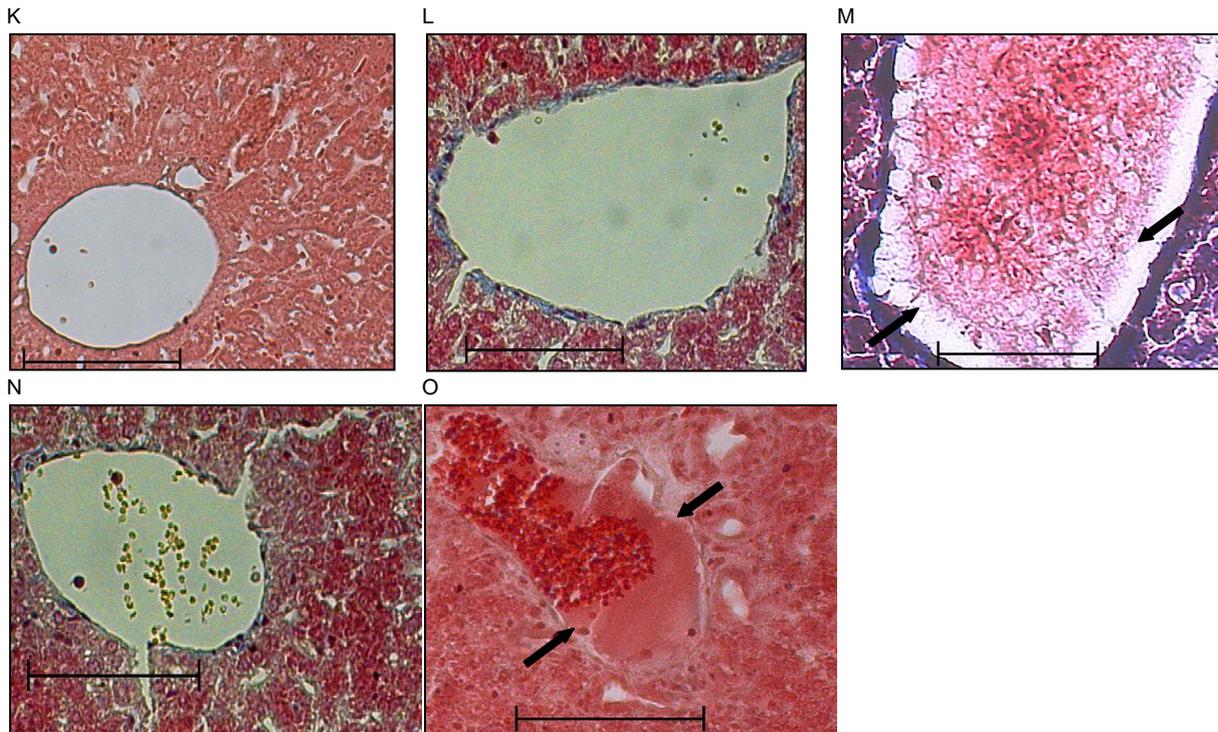
Zwicker JI, Furie BC, Furie B (2007). Cancer-associated thrombosis. *Crit Rev Oncol Hematol* **62**, 126-36

Zwicker JI, Liebman HA, Neuberger D, Lacroix R, Bauer KA, Furie BC, Furie B (2009). Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res* **15**, 6830-40

## 8. Anhang

### 8.1 Carstairs's Färbung





**Abb. 35: Fibrinbildung im orthotopen und transgenen Mausmodell**

Die Carstairs's Färbung erfolgte zur Darstellung des Fibrins in Lebergefäßen bei den Tieren der verschiedenen Versuchgruppen. schwarze Pfeile zeigen auf Fibrin

**A, B, C, D, E: Okklusion von Sinusoiden**

A: L3.6pl-Zellen

B: L3.6pl-MP 1 x 375 µg

C: L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg

D: transgene Maus

E: transgene Maus+KCP-MP 9 x 200 µg

**F, G, H, I, J: Okklusion von mittelgroßen Gefäßen**

F: L3.6pl-Zellen

G: L3.6pl-MP 1 x 375 µg

H: L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg

I: transgene Maus

J: transgene Maus+KCP-MP 9 x 200 µg

**K, L, M, N, O: Okklusion von großen Gefäßen**

K: L3.6pl-Zellen

L: L3.6pl-MP 1 x 375 µg

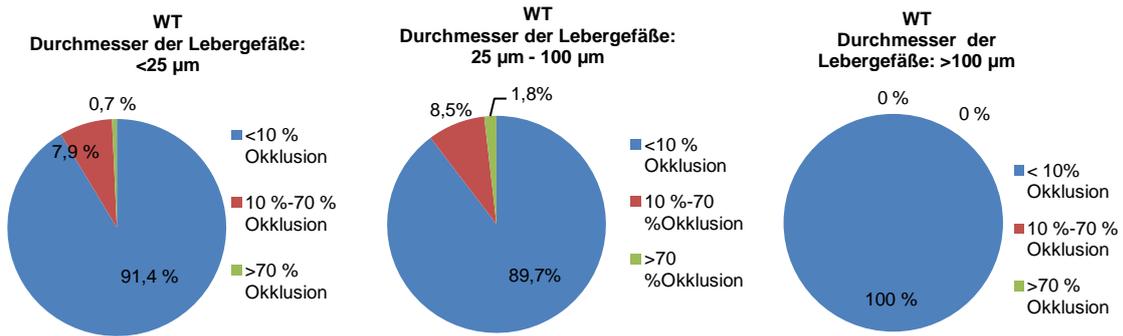
M: L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg

N: transgene Maus

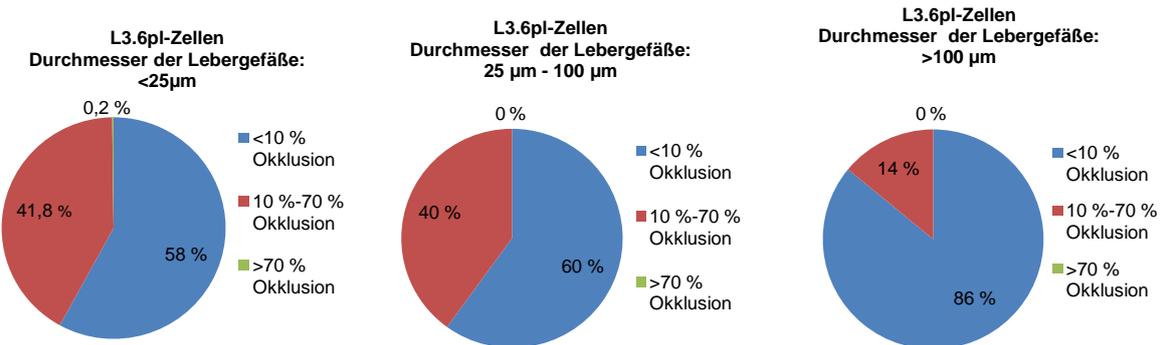
O: transgene Maus+KCP-MP 9 x 200 µg

Größenindikator=100 µm

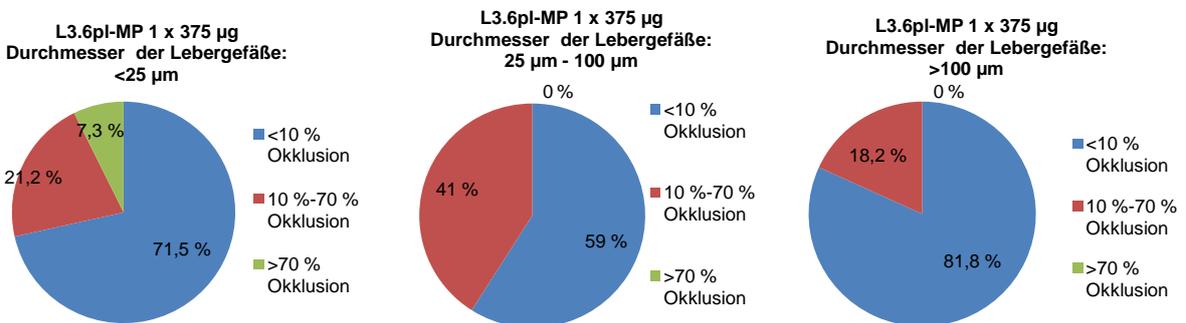
A



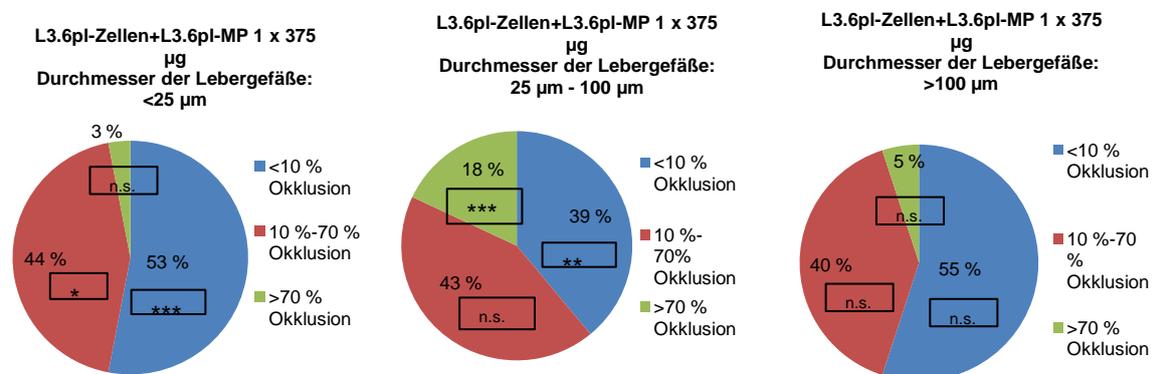
B



C

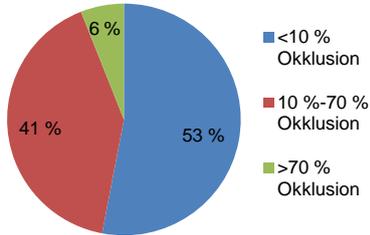


D

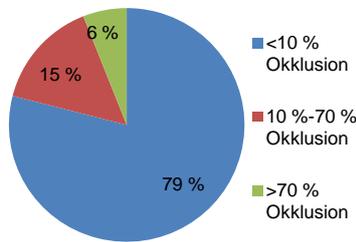


E

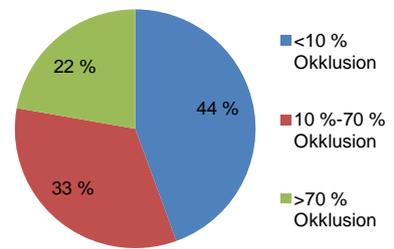
**FG-Zellen+FG-MP 1 x 375 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**<25 µm**



**FG-Zellen+FG-MP 1 x 375 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**25 µm - 100 µm**

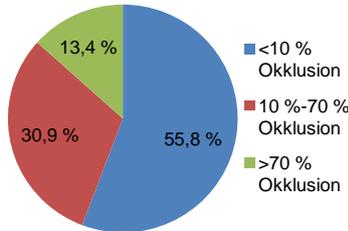


**FG-Zellen+FG-MP 1 x 375 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**>100 µm**

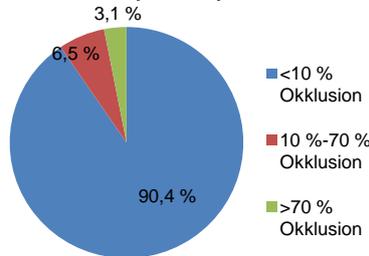


F

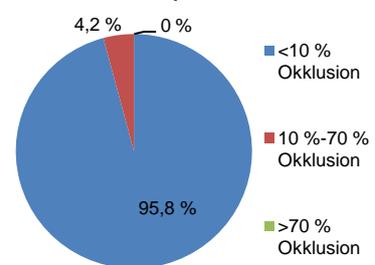
**L3.6pl-MP 9 x 100 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**<25 µm**



**L3.6pl-MP 9 x 100 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**25 µm - 100 µm**

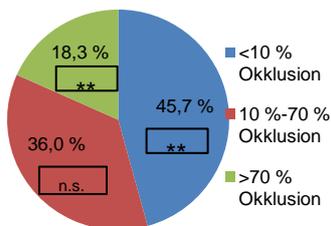


**L3.6pl-MP 9 x 100 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**>100 µm**

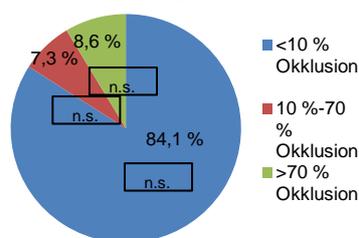


G

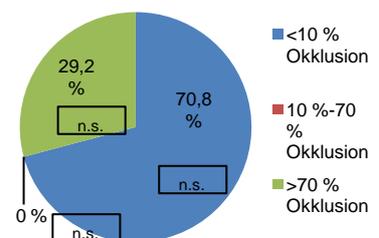
**L3.6pl-MP 9 x 150 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße: <  
**25 µm**



**L3.6pl-MP 9 x 150 µg**  
Durchmesser der Lebergefäße:  
**25 µm-100 µm**

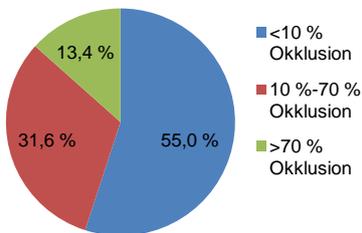


**L3.6pl-MP 9 x 150 µg**  
Durchmesser der  
Lebergefäße: > 100 µm

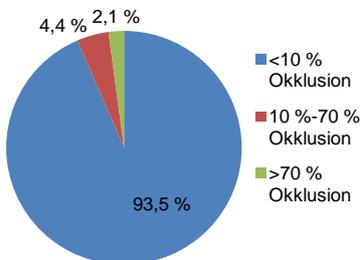


H

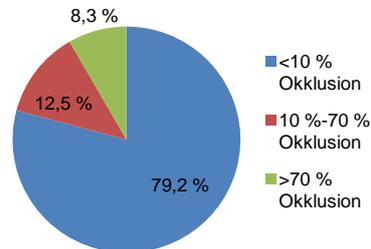
L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg,  
Durchmesser der Lebergefäße: < 25 µm



L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg  
Durchmesser der Lebergefäße: 25 µm - 100 µm

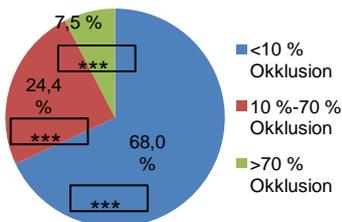


L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg  
Durchmesser der Lebergefäße: > 100 µm

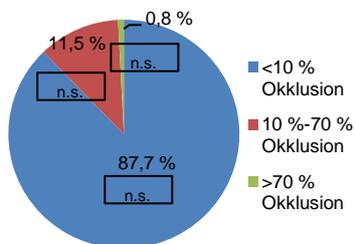


I

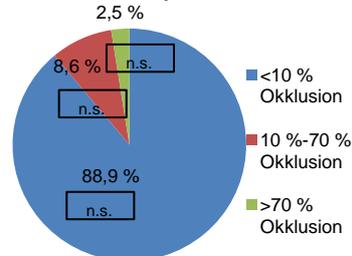
L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, + Rivaroxaban  
Durchmesser der Lebergefäße: < 25 µm



L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg,  
+ Rivaroxaban  
Durchmesser der Lebergefäße: 25 µm - 100 µm

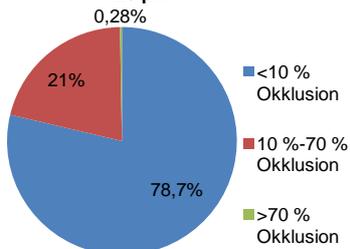


L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, + Rivaroxaban  
Durchmesser der Lebergefäße: > 100 µm

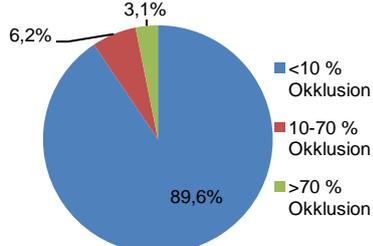


J

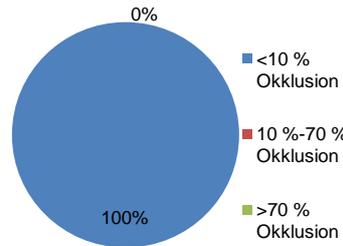
transgene Maus  
Durchmesser der Lebergefäße <25 µm



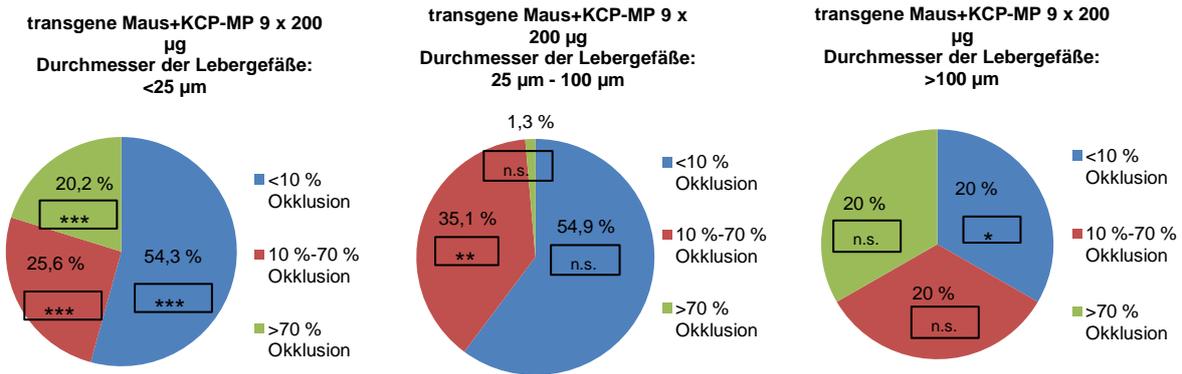
transgene Maus  
Durchmesser der Lebergefäße: 25 µm - 100 µm



transgene Maus  
Durchmesser der Lebergefäße: >100 µm



K



**Abb. 36: Gefäßokklusion durch Fibrin in einzelnen Versuchsgruppen des orthotopen und transgenen Mausmodells**

Das Ausmaß der Okklusion der Lebergefäße durch Fibrin in Prozent wurde im Carstair's Staining ermittelt. Kategorisierung des Ausmaßes der Gefäßokklusion: <10 % Okklusion, 10 % - 70 % Okklusion, >70 % Okklusion, Kategorisierung der Lebergefäßgröße je nach Gefäßdurchmesser: <25 µm, 25 µm - 100 µm, >100 µm

**A:** WT

**B:** orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen

**C:** Injektion von  $1 \times 375 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP i.v.

**D:** orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen und  $1 \times 375 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP i.v.

n.s.=nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber der entsprechenden Gruppe in Abb. 37 C

**E:** orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  FG-Zellen und  $1 \times 375 \mu\text{g}$  FG-MP i.v.

**F:** Injektion von  $9 \times 100 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP i.v.

**G:** Injektion von  $9 \times 150 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP i.v.

n.s.=nicht signifikant, \*\*  $p < 0,01$  gegenüber der entsprechenden Gruppe in Abb. 37 F

**H:** orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen und  $3 \times 200 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP i.v.

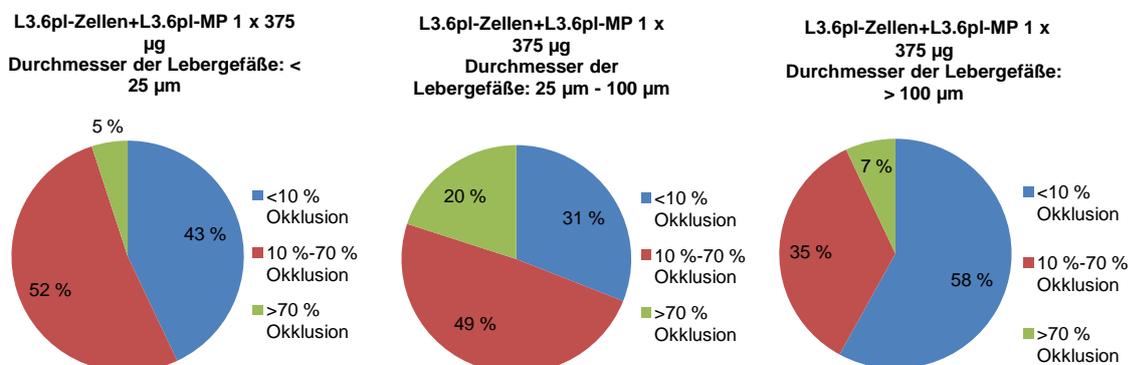
**I:** orthotope Injektion von  $1 \times 10^6$  L3.6pl-Zellen und  $3 \times 200 \mu\text{g}$  L3.6pl-MP i.v., plus  $3 \times 3 \text{ mg/kg}$  Rivaroxaban i.v.

n.s.=nicht signifikant, \*\*  $p < 0,001$  gegenüber der entsprechenden Gruppe in Abb. 37 H

**J:** transgene Maus

**K:** transgene Maus, Injektion von  $9 \times 200$  KCP-MP i.v.

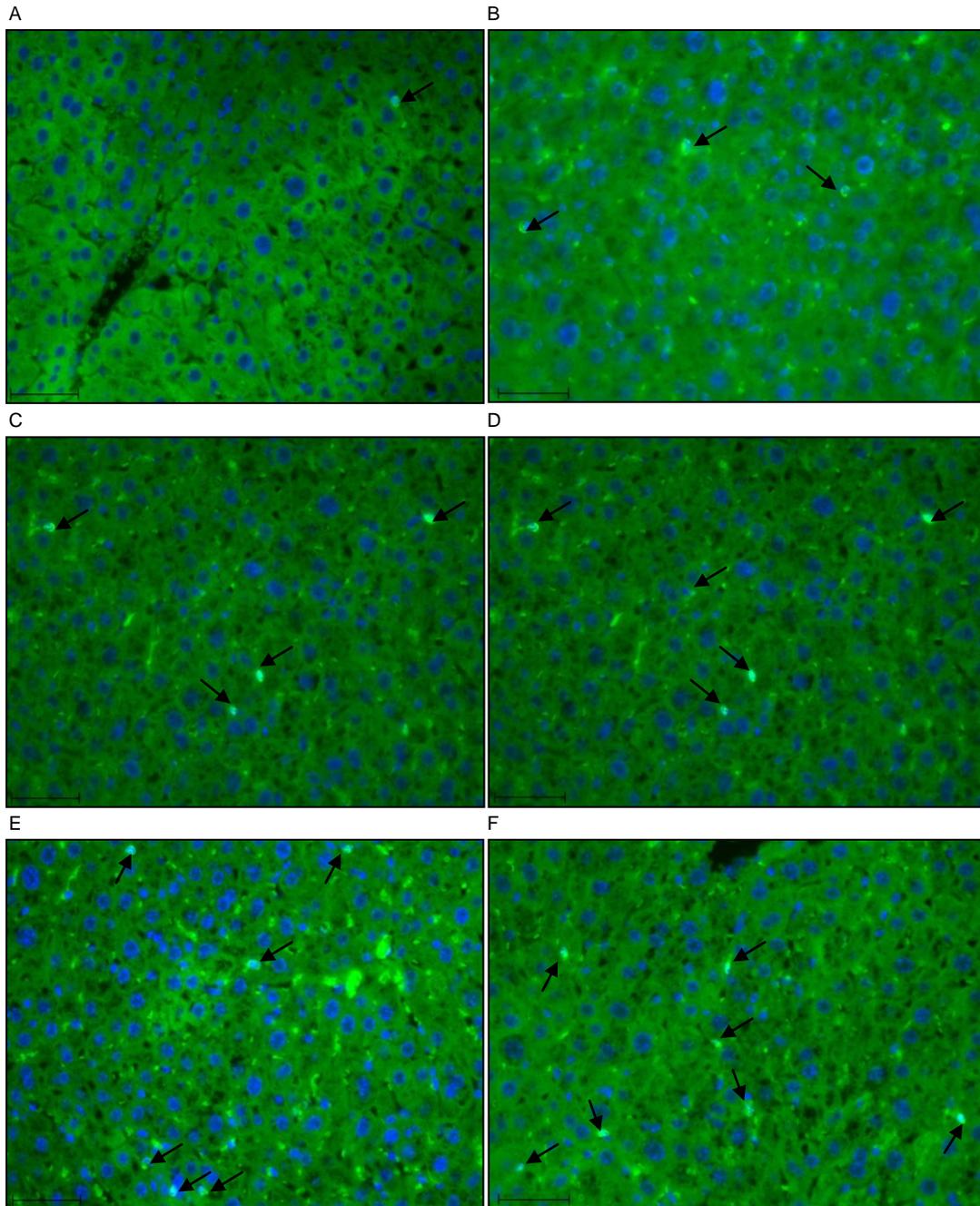
n.s.=nicht signifikant, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  gegenüber der entsprechenden Gruppe in Abb. 37 J

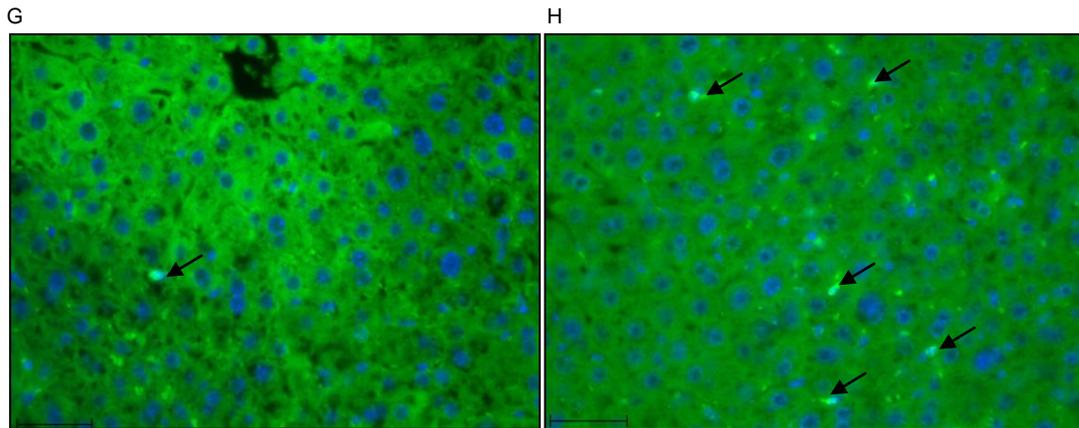


**Abb. 37: Verschlüsse von Gefäßen der Leber durch karzinomatöse MP**

Quantifizierung des Fibrin(ogen)-Stainings der Lebern von Mäusen nach Injektion von L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg n=4, Mittelwerte

## 8.2 Färbung der neutrophilen Granulozyten





**Abb. 38: Färbung neutrophiler Granulozyten in der Leber**

In allen Versuchsgruppen erfolgte die Färbung von neutrophilen Granulozyten (schwarze Pfeile) in der Leber.

**A:** L3.6pl-Zellen

**B:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 1 x 375 µg

**C:** L3.6pl-MP 1 x 375 µg

**D:** L3.6pl-MP 9 x 150 µg

**E:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg

**F:** L3.6pl-Zellen+L3.6pl-MP 3 x 200 µg, +Rivaroxaban

**G:** transgene Maus

**H:** transgene Maus+KCP-MP 9 x 200 µg

Größenindikator=50 µm

## 9. Publikationen

Vrabcova P, Schubert I, Wörmann SM, Zhao Y, Schwarz B, Tischmacher A, von Brühl ML, Pfeiler S, Bäumer M, Chandraratne S, Stark K, Fröhlich T, Arnold G, Lesina M, Algül H, Bruns C, Massberg S, Engelmann B. Microparticles induce microvascular thrombosis to promote pancreatic cancer metastasis. *(in Vorbereitung)*

## 10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Privatdozenten Dr. rer. nat. Dr. med. vet. habil. Stefan Bauersachs für die Übernahme meiner Arbeit und ihre Einreichung an der tiermedizinischen Fakultät der LMU München.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser sowie Herrn Prof. Dr. med. Michael Vogeser danke ich für die Ermöglichung der Durchführung meiner Versuche am Institut für Laboratoriumsmedizin.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Christiane Bruns für die Zusammenarbeit bei den *in vivo* Versuchen sowie die Möglichkeit Mikroskop sowie Mikrotom benutzen zu dürfen.

Ebenso möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die gute Kooperation bedanken, besonders bei Frau Dr. med. vet. Sue Chandraratne und Frau Dr. med. vet. Irene Schubert für ihre Bereitschaft mir bei Fragen jederzeit zu helfen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. med. Hana Algül, insbesondere bei Frau Dr. med. Sonja Wörmann für die Durchführung der *in vivo* Experimente und für die geduldige Beantwortung jeglicher Fragen.

Herrn Dr. rer. nat. Georg Arnold und Herrn Dr. rer. nat. Thomas Fröhlich danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Durchführung der Proteomanalysen.

Auch bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Christian Kupatt für die Ermöglichung der Mitbenutzung des Mikroskops.

Mein großer Dank gilt den jetzigen und ehemaligen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Davit, Susi, Avinash, Martina, Caspar, Markus, Kristijan, Rui und Dörte für ihre Hilfsbereitschaft und den gegenseitigen Austausch. Insbesondere bedanke ich mich bei Markus für die vielen lustigen Stunden im Labor.

Ebenfalls danke ich allen Mitarbeitern am Institut für Laboratoriumsmedizin, welche helfend zur Seite standen, wenn es nötig war. Besonders möchte ich mich bei den Mitgliedern der

Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser für ihre Hilfestellungen und die Möglichkeit viele Geräte in ihrem Labor benutzen zu dürfen bedanken.

Von Herzen danke ich meiner Familie, welche immer an mich geglaubt hat. Besonders danke ich meinen Eltern, welche mich in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und ohne deren Zuspruch und Rückhalt mir mein Studium sowie meine Doktorarbeit nicht möglich gewesen wären.

Auch meinen Freunden danke ich für die Motivation und das geduldige Zuhören in den letzten Jahren.

Vor allem danke ich meinem Flo dafür, dass er mir immer geholfen, mich -wenn nötig- aufgemuntert hat und mit Liebe und grenzenloser Geduld stets an meiner Seite stand.