

Aus dem Institut für Laboratoriumsmedizin der
Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser

Mechanismen der Fibrinbildung durch Pankreaskarzinomzellen und ihre Mikropartikel in vitro



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Markus Bäumer

aus Ibbenbüren

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Bernd Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Julia Mayerle
Prof. Dr. med. Sebastian Kobold
Prof. Dr. rer. nat. Kirsten Lauber

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2022

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.2	Mikropartikel	2
1.2.1	Eigenschaften und Funktion von Mikropartikeln (MP)	2
1.2.2	Vorkommen und Entstehung von MP	2
1.2.3	Entstehung und Freisetzung der MP	4
1.2.4	Elimination der MP	5
1.2.5	Bedeutung der MP für die Blutgerinnung	5
1.2.6	Bedeutung von MP bei malignen Erkrankungen	5
1.3	TF	6
1.3.1	TF – Das Starterprotein der Blutgerinnung	6
1.3.2	TF-tragende MP	7
1.3.3	TF-Verschlüsselung	7
1.4	TFPI als Inhibitor des Gerinnungsstarts	8
1.5	Initiierung der Blutgerinnung	8
1.6	Entstehung thromboembolischer Ereignisse durch Tumoren	9
1.7	Zielsetzung	10
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Geräte	10
2.1.2	Verbrauchsmaterial	11
2.1.3	Chemikalien/Reagenzien	11
2.1.4	Antikörper	13
2.1.5	Puffer	13
2.1.6	Zelllinien	14
2.2	Methoden	14
2.2.1	Zellkultur	14
2.2.1.1	Zelllinien des Pankreaskarzinoms	14
2.2.1.2	MP-Isolierung aus Karzinomzellenüberständen	14
2.2.1.3	Zellkultur	15
2.2.1.4	Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen	15
2.2.1.5	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	16
2.2.1.6	Zellzahlbestimmung	16
2.2.1.7	Zellaufschluss	17

2.2.2	Faktor Xa Bildung.....	17
2.2.3	Faktor XIIa Bildung.....	18
2.2.4	Vollblut-Experimente	19
2.2.4.1	Blutentnahme der Spender	19
2.2.4.2	Thrombelastographie	19
2.2.4.2.1	Prinzip.....	20
2.2.4.2.2	Allgemeine Versuchsdurchführung.....	21
2.2.5	Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Karzinomzellen sowie deren MP	21
2.2.6	Anti-TF-AK.....	22
2.2.7	CTI.....	22
2.2.8	Annexin V.....	23
2.2.9	Anti-TFPI-AK.....	23
2.2.10	Anti-TMEM16F-AK.....	23
2.2.11	Anti-PDI-AK.....	23
2.2.12	Methyl- β -Cyclodextrin.....	23
2.2.13	Duramycin	24
2.2.13.1	Duramycin-vorinkubierte L3.6pl- und KCP-MP	24
2.2.13.2	Wirkung von Duramycin auf HF-Zellen.....	24
2.2.14	Prinzip der konfokalen Mikroskopie.....	24
2.2.15	Markierung von CHO-Zellen und L3.6pl-Zellen mit biotinyliertem Duramycin.....	25
2.2.16	Färbungen der Zellen mit FM 4-64FX und Vybrant DiO	25
2.2.17	Quantitative Analyse und Statistik	26
3	Ergebnisse	26
3.1	Mechanismen der Gerinnungsaktivierung durch Karzinomzellen und deren MP <i>in vitro</i>	26
3.1.1	Faktor Xa Aktivitätsmessung	27
3.1.1.1	Einfluss der MP von Karzinomzellen auf die Gerinnung	27
3.1.1.2	Einfluss intakter und lysierter Karzinomzellen auf die Gerinnung	27
3.1.2	Intrinsischer und extrinsischer Blutgerinnungsweg	28
3.1.2.1	Intrinsische Blutgerinnung.....	28
3.1.2.1.1	Wirkung der Tumor-MP auf die Faktor XIIa Bildung	28
3.1.2.2	Extrinsische Blutgerinnung.....	28
3.1.2.2.1	Beteiligung von TF	28
3.1.3	Vollblutgerinnung.....	29
3.1.3.1	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-TF-AK	29
3.1.3.2	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Corn Trypsin Inhibitor	30

3.1.3.3	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Annexin V	30
3.1.3.4	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-TFPI-AK	31
3.1.3.5	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-TMEM16F-AK.....	32
3.1.3.6	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-PDI-AK.....	32
3.1.3.7	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Methyl- β -Cyclodextrin	33
3.1.3.8	Beeinflussung der Fibrinbildung durch Duramycin	34
3.1.3.8.1	Zugabe von Duramycin zu Vollblut vor Zugabe der MP.....	37
3.1.3.9	Wirkung von Duramycin auf die Gerinnung mit HF-Zellen	37
3.1.3.10	Wirkung von Duramycin auf MP der KCP-Zellen.....	38
3.2	Nachweis von Phosphatidylethanolamin auf L3.6pl-Zellen	38
3.3	Wirkung der MP auf die Zellen des Blutes <i>ex vivo</i>	40
3.3.1	FM4-64FX-markierte L3.6pl-MP	40
3.3.2	Interaktionen Vybrant DiO-markierter L3.6pl-MP mit FM4-64FX-markierten Erythrozyten im Vollblut.....	40
4	Diskussion.....	43
4.1	Prokoagulatorische Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen und ihren Mikropartikeln: Rolle des extrinsischen Blutgerinnungsweges	43
4.2	TF-Aktivatoren in Tumorzellen und deren MP	44
4.2.1	TF-Aktivierung durch Phosphatidylserin	44
4.2.2	Kein Einfluss des Transmembranprotein TMEM16F auf die TF-Aktivierung.....	45
4.2.3	Zerstörte lipid rafts beeinflussen nicht die TF-Aktivierung	46
4.2.4	Kein Einfluss der Oxidoreduktase PDI auf die TF-Aktivierung.....	46
4.2.5	Phosphatidylethanolamin als elementarer TF-Aktivator	46
4.2.5.1	Wirkung von Duramycin auf die TF-Aktivierung	47
4.3	Erythrozyten wirken als Akzeptorzellen von Tumor-MP im Blut <i>in vitro</i>	47
4.3.1	Spekulationen über die Interaktion von Tumor-MP und Blutzellen	48
5	Zusammenfassung.....	49
6	Summary.....	50
7	Abkürzungsverzeichnis	51
8	Literaturverzeichnis	53
9	Danksagung.....	63
10	Affidavit	64
11	Publikationsliste	65

1 Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Weltweit gehört das Pankreaskarzinom zu den am häufigsten zum Tode führenden Tumorerkrankungen. Diese Erkrankung ist extrem aggressiv und verläuft selbst im Falle einer potentiell kurativen Therapie durch eine chirurgische R0-Resektion äußerst ungünstig. Es erkranken mehr Männer als Frauen am Pankreaskarzinom (Kaur, Baine, Jain, Sasson, & Batra, 2012) und das Durchschnittsalter beider Geschlechter liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bei etwa 70 Jahren (Yadav & Lowenfels, 2013). In aktuellen Studien wird davon ausgegangen, dass das Pankreaskarzinom im Jahr 2030 den zweiten Platz der krebsbedingten Todesursachen einnehmen wird (Frampas et al., 2016). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde keine wesentliche Verbesserung des Therapieerfolges verzeichnet (Kolodecik, Shugrue, Ashat, & Thrower, 2013). Obwohl einige vielversprechende neue therapeutische Maßnahmen gegen die Erkrankung entwickelt wurden, konnte bisher nur ein geringer klinischer Erfolg verzeichnet werden (Güngör, Hofmann, Wolters-Eisfeld, & Bockhorn, 2014). Europaweit stiegen im Zeitraum von 2009 bis 2015 die Todesfälle bei Männern um 5% und bei Frauen um 4% (Malvezzi et al., 2015). Das Pankreaskarzinom hat mit ca. 10% eine sehr niedrige 5-Jahres-Überlebensrate (Howlader, Noone et al. 2018, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute, Bethesda, MD). Dieses lässt sich auf die nahezu identische Inzidenz- und Mortalitätsrate zurückführen.

Zu 65% der Krankheitsfälle ist das Karzinom im Pankreaskopf lokalisiert, zu 15% im Pankreas-korpus, zu 10% im Pankreasschwanz und weitere 10% zeigen ein multifokales Auftreten. Hierbei bildet das duktales Adenokarzinom mit ca. 90% der Pankreaskarzinome den größten Teil (Ghaneh, Costello, & Neoptolemos, 2007; Kaur et al., 2012).

Die Ätiologie der Erkrankung ist noch weitestgehend ungeklärt. Es wird eine Assoziation mit Tabakkonsum (Y. Wang, Duan, Yang, & Guo, 2014), Diabetes mellitus (Mao et al., 2015), chronischer Pankreatitis (Talamini et al., 1999), erhöhtem Alkoholgenuss (> 30g Alkohol/d) (Gapstur et al., 2011; Genkinger et al., 2009) sowie Adipositas (Bracci, 2012) beschrieben. Zehn Prozent des duktales Pankreaskarzinoms sind auf eine genetische Dispositionen zurückzuführen, beispielsweise in Form von Mutationen der Tumorsuppressorgene BRCA1/2 (Lucas et al., 2014). Zudem konnten Mutationen in Genen wie z.B. SMAD4 sowie das Tumorprotein p53 mit der Entstehung des Pankreaskarzinoms in Verbindung gebracht werden (Biankin et al., 2012; Grant et al., 2015; Waddell et al., 2015).

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik wird der Tumor oftmals erst in einem weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert, bei dem es bereits zu metastatischen Absiedlungen kam und der Therapieansatz daher häufig aus einer palliativen multimodalen Chemo- und Radiotherapie besteht (Boyle, Czito, Willett, & Palta, 2015; Schneitler et al., 2015). Am häufigsten metastasiert der Tumor in die Leber.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung befinden sich nur noch 20% der Tumoren in einem resezierbaren Stadium (Biankin et al., 2012).

1.2 Mikropartikel

1.2.1 Eigenschaften und Funktion von Mikropartikeln (MP)

MP sind kleine extrazelluläre Membranvesikel mit einer Größe von 0,1 µm – 1 µm (Dignat-George & Boulanger, 2011; Lacroix et al., 2013; Nieri et al., 2016; Nomura & Shimizu, 2015), die sowohl unter Stressbedingungen als auch unter homöostatischen Bedingungen von Zellmembranen freigesetzt werden können. Kennzeichnend für die zellkernlosen Vesikel ist ihr hoher Anteil an zytoplasmatischen und zellmembranösen Bestandteilen der Elternzelle, wodurch Rückschlüsse auf ihre Ursprungszellen geschlossen werden können (Shah, Bergeron, Dong, & Lopez, 2008).

In folgenden Prozessen sind MP u.a. involviert: Gerinnung (Abid Hussein, Boing, Sturk, Hau, & Nieuwland, 2007), interzelluläre Kommunikation (Barry, Pratico, Lawson, & FitzGerald, 1997), Apoptose (Paudel, Panth, & Kim, 2016), Inflammation (Minagar et al., 2001), Angiogenese (Kim, Song, Chung, Lee, & Lee, 2004), Endothelfunktion (Tushuizen, Diamant, Sturk, & Nieuwland, 2011) und angeborene Immunität (Morel, Morel, Jesel, Freyssinet, & Toti, 2011). Nach Quaglia et al. (2020) und Kahn et al. (2017) könnten die MP auch dem transzellulärem Austausch biologischer Information dienen, indem sie als Vektoren für bioaktive Moleküle fungieren und somit MP auf andere Zellen übertragen.

1.2.2 Vorkommen und Entstehung von MP

Das Vorkommen von MP wurde in diversen Körperflüssigkeiten, wie z.B. dem peripherem Blut, Plasma, Liquor, Pleuraflüssigkeiten, Urin, Speichel, Aszitis und sogar im Sputum von Mukoviszidosepatienten beschrieben (Berckmans, Sturk, van Tienen, Schaap, & Nieuwland, 2011; Graves et al., 2004; Mrvar-Brecko et al., 2010; Porro et al., 2010; Street et al., 2012; Vinuela-Berni et al., 2015). Zudem wird angenommen, dass MP auch von Gewebezellen sezerniert werden (Burger et al., 2013).

Zellen des vaskulären Systems wie u.a. Thrombozyten, Endothelzellen, Monozyten, Erythrozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Leukozyten besitzen die Fähigkeit kleine Membranfragmente in Form von MP zu sezernieren (Alexandru et al., 2016; Mostefai, Andriantsitohaina, & Martinez, 2008), so dass in allen Individuen kontinuierlich MP im Blut zirkulieren (Italiano, Mairuhu, & Flaumenhaft, 2010). Der größte Anteil zirkulierender MP stammt von den Thrombozyten mit 70 bis 90% (Zahra, Anderson, Stirling, & Ludlam, 2011).

Eine Vielzahl von Erkrankungen geht vermutlich mit einer erhöhten Konzentration von Mikropartikeln im Blut einher. Besonders bei kardiovaskulären Erkrankungen (VanWijk, VanBavel, Sturk, & Nieuwland, 2003), Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen, Diabetes mellitus (Morrell, Aggrey, Chapman, & Modjeski, 2014), Urämie sowie bei prothrombotischen Ereignis-

sen ist dieses Phänomen zu beobachten. Man kann jedoch nicht davon ausgehen, dass in den Erkrankungen Veränderungen in jeweils zellspezifischen MP nachweisbar sind. So konnte innerhalb atherosklerotischer Plaques die Existenz von MP unterschiedlichen Zellursprungs nachgewiesen werden (Leroyer et al., 2007; Rautou et al., 2011). Es gibt jedoch auch Studien, die versuchen, eine Verbindung zwischen dem Anstieg eines bestimmten Subtyps der MP und bestimmten Erkrankungen herzustellen (Amabile et al., 2009; Nozaki et al., 2010; Sinning et al., 2011).

Anhand von membranständigen zellspezifischen Antigenen ist eine Zuordnung der einzelnen MP zu ihren Elternzellen möglich (Crompton et al., 2015).

Für das Verständnis der Freisetzungsmechanismen der MP ist es wichtig, die Zusammensetzung der Plasmamembran der Ursprungszellen zu betrachten. In der inneren und äußeren Schicht von Zellmembranen sind Phospholipide asymmetrisch verteilt (Williamson & Schlegel, 2002). In der äußeren Membranschicht dominieren Cholinphospholipide (Phosphatidylcholin und Sphingomyelin), wohingegen die innere Schicht vermehrt Aminophospholipide (Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE)) aufweist. Diese Inhomogenität der Lipidverteilung in den beiden Schichten der Membran wird im Wesentlichen durch drei Transportproteine aufrechterhalten: Flippase, Floppase und Scramblase.

Die Flippase ist ein Phospholipidtransporter, der ATP-abhängig spezifisch PS und PE zur inneren, zytosolischen Schicht der Zellmembran transferiert. In entgegengesetzter Richtung agiert die Floppase, welche unspezifisch die Aminophospholipide von der intrazellulären zur extrazellulären Membranseite transportiert. Die Scramblase hingegen fungiert als unselektiver, energieunabhängiger Transporter, welcher bidirektional für die Umverteilung der Lipide in der Membrandoppelschicht sorgt (Burger et al., 2013; Daleke, 2003; Zahra et al., 2011).

Bei Zellaktivierung kommt es intrazellulär zu einem Anstieg an zytosolischem Ca^{2+} (Freyssinet, 2003). Dabei wirkt sich die erhöhte Kalziumkonzentration stimulierend auf die Scramblase und Floppase aus und hat einen inhibierenden Effekt auf die Flippase, wodurch es zu einem Zusammenbruch der Lipiddistribution kommt (Zwaal, Comfurius, & Bevers, 1993). Das in ruhenden Zellen primär an der Innenseite der Zellmembran befindliche PS gelangt nun an die Membranaußenseite. Mittels kalziumabhängiger Proteolyse wird die Funktionalität des an die Zellmembran reichenden Zytoskeletts beeinträchtigt und die Abschnürung und Freisetzung der MP von der Zellmembran begünstigt. (Murphy, Moore, & Kelton, 1987; Raynel, Padula, Marks, & Johnson, 2015; Svanstrom & Grantham, 2016).

Von großer Bedeutung ist die Externalisierung von negativ geladenen anionischen Phospholipiden (insbesondere PS) auf die Oberflächenmembran bei der Entstehung von MP, welche eine wichtige Rolle in der Blutgerinnung für die Bildung funktionell-aktiver Proteinkomplexe aus Gerinnungsfaktoren einnimmt (Bevers, Comfurius, Dekkers, & Zwaal, 1999).

Zusätzlich fördert die Expression von Tissue Factor (TF) - dem Starterprotein der Blutgerinnung - auf den MP die Initiierung der Gerinnung (Lentz, 2003; Van Der Meijden et al., 2012).

1.2.3 Entstehung und Freisetzung der MP

Zur Freisetzung von MP kommt es prinzipiell nach Aktivierung von Zellen, z.B. vermittelt über pro-inflammatorische Stimuli (Lipopolysaccharide, Endotoxine, IL-6) (Nomura, Nakamura, Cone, Tandon, & Kambayashi, 2000; Stahl, Sartz, & Karpman, 2011) oder durch Komponente der Blutgerinnung (Thrombin-Rezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP), Thrombin, Kollagen) in Thrombozyten (Takano, Asazuma, Satoh, Yatomi, & Ozaki, 2004; Terrisse et al., 2010; Tschuor et al., 2008) oder durch CRP in Endothelzellen (Devaraj, Kumaresan, & Jialal, 2011). Auch mechanischer und oxidativer Stress sowie Apoptose und Hypoxie führen zu einer vermehrten Freisetzung von MP (Distler et al., 2005; Holme et al., 1997; Lovren & Verma, 2013; Pichler Hefti et al., 2016) (Abb. 1).

Darüber hinaus soll die Protein Disulfid Isomerase (PDI) an der Freisetzung von MP beteiligt sein. PDI zeigt *in vitro* auf Endothelzellen einen Einfluss auf die Enzymaktivität der Flippase und Floppase (Popescu, Lupu, & Lupu, 2010). PDI kann als Bestandteil von MP zudem in der Aktivierung von TF involviert sein (Furlan-Freguia, Marchese, Gruber, Ruggeri, & Ruf, 2011; Reinhardt et al., 2008).

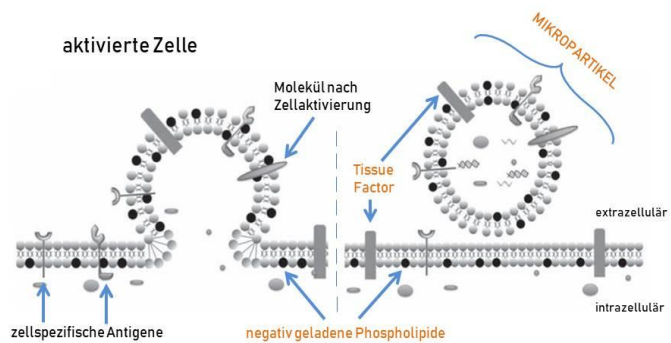


Abb. 1: Schematische Darstellung der Membranstruktur mit Freisetzung von MP

Bei aktivierten Zellen werden vermehrt negativ geladene Phospholipide von der Innen- auf die Außenseite der Zellmembran verlagert (schwarze Kreise). Zellspezifische Proteine (graue Rechtecke) werden ebenso wie Moleküle, die durch Zellaktivierung präsentiert werden (graue Ovale), auf die MP transferiert. Somit weisen die MP eine hohe Anzahl an negativ geladenen Phospholipiden sowie zellspezifischen Antigenen und Membranproteinen ihrer Ursprungszelle auf (modifiziert nach Nieri, Neri et al. 2016).

Eine weitere Bedeutung in der Freisetzung von MP haben die sogenannten lipid rafts. Hierbei handelt es sich um Mikrodomänen von Zellmembranen, die besonders cholesterol- und sphingolipidhaltig sind und die an dem Lipidaustausch zwischen Membranen, der Proteinsortierung und der Signaltransduktion beteiligt sind (Biro et al., 2005). Membranen von MP weisen einen höheren Cholesterolanteil als die Membranen ihrer Ursprungszellen auf.

TF sowie das P-Selektin Glykoprotein Ligand 1, ein Ligand, welcher die Bindung der MP an aktivierte Thrombozyten in einem Thrombus unterstützt, werden vermehrt von Monozyten auf ihre sezernierten MP übertragen. Diese Proteine befinden sich auf der Ursprungszelle in den cholesterolreichen lipid rafts. Durch den Einsatz von methyl- β -Cyclodextrin kommt es zum Zerfall der lipid rafts innerhalb der Plasmamembran, wodurch die Fähigkeit zur PS-Exposition beeinträchtigt wird und eine reduzierte Freisetzung von MP resultiert. Lipid rafts, in denen bevorzugt TF lokalisiert ist, könnten die TF-FVIIa-Aktivität an der Zelloberfläche inhibieren (Lannan et al., 2015; Norling & Dalli, 2013).

1.2.4 Elimination der MP

Im Gegensatz zur Freisetzung von MP ist über die Elimination der MP weniger bekannt. Da die Präsentation von PS auch ein Erkennungssignal für Makrophagen ist, apoptotische Zellen und Zellfragmente zu eliminieren, könnten Makrophagen PS-positive MP entsorgen (Mohning et al., 2018). Nach Dasgupta et al. (2009) ist in einem Mausmodell wahrscheinlich die Milz für die Eliminierung der MP verantwortlich. Auch Endothelzellen können Thrombozyten-MP phagozytieren (Faille et al., 2012; Terrisse et al., 2010). Neuere Daten zeigen, dass die Bindung von MP an CD36 die Eliminierung der MP reguliert (Pfeiler et al., 2019).

1.2.5 Bedeutung der MP für die Blutgerinnung

Für den reibungslosen Ablauf der an der Blutgerinnung beteiligten Prozesse werden neben den Gerinnungsfaktoren und Kalziumionen auch negativ geladene Phospholipide der Membranen benötigt. Die erhöhte PS-Exposition auf der Außenseite von MP dient als katalytische Oberfläche für den Zusammenschluss verschiedener Proteinkomplexe der Gerinnungskaskade (Hugel, Martinez, Kunzelmann, & Freyssinet, 2005), wie des Tenase- und Prothrombinase-Komplexes.

Die Wichtigkeit von MP und PS für die Blutgerinnung wird an thrombozytären MP deutlich, welche infolge ihrer gesteigerten Oberflächenpräsentation von Phospholipiden ein in etwa 50 bis 100-faches prokoagulatorisches Potential als die Thrombozyten selber haben (Sinauridze et al., 2007). Weiter zeigt die Erkrankung an einer kongenitalen hämorrhagischen Diathese, dem genannten Scott-Syndrom, wie wichtig das oberflächliche PS für die Gerinnung ist (Zwaal, Comfurius, & Bevers, 2004). Hierbei resultiert ein Defekt der Scramblase in eine verminderte PS-Präsentation und eine gestörte prokoagulatorische Aktivität von Plättchen (Halliez et al., 2015; Munnix et al., 2003). Der Pathomechanismus beruht auf einer Mutation des Gens, welches für das Transmembranprotein 16F (TMEM16F) codiert und somit zu einem vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese führt (Suzuki, Umeda, Sims, & Nagata, 2010). TMEM16F ist ein kalziumabhängiger, nicht-selektiver Kationenkanal, welcher mono- und bivalent Kationen (u.a. Ca^{2+}) über die Zellmembran transportiert. Mit diesen Eigenschaften ist TMEM16F wesentlich an der Funktionalität der kalziumabhängigen Scramblase beteiligt (Yang et al., 2012).

1.2.6 Bedeutung von MP bei malignen Erkrankungen

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass zirkulierende MP bei malignen Erkrankungen erhöht sind (Lysov, Dwivedi, Gould, & Liaw, 2016; Pokharel et al., 2014; Ren et al., 2016). Schon zu Beginn der 80er Jahre war Dvorak et al. (1981) aufgefallen, dass das Nährmedium kultivierter Tumorzellen eine gerinnungsfördernde Eigenschaft besaß. Sie fanden heraus, dass dieses Medium nach Ultrazentrifugation seine prokoagulatorische Eigenschaft verlor und erst nach Resuspendierung des entstandenen Pellets diese Eigenschaft wieder hergestellt werden kann.

te. Nach elektronenmikroskopischer Analysen ging man davon aus, dass es sich bei dem Pellet um Vesikel handelt, die von der Membran der Krebszellen sezerniert wurden. MP sollen aktiv an der Generierung von Krebserkrankungen beteiligt sein (Janowska-Wieczorek, Marquez-Curtis, Wysoczynski, & Ratajczak, 2006; Janowska-Wieczorek et al., 2005; Whiteside, 2005). Auch über ihr Potential als diagnostische und prognostische Marker wurde bereits berichtet (D'Souza-Schorey & Clancy, 2012; Ginestra, Miceli, Dolo, Romano, & Vittorelli, 1999).

Zur erhöhten Freisetzung tumoröser MP führt in Karzinomzellen insbesondere die Tumor-Progression (Muralidharan-Chari, Clancy, Sedgwick, & D'Souza-Schorey, 2010). So ging ein Entfernen des Tumorgewebes mit einer geringeren Anzahl von MP einher (Sartori et al., 2011; Zwicker et al., 2009).

Unterschiedliche Karzinomtypen weisen eine variable Quantität zirkulierender MP auf und zeigen ein vermehrtes Auftreten von prokoagulatorisch wirkenden, tumorassoziierten MP (Mege et al., 2016). Das Pankreaskarzinom ist durch eine hohe Anzahl TF-positiver MP charakterisiert (Hellum, Franco-Lie, Ovstebo, Hauge, & Henriksson, 2017; Thaler et al., 2012; Zwicker et al., 2009).

1.3 TF

1.3.1 TF – Das Starterprotein der Blutgerinnung

TF ist ein glykosyliertes 47 kDa Zellmembranprotein, das eine grundlegende Stellung als Initiator der physiologischen Blutgerinnung einnimmt (Bazan, 1990). Er ist das Starterprotein des extrinsischen Gerinnungsweges und initiiert sowohl die Hämostase als auch Thrombosen (Geddings et al., 2016; Popescu et al., 2010). TF ist ein bifunktionales Molekül, welches dazu befähigt ist, neben der Fibrinablagerung auch die Transduktion von Zellsignalen herbeizuführen (Ender et al., 2020).

Aufgrund seiner Struktur wird der TF in drei Domänen aufgeteilt, eine intrazelluläre, eine transmembranale und eine extrazelluläre Domäne. Der extrazelluläre Teil (219 Aminosäuren) weist eine Bindungsstelle für Faktor VII/VIIa auf, die aus zwei Modulen mit β -Faltblattstruktur besteht. Die Membrandomäne besteht aus 23 Aminosäuren und die intrazelluläre Domäne aus 21 Aminosäuren (Banner et al., 1996; Vadivel & Bajaj, 2012). Aufgrund der Verankerung von TF in der Zellmembran sowie der Interaktion mit Zelllipiden wird es den Gerinnungsfaktoren X und IX erleichtert, an den TF-FVIIa-Komplex zu binden. Lagert sich der Faktor VIIa an die extrazelluläre Domäne an, führt ein zytoplasmatischer Kalziumeinstrom zu einer intrazellulären Signalantwort. Bei diesem Prozess trägt die intrazelluläre Domäne zur verstärkten proteolytischen Aktivität des TF-FVIIa-Komplexes bei (Camerer et al., 1999; Prydz, Camerer, Rottingen, Wiiger, & Gjernes, 1999). Die katalytische Aktivität des FVIIa wird durch die Bindung des TF um das 2×10^6 -fache gesteigert (Manly, Boles, & Mackman, 2011).

TF wird konstitutiv in verschiedenen Organen und in den Gefäßwänden von Fibroblasten und glatten Muskelzellen exprimiert. In den Gefäßwänden befindet er sich an der Adventitia und der

mittleren Gefäßschicht (Mackman, 2005; Manukyan, von Bruehl, Massberg, & Engelmann, 2008; Owens & Mackman, 2010). Während einer Gefäßverletzung oder atherosklerotischen Plaqueruptur wird TF aus der Gefäßwand freigelegt und gerät in Kontakt mit dem zirkulierenden Blut. Dabei kommt es zur raschen Aktivierung des Gerinnungssystems mit resultierender Thrombusbildung.

Im Blut gesunder Individuen konnte TF-Antigen nachgewiesen werden (Misumi et al., 1998). Dieser im Blut vorliegende, intravasale TF wurde auf der Oberfläche von Blutzellen und MP detektiert (Engelmann, Luther, & Muller, 2003; Zillmann et al., 2001). Der größte Anteil des Plasma-TF ist in MP lokalisiert. Hierbei stellen die sezernierten MP von aktivierten Plättchen den Hauptanteil dar (Muller et al., 2003).

TF wird auch von Tumorzellen exprimiert, hierbei sind besonders Tumorzellen von Adenokarzinomen hervorzuheben. Auch wird TF von Tumorzellen in Form von TF-tragenden MP sezerniert. Damit könnte Tumor-MP assoziierter TF entscheidend an der hämatogenen Metastasierung sowie dem Wachstum und Fortschreiten von Tumorgewebe beteiligt sein (Davila et al., 2008; Falanga, 2005; Langer, 2015; van den Berg, Osanto, Reitsma, & Versteeg, 2012).

In der Tat führte die Inhibierung von TF durch einen neutralisierenden monoklonalen anti-TF-Antikörper im Mausmodell zur Hemmung der TF-vermittelten Gerinnungskaskade und der zellulären Signalübertragung. Zudem wurde sowohl die Tumordinvasion als auch die hämatogene Tumormetastasierung gestoppt (Saito et al., 2011).

1.3.2 TF-tragende MP

Fast die Hälfte der MP von Tumorpatienten exprimieren das Tumorentigen Mucin 1 (MUC-1). Nach Brusttumorresektion konnten keine Tumor-MP mehr detektiert werden, die MUC-1-positiv waren (Tesselaar et al., 2007).

Bei Pankreaskarzinompatienten wurden 460 TF-positive MP/ μ l plättchenfreiem Plasma nachgewiesen, was über dem zweifachen Wert der MP-Konzentration von gesunden Individuen lag. Je schwächer der Differenzierungsgrad des metastasierenden Pankreaskarzinoms ausgeprägt war, desto höher war die TF-Aktivität (Thaler et al., 2013).

Eine retrospektive Analyse von Zwicker et al. (2009) zeigte, dass Krebspatienten, deren Plasmaproben mittels impedanzbasierter Flusszytometrie auf TF-positive MP untersucht wurden und zuvor noch keine VTE erlitten, eine unterschiedlich starke Ausprägung in der Entstehung von VTE zeigten. In Patienten, die keine messbare Konzentration von TF-positiven MP aufwiesen, lag die kumulative Einjahresinzidenz einer VTE bei 0% verglichen mit 35% bei Patienten mit TF-tragenden MP.

1.3.3 TF-Verschlüsselung

TF liegt auf der Oberfläche von MP und aktivierten Zellen generell in einer inaktiven Form vor (R. R. Bach, 2006; Diamant et al., 2002; Muller et al., 2003). Dabei bindet der TF zwar den

Faktor VIIa, jedoch kommt es nur zu einer marginalen Aktivierung der Gerinnung. Wahrscheinlich beruht die Verschlüsselung des intravasalen TF unter physiologischen Bedingungen auf eine Schutzfunktion des Körpers, wodurch eine überschießende Initiierung der Blutgerinnung verhindert werden soll.

Als einen wichtigen Mediator zu Aktivierung des TF konnte die Oxidoreduktase Protein Disulfid Isomerase (PDI) bestimmt werden, welche von Endothelzellen und Thrombozyten sezerniert wird (K. Chen, Detwiler, & Essex, 1995). Es zeigte sich, dass *in vitro* die aus Thrombozyten freigesetzte PDI dazu befähigt ist, an der Aktivierung von kryptischen TF in MP mitzuwirken. Die Inhibierung von PDI inhibierte die Stimulation des TF in MP (Reinhardt et al., 2008). Die Konversion des TF in eine aktive Form durch PDI erfolgt durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen der membrannahen extrazellulären Domäne des TF. Weitere Mechanismen der TF-Aktivierung betreffen eine vermehrte PS-Präsentation oder die Verknüpfung des TF mit lipid rafts (V. M. Chen et al., 2006; Manukyan et al., 2008). So bewirkte die Desintegration der lipid rafts eine Stimulation der prokoagulatorischen Aktivität von TF (Dietzen, Page, & Tetzloff, 2004). Die Aktivierung des Komplementsystems führte ebenfalls zu einer Steigerung der TF-Aktivität (Subramaniam et al., 2017).

1.4 TFPI als Inhibitor des Gerinnungsstarts

Um ein Überschießen der intravasalen Gerinnung durch den prokoagulatorischen TF-FVIIa-Komplex zu verhindern, sind negative Regulationsmechanismen erforderlich. Neben Antithrombin und Protein C ist TFPI ein wichtiger Inhibitor der Koagulation. TFPI ist ein Proteinase-Inhibitor vom Kunitz-Typ, der FXa-abhängig den TF-FVIIa-Komplex hemmt.

Der TFPI weist drei spezifische Domänen auf. Von besonderer Bedeutung ist die N-terminale Kunitz-Typ-1 Domäne, welche spezifisch FVIIa inhibiert und die Kunitz-Typ-2 Domäne, welche FXa inhibiert. Die Typ-3 Domäne bindet den Kofaktor Protein S. Es entsteht ein quaternärer Komplex aus TFPI, FVIIa, FXa und TF, wodurch die proteolytische Aktivität des TF-FVIIa-Komplexes vollständig inhibiert wird (Abb. 2).

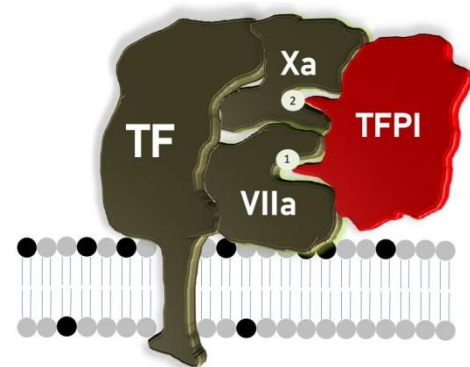


Abb. 2: Schematische Darstellung der Komplexbildung von TFPI

TFPI bildet zusammen mit dem TF, Faktor VIIa und Faktor Xa einen quaternären Komplex. TFPI bindet mit der Kunitz-2-Domäne (2) am aktivierten Faktor Xa. Die Kunitz-1-Domäne (1) vermittelt die Bindung an den Faktor VIIa.

1.5 Initiierung der Blutgerinnung

Die Aktivierung der Blutgerinnung kann auf zwei unterschiedliche Wege erfolgen, den intrinsischen bzw. extrinsischen Gerinnungsweg.

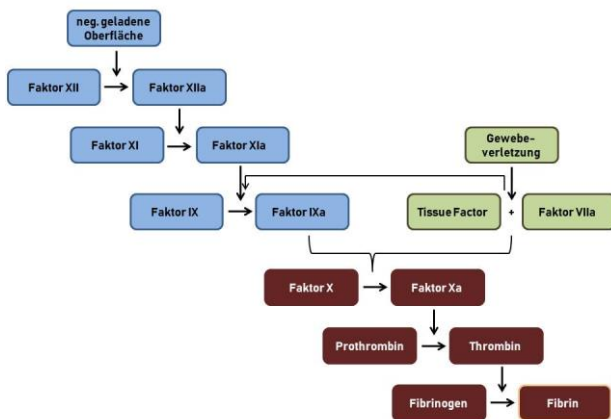


Abb. 3: Schematische Darstellung der Blutgerinnungskaskade

Blaue Kästen: Intrinsischer Blutgerinnungsweg

Grüne Kästen: Extrinsischer Blutgerinnungsweg

Braune Kästen: Gemeinsamer Blutgerinnungsweg

In vivo hat der extrinsische Gerinnungsweg eine größere Bedeutung. Hierbei führt eine Läsion des Endothels mit einhergehender intravasalen Exposition des TF zur Initiierung der Gerinnungskaskade. Im Blut kann nun ein kalziumabhängiger Komplex aus TF und dem im Blut zirkulierenden Gerinnungsfaktor FVIIa und Phospholipiden entstehen. Final kommt es zur Polymerisierung des entstandenen Fibrins und zur Stabilisierung des plättchenreichen Thrombus (Abb. 3).

Der TF-FVIIa-Komplex aktiviert neben dem FX auch den Faktor IX und nimmt dadurch auch

Einfluss auf den intrinsischen Gerinnungsweg (Owens & Mackman, 2010).

Der intrinsische Gerinnungsweg scheint bisher eher *in vitro* von besonderer Bedeutung zu sein, da die Beteiligung dieses Systems *in vivo* unter physiologischen Bedingungen noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. In diesem Kontaktaktivierungssystem kommt es durch den Kontakt des Blutes mit anionischen Oberflächen (z.B. Phospholipide, Ribonukleinsäuren, Bakterien, Lipoproteine) zur Aktivierung der Gerinnungskaskade. Hierdurch wird der Faktor XII (Hageman-Faktor) zu Faktor XIIa aktiviert und somit der Start der intrinsischen Gerinnungskaskade eingeleitet.

1.6 Entstehung thromboembolischer Ereignisse durch Tumoren

Eine Vielzahl von Tumorerkrankungen ist nachweislich mit einer erhöhten Inzidenz venöser thromboembolischer Ereignisse assoziiert. Obwohl die molekularen Mechanismen dieser gerinnungsfördernden Ereignisse noch teilweise ungeklärt sind, so wird jedoch angenommen, dass inflammatorische Zytokine, Gerinnungsfaktoren und prokoagulatorisch wirkende MP als Mediatoren dieser thrombotischen Prozesse von Bedeutung sind (Zwicker, Furie, & Furie, 2007). Im Vergleich zu gesunden Probanden haben Krebspatienten ein vierfach erhöhtes Risiko an einer venösen Thrombembolie (VTE) zu erkranken und diese VTE geht bei Malignompatienten mit einer verkürzten Lebenszeit einher (Geddings et al., 2016; Heit et al., 2000).

Aktuellen Schätzungen zufolge basieren 20% bis 30% der venösen Thrombembolien auf einer Krebserkrankung (Timp, Braekkan, Versteeg, & Cannegieter, 2013). Besonders hoch ist dieses Risiko für Patienten mit einem Pankreaskarzinom, wo die Inzidenz einer Thrombose um 17% - 57% ansteigen kann (Ambrus, Ambrus, Pickern, Soldes, & Bross, 1975; Blom, Osanto, & Rosendaal, 2006; Khorana & Fine, 2004; Levitan et al., 1999).

Es wird angenommen, dass MP-assoziiertes TF für die tumor-assoziierte Thrombose bedeutsam ist.

Als diagnostischer/prognostischer Marker für VTE könnte die MP-Konzentration oder die TF-Aktivität dieser MP aussagekräftig sein (Enjeti, Lincz, & Seldon, 2007; Thaler et al., 2013).

Ausserdem konnte in einer retrospektiven Kohortenstudie an 122 Pankreaskarzinompatienten festgestellt werden, dass eine geringe TF-Expression auf den Tumorzellen mit einem niedrigeren Risiko einhergeht eine VTE (Rate 4,5%) zu erleiden, als bei stark TF-exprimierenden Karzinomzellen (VTE Rate 26,3%) (Khorana, Ahrendt, et al., 2007). Letztlich weisen die an einem Pankreaskarzinom erkrankten Patienten verglichen mit anderen Krebsarten den höchsten Level an MP-TF Aktivität auf und auch eine Korrelation dieser Aktivität mit dem Entstehen von VTE, was bei anderen Karzinomerkrankungen nicht bestätigt werden konnte (Geddings & Mackman, 2013).

1.7 Zielsetzung

Thrombotische Ereignisse gehören zu den häufigsten zum Tode führenden Komplikationen bei Krebspatienten (Donati, 1994; Hisada et al., 2016). Die VTE stellen beim Pankreaskarzinom die zweithäufigste Todesursache dar (Davila et al., 2008; Khorana, Francis, Culakova, Kuderer, & Lyman, 2007). Als Ursache für die tumor-assoziierten Thrombosen kamen insbesondere prokoagulatorisch wirkende MP in Frage. Auf diesen Hintergrund zielte die vorliegende Arbeit auf folgende Fragestellungen:

- Beruhen die prokoagulatorischen Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen und Pankreaskarzinom-MP auf der Aktivierung des intrinsischen und/oder des extrinsischen Blutgerinnungsweges?
- Tragen bestimmte Komponenten von Tumor-MP zu gerinnungsfördernden Eigenschaften dieser MP bei und wie stark wirkt sich eine Inhibierung dieser Komponenten auf die Fibrinbildung aus?
- Liegt der TF auf Pankreaskarzinomzellen und ihren MP in einer inaktiven („encrypted“) Form vor und muss zur Entfaltung der vollen Funktionalität des TF dieser zuvor aktiviert werden oder befindet sich der TF schon in einem aktivierten („de-encrypted“) Zustand?
- Welche Bedeutung haben Erythrozyten in Anwesenheit der Tumor-MP für die Gerinnungsaktivierung?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Centrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg, D)
Centrifuge 5417 R	Eppendorf (Hamburg, D)
ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories (Alexandria, USA)
ELISA Reader Spectra Max Paradigm	Molecular Devices (Biberach a.d. Riss, D)

Konfokales Laserscanmikroskop LSM 510 Meta	Zeiss (Jena, D)
Lichtmikroskop Axiovert 100	Zeiss (Jena, D)
pH-Glaselektrode HI 1131	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments (Kehl a. Rhein, D)
Rührer MR 2002	Heidolph (Schwabach, D)
Schüttelgerät KS 250 basic	IKA-Labortechnik (Staufen, D)
Schüttelmixer MS 1	IKA Works, Inc. (Wilmington, USA)
Sterilbank HLB 2472	Heraeus (Hanau, D)
Thrombelastograph D (Roteg)	Pentapharm GmbH (München, D)
<ul style="list-style-type: none"> • Küvetten Rotem 	Tem Innovations GmbH (München, D)
Vortex Genie-2	Bender & Hobein AG (Zürich, CH)
Waage MC1 LC 620 S	Sartorius (Göttingen, D)
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik (Allentown, USA)
Zählkammer Neubauer Improved	Brand (Wertheim, D)
Zellkulturinkubator	Heraeus (Hanau, D)
Zentrifuge Mikro 22R	Hettich (Tuttlingen, D)
Zentrifuge Rotina 35R	Hettich (Tuttlingen, D)
Zentrifuge Universal 32	Hettich (Tuttlingen, D)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Corning®Flask Zellkulturflasche 25cm ²	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Gewebekulturflaschen 250 ml, 750 ml	BD Falcon™ (Heidelberg, D)
Menzel Deckgläser 18x18 mm, 24x50 mm	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Menzel-Gläser Superfrost	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
Multiwell Platten 96-well, flach	BD Biosciences (Heidelberg, D)
μ-Slide 8 well, ibiTreat	Ibidi (Planegg, D)
Reagiergefäß 1,5 ml Easy Cap	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Safety-Multifly® 21G 200mm lang	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Spritzen	B. Braun (Melsungen, D)
Stripette 5 ml, 10 ml	Corning (München, D)
Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zentrifugenröhrchen, konisch aus Polypropylen, 15 ml, 50 ml	BD Falcon™ (Heidelberg, D)

2.1.3 Chemikalien/Reagenzien

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)
Corn Trypsin Inhibitor	Calbiochem (Darmstadt, D)
Dc Protein Assay Reagenz A und B	BioRad (München, D)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Duramycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit	Thermo Scientific (Braunschweig, D)
FBS (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen (Karlsruhe, D)
FM® Lipophilic Styryl Dye FM®4-64FX	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Fibroblast Growth Medium 2 (ready-to-use)	PromoCell (Heidelberg, D)
Formaldehyd	Roth (Karlsruhe, D)
Freezing Medium	Ibidi (Planegg, 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)
Magnesiumchlorid	Invitrogen (Karlsruhe, D)
Methyl-β-Cyclodextrin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, 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)
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Polylysin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Purified Recombinant Annexin V	BD Biosciences (Heidelberg, D)
RoTEG Küvetten	Instrumentation Laboratory GmbH (Kirchheim, D)
S 2222	Haemochrom Diagnostica (Essen, D)
S 2302	R&D Systems (Minneapolis, USA)
Thromboplastin	Siemens Healthcare (Marburg, D)
Thromborel S	Hartenstein (Würzburg, D)

Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth (Karlsruhe, D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen, D)
Trypsin EDTA (1x/10x)	PAA Laboratories (Cölbe, D)
Vitamine	Pan Biotech (Aidenbach, D)
Vybrant™ DiO Cell-Labeling Solution	Invitrogen (Karlsruhe, D)

2.1.4 Antikörper

mouse monoclonal antibody anti-PDI [RL90]	Affinity BioReagents (Golden, USA)
goat anti-Biotin - DyLight® 550 Conjugate	Agrisera (Vännäs, S)
rabbit polyclonal anti-human anti-Tissue Factor Pathway Inhibitor IgG	American Diagnostica (Pfungstadt, D)
rabbit polyclonal anti-human anti-Tissue Factor IgG	American Diagnostica (Pfungstadt, D)
rabbit polyclonal anti-human anti-TMEM16F (G-14) IgG	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, USA)
purified monoclonal anti-mouse anti-IgG 1, κ Isotype	BD Biosciences (Heidelberg, D)

2.1.5 Puffer

CaCl ₂ (Faktor Xa Bildung)	225 mg CaCl ₂ x 2H ₂ O in 50 ml bidest. H ₂ O
Ca ²⁺ /Hepes (TEG)	10 mM Hepes, 100 mM CaCl ₂ , in bidest. H ₂ O, pH 7,4
Hepes-Puffer	137 mM NaCl, 4 mM KCl, 11 mM Glucose, 10 mM Hepes, in bidest. H ₂ O, pH 7,4
PBS	137 mM NaCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , in bidest. H ₂ O, pH 7,4
Resus-Puffer	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,4 mM NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O, 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O, 5 mM D(+)-Glucose, 5 mM Hepes, pH 7,35
TNC	125 mM TNC, in bidest. H ₂ O

2.1.6 Zelllinien

<u>humane Zelllinien:</u> FG, L3.6pl	Prof. Christiane Bruns, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Universität Köln
<u>murine Zelllinie:</u> KCP	Prof. Hana Algül, II. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar der TU München
<u>CHO-Zellen:</u> CHO-K1 (ATCC® CCL-61™)	ATCC/LGS Standards GmbH (Wesel, D)
<u>Fibroblasten:</u> humane Fibroblasten, Dermis (HFIB-D)	Provitro (Berlin, D)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien des Pankreaskarzinoms

Für die Versuche wurden sowohl humane als auch murine Pankreaskarzinomzellen verwendet. Die humanen L3.6pl- bzw. FG-Zelllinien wurden aus der primären humanen Pankreaskarzinom-Zelllinie COLO 357 generiert (Bruns, Harbison, Kuniyasu, Eue, & Fidler, 1999; Tzanakakis, Margioris, Tsatsakis, & Vezeridis, 2003).

In einem transgenen Mausmodell wurden KCP-Zellen generiert. Die transgenen Mäuse entstammten einer Zucht aus gekreuzten C57Bl/6- und BALB/c-Mäusen und wiesen die Kras-Mutation G12D und eine Deletion des Tumorsuppressorgens p53 auf (Wormann et al., 2016).

2.2.1.2 MP-Isolierung aus Karzinomzellenüberständen

Da die Pankreaskarzinomzelllinien konstitutiv MP in das Nährmedium sezernieren, wurde zur Isolierung der MP zuerst der Überstand aus den Zellkulturen entnommen. Der Überstand wurde zweimal bei je 1430 x g für jeweils 20 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Die Zellfragmente bildeten dabei das Pellet. Zur Isolierung der MP wurde wiederum der Überstand entnommen. In 1 ml-tubes wurden hierzu jeweils 250 µl Aliquots der Lösung hergestellt und bei 17.740 x g für 30 Min. ohne Bremse zentrifugiert. Die entstandenen MP-Pellets wurden in PBS aufgenommen, zusammengefügt und erneut bei 17.740 x g für 30 Min. zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung (Kap. 2.2.1.5).

2.2.1.3 Zellkultur

Die Pankreaskarzinom-Zelllinien wurden in einem Zellkulturschrank bei 37°C unter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für die Herstellung des Mediums der L3.6pl- und der FG-Zellen wurden 500 ml des mit 1g/l Glukose versetzten DMEM unter Hinzugabe von 50 ml Fetalen Bovinem Serum (FBS), 5 ml Penicillin/Streptomycin, 6 ml Vitamin-Mischung und 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren vermengt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

Die KCP-Zellen aus dem transgenen Mausmodell wurden in mit 4,5 g/l Glukose versetztem DMEM mit 50 ml FBS, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren aufgenommen. Auch hier erfolgte ein Mediumwechsel alle zwei bis drei Tage.

Die adhärennten Zellen wurden bei einer Konfluenz von ungefähr 90% von den Zellkulturflaschen gelöst. Bei sterilen Bedingungen erfolgte die Ablösung der Zellen mit 6 ml Trypsin/EDTA (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA). Die Trypsin-Reaktion wurde durch die Aufnahme der Zellen in 10 ml frischem DMEM-Medium gestoppt. Die Zellen wurden daraufhin in sterile 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und diese wurden bei 170 x g für 8 Min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit PBS in eine homogenen Zellsuspension überführt. Ein weiterer Waschschrift folgte unter denselben Zentrifugationsbedingungen. Um eine überschießende Zellproliferation nach erneuter Aussaat der Zellen zu vermeiden, erfolgte eine Verdünnung der Zellen im Verhältnis 1:5 im Nährmedium. Die Kultur der KCP-Zellen erfolgte nur bis zur 14. Passage.

Die CHO-Zellen (CCL-61) wurden aus Chinesischen Hamster Ovarien generiert und die verwendeten Fibroblasten (HFIB-D Kultur) entstammten als Primärzellen aus der Dermis menschlichen Bindegewebes und dienten als nicht-tumoröse Zellen zum Vergleich der Karzinomzellen. Beide Zelllinien wurden unter prinzipiell gleichen Bedingungen wie die Pankreaskarzinom-Zelllinien kultiviert. Das Nährmedium der CHO-Zellen bestand aus MEM- α -Medium sowie den Zusätzen 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die humanen Fibroblasten wurden im *ready-to-use* Fibroblast Media 2 (PromoCell) kultiviert. Bei entsprechender Konfluenz des Kulturflaschenbodens wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums in den Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und die CHO-Zellen bis zu ihrer Ablösung mit der Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C und die Fibroblasten mit Trypsin/EDTA für 5 Min. bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen.

Für die Versuche mittels konfokalen Mikroskops wurden die CHO-Zellen auf spezielle Zellkulturplatten (μ Dish, Ibidi) ausgesät, die eine Betrachtung unter inversen Mikroskopen ermöglichen. Die Inkubation der Zellen über Nacht erfolgte in MEM- α -Medium im Zellkulturschrank bei 37°C (5% CO₂).

2.2.1.4 Einfrieren, Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Zur Einlagerung und möglichen Wiederverwendung der Zellen wurden diese eingefroren. Die abgelösten Zellen wurden vorsichtig aus den Kulturflaschen pipettiert und bei Raumtemperatur mit 170 x g für 8 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet

wurde in PBS gelöst und erneut unter denselben Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in 1 ml Kryogefäße überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Zur Wiederverwendung der Zellen wurden die gefrorenen Kryogefäße durch langsames Erwärmen bei Raumtemperatur aufgetaut und danach zweimal bei $170 \times g$ für je 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit sterilem PBS aufgelöst und die Zellen wurden in mit vorgewärmtem Nährmedium vorgelegten Zellkulturflaschen kultiviert.

Je nach Grad der Zelladhäsion wurde das Medium nach ein bis zwei Tagen erneuert, um die abgestorbenen Zellen zu entfernen.

2.2.1.5 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Alle Proteinkonzentrationen wurden basierend auf der Methode nach Lowry mittels eines RC DC™ (*reducing agent and detergent compatible*) Protein Assay Kits der Firma Bio Rad gemessen. Hierzu wurden jeweils 5 μl einer zu bestimmenden Probe mit Proteinen in eine 96-Well-Platte vorgelegt und mit je 25 μl der Kupfer-Alkali-Tartrat-Lösung A versetzt. Beruhend auf der Biuret-Reaktion kommt es im alkalischen Milieu zu einer Komplexbildung zwischen den Peptidbindungen der Proteine in der Probe und dem zweiwertigen Kupfer-Ionen. Durch Zugabe von je 200 μl des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenz B (Folin-Lösung B) erfolgt eine Reduktion des Protein-Kupferkomplexes, wodurch es beim Farbumschlag zu einer intensiven Blaufärbung des Gemisches kommt. Um die Vollendung des Farbumschlages zu gewährleisten, wurde eine Inkubation der 96-Well-Plate über 12 Minuten bei 37°C in einem ELISA Reader durchgeführt und die Absorption der Probe anschließend bei 700 nm im Photometer ausgelesen. Die gemessenen Werte wurden anhand einer BSA-Standard-Kurve in Proteinkonzentrationen konvertiert. Diese Standardkurve basierte auf einer Eichreihe aus BSA in unterschiedlichen Konzentrationen (0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Alle Werte zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden in Dreifachbestimmung ermittelt.

2.2.1.6 Zellzahlbestimmung

Zur Auszählung der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Grundplatte der Neubauer-Zählkammer besteht aus einem 5 mm dicken Spezialglas und weist in der Mitte eine Nut auf. Die Oberfläche der 30 mm x 80 mm großen Zählkammer ist durch Gravuren von zwei quadratischen Zählnetzen seitlich der mittleren Nut gekennzeichnet.

Die Bestimmung der Zellzahl und Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen erfolgte mit dem Farbstoff Trypanblau. Im Gegensatz zu den vitalen Zellen gelingt es den toten Zellen nicht den Farbstoff auszuschließen, so dass die toten Zellen aber nicht die lebenden Zellen eine starke Blaufärbung aufweisen.

Zur Herstellung des Trypanblau-Zell-Gemisches wurden 90 μl PBS und 100 μl einer 0,05 % Trypanblau-Lösung in einem 1 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 10 μl einer Zellsuspension gemischt. Nach 5-minütiger Inkubation des Gemisches bei RT und erneutem vorsichtigen Ver-

mischen wurden 10 µl des Gemisches beidseits auf die Kammer unterhalb eines aufgelegten Deckglases pipettiert.

Zur Berechnung der Zellzahl wurden ausschließlich die lebenden Zellen in einer bestimmten Anzahl von Quadraten gezählt und der Mittelwert daraus gebildet. Um die tatsächliche Zellzahl pro ml zu berechnen, wurde der Mittelwert mit einem Faktor (Kehrwert des Produktes aus Quadratfläche und Kammerhöhe) multipliziert.

Die Auszählung der Zellen erfolgte stets an zwei Quadraten und die Zellzahl pro µl wurde unter Berücksichtigung folgender Formel ermittelt: Summe der beiden Quadrate x 100. Hierbei zeigte sich eine Viabilität der L3.6pl-Zellen von 88% und der HF-Zellen von 85% (je 10 Auszählungen).

2.2.1.7 Zellaufschluss

Die Lyse der Zellen bzw. von MP erfolgte durch den Prozess des Einfrierens und Auftauens. Zur Gewährleistung einer effizienten Lyse wurden die Zellen bzw. MP in höchstens 200 µl Lysis-Puffer gelöst und für eine Minute in flüssigem Stickstoff gelagert. Unmittelbar danach wurde die Probe eine Minute lang in einem 37°C-Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Zyklus wurde dreimal wiederholt.

2.2.2 Faktor Xa Bildung

Die Bildung von Faktor Xa gibt Aufschluss über die funktionelle Aktivität von TF. In einem photometrischen Aktivitätsassay wird beim Vorliegen aller notwendigen Substrate durch funktionell aktiven TF die katalytische Umwandlung von Faktor X zu Xa getriggert.

Der Faktor Xa wird durch den Tenase-Komplex der Blutgerinnung gebildet. Einerseits wird durch die Interaktion von TF mit Faktor VIIa hierbei das Zymogen Faktor X in eine aktive Protease (FXa) umgewandelt. Ein weiterer Aktivierungsweg von Faktor Xa läuft über die Spaltung des Zymogens Faktor IX. Die entstandene aktive Form des Faktors IXa wiederum spaltet zusammen mit dem Faktor VIIIa proteolytisch den Faktor X in seine aktive Form Xa.

Zur photometrischen Faktor Xa Messung wird nun die Probe mit einem chromogenen Substrat (S2222) und einem Substratgemisch (Beriplex) versetzt, welches Gerinnungsfaktoren enthält, und schließlich die Reaktion mit CaCl_2 gestartet. Faktor Xa ist in der Lage das

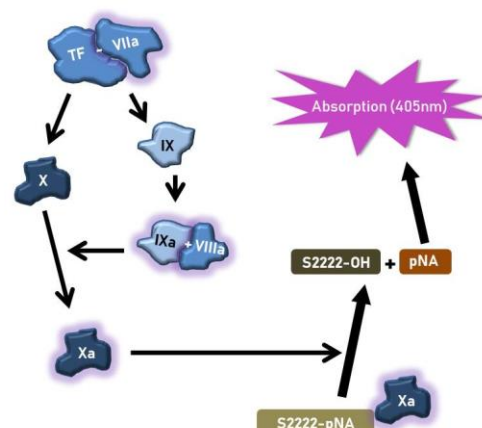


Abb. 4: Messprinzip der Faktor Xa Bildung durch den TF/VIIa-Komplex

Der TF/VIIa-Komplex aktiviert neben Faktor X auch den Faktor IX. Zusammen mit Faktor VIIIa fördert der Faktor IXa die Aktivierung von Faktor X zu Faktor Xa. In dem chromogenen Assay spaltet der gebildete Faktor Xa das chromogene Substrat S2222. Das entstandene Produkt (pNA) absorbiert Licht bei 405 nm, welches photometrisch detektiert werden kann. Die TF-Aktivität entspricht dabei proportional der Steigerung der Absorption pro Sekunde.

farblose chromogene Substrat S2222 zu spalten (Abb. 4). Das entstandene gelbliche Spaltprodukt Para-Nitro-Aniline (pNA) kann nun durch sein spezifisches Absorptionsspektrum mit einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch quantifiziert werden. Die Menge an pNA und FXa stehen somit im proportionalen Verhältnis zueinander.

Damit diese Reaktion ablaufen kann, werden in der Probe noch weitere Gerinnungsfaktoren benötigt, welche in einem Substratgemisch (Beriplex) der Probe hinzugefügt wurden. Beriplex enthält neben den Faktoren II, VII, IX und X auch antikoagulatorisch wirksame Komponente wie Heparin, Protein C, S und Antithrombin. Somit herrschen in diesem Assay ähnliche Bedingungen wie im Vollblut.

Allgemeine Versuchsdurchführung

Jeweils 50 µl einer 30 mM CaCl₂-Lösung wurden in Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt und 50 µl Probenvolumen hinzugefügt. Für das Substratgemisch und das chromogene Substrat wurde eine Stammlösung hergestellt, bestehend aus 3370 µl Resuspensionslösung, 400 µl des chromogenen Substrats S2222 sowie 225 µl des Substratgemisches aus Gerinnungsfaktoren. Von dieser Stammlösung wurden schließlich 100 µl Substratpuffer in jedes Well pipettiert und die Absorption der Probe in sechs Intervallen mit je 6 Min. mittels ELISA-Reader ermittelt. Die Umrechnung in die Aktivitätseinheit U/ml erfolgte anhand einer mitangesetzten Standardreihe unter Verwendung definierter Konzentrationen von rekombinantem TF. Bei den Werten erfolgte stets eine Dreifachbestimmung.

Verwendung intakter sowie lysierter L3.6pl-, FG-, und HF Zellen

Um einen Vergleich von tumorösen Zellen mit nicht-tumorösen Zellen ziehen zu können, wurden die humanen Fibroblasten als Primärzellkulturen verwendet.

In einigen Versuchsreihen wurden neben den intakten L3.6pl-, FG-, und HF Zellen auch lysierte Zellen verwendet. Die Lyse der Pankreaskarzinomzellen sowie der Fibroblasten wurde nach der dargestellten Methode durchgeführt (Kap. 2.2.1.7).

Verwendung von L3.6pl- und FG-MP

Da angenommen wurde, dass TF und PS auf MP im Vergleich zur Ursprungszelle in höheren Mengen auf der Zelloberfläche konzentriert sind, wurde in diesen Experimenten die Faktor Xa Bildung der MP mit unterschiedlichen Konzentrationen (10, 20 und 50 µg/ml MP) untersucht.

Durchflusszytometrische Untersuchungen unsere Arbeitsgruppe zeigten, dass 1 µg MP-Protein ca. 4000 MP entspricht. Eine Konzentration von 50 µg/ml entspricht dabei der Menge an im Blut zirkulierenden karzinomatösen MP (Tesselaar et al., 2007; Zwicker et al., 2009).

2.2.3 Faktor XIIa Bildung

Der Faktor XIIa hat eine wesentliche Schlüsselfunktion in der Aktivierung der intrinsischen Blutgerinnungskaskade. Die Bildung des Faktor XIIa innerhalb einer zu untersuchenden Probe kann mittels eines chromogenen Faktor XIIa Assay photometrisch detektiert werden.

In dem angewandten chromogenen Assay wird die Probe zunächst mit Faktor XII und ZnCl_2 versetzt. Wird der Faktor XII nun voraktiviert kommt es zur Aktivierung von Kallikrein. Durch die Zugabe eines chromogenen Substrates (S-2302) für das Plasmakallikrein entsteht nach proteolytischer Spaltung des Substrates durch das Kallikrein ein Farbumschlag innerhalb der Probe. Ähnlich wie bei dem Faktor Xa Assay (Kap. 2.2.2) entsteht durch eine Abspaltung am Substrat das gelbliche Para-Nitro-Aniline (pNA). Durch den Farbumschlag ändert sich die optische Dichte und der Anstieg der Absorption pro Sekunde bei einer Wellenlänge von 405 nm steht im direkten Zusammenhang mit der enzymatischen Aktivität.

Versuchsdurchführung

Die zu messende Probe mit L3.6pl- und FG-MP wurde in 85 μl Hepes-Puffer aufgenommen und mit 85 μl eines Mastermixes (100 nM FXII und 100 μM ZnCl_2 im Verhältnis 1:1) vermischt. Die 20-minütige Inkubation des Gemisches fand bei RT statt. Das chromogene Substrat S-2302 wurde in eine 96-Well-Platte in einem Volumen von 10 μl pro Well pipettiert und mit 50 μl des Probengemisches vermischt. Die ablaufende Reaktion führte zur Spaltung des chromogenen Substrates mit Farbumschlag. Über einen Zeitraum von zwei Stunden wurde die Probe photometrisch mittels ELISA Reader gemessen. Die Messung der Ergebnisse erfolgte in Dreifachbestimmung.

2.2.4 Vollblut-Experimente

2.2.4.1 Blutentnahme der Spender

Die venöse Blutentnahme erfolgte an gesunden Spendern, die zuvor über einen Zeitraum von zwei Wochen unter keiner Einnahme von Arzneimittel standen, die Einfluss auf die Koagulation haben könnten. Vor der Blutabnahme wurden die verwendeten Kunststoffspritzen mit einer 12,5 mM Trinatriumcitrat-Lösung und 5 $\mu\text{g/ml}$ Corn Trypsin Inhibitor (CTI) befüllt, um eine vorzeitige Blutgerinnung innerhalb der Spritzen zu vermeiden.

Je nach Versuchsaufbau wurde das Blut nach hinreichender Hautdesinfektion im Bereich der Armbeuge mittels Butterfly-Kanüle in Spritzen mit einem Volumen von 2 ml oder 5 ml gewonnen. Die Blutabnahmen erfolgten auf der Grundlage eines von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigten Antrages.

2.2.4.2 Thrombelastographie

Die Thrombelastographie (TEG) ist ein viskoelastisches Verfahren zur Untersuchung der Gerinnungseigenschaften von Vollblut und Zitratblut. Durch die Verwendung von Vollblut bzw. Zitratblut können die Interaktionen zwischen den zellulären und plasmatischen Blutbestandteilen im Rahmen der Hämostase bewertet werden. Die TEG ermöglicht so eine funktionelle Analyse der einzelnen Stufen der Blutgerinnung vom Beginn der Gerinnselbildung über die Fibrinbildung, dem Zusammenwirken mit den Thrombozyten, der Gerinnselstabilisierung bis hin zur

Fibrinolyse. Somit ermöglicht die TEG die Beurteilung der Dynamik der Gerinnelbildung und der Qualität des Gerinnsels.

2.2.4.2.1 Prinzip

Ursprünglich basierte das im Jahr 1948 entwickelte Verfahren der klassischen TEG nach Prof. Hartert auf der Rotation einer mit der Blutprobe gefüllten Küvette, in welcher sich ein freischwinger Stempel am Torsionsdraht befand. Bei der TEG wird eine Kunststoffküvette mit einer zuvor antikoagulierten Blutprobe befüllt und durch Zugabe von Ca^{2+} -Ionen die Gerinnungskaskade reaktiviert. Die Messung wird mit dem Eintauchen eines Stempels gestartet. Mit dem Einsetzen der Gerinnung bilden sich Fibrinfäden zwischen dem Stempel und der Küvettenwand. Der Rotationsbewegung wirkt somit ein steigender Widerstand entgegen, je mehr Fibrinfäden gebildet werden. Dadurch kommt es zur Veränderung der Drehbewegungen was kontinuierlich registriert wird. Da diese Methode anfällig für Erschütterungen und Stöße ist, wurde das Verfahren weiterentwickelt und computerisiert. Dies gilt insbesondere für die hier angewandte Rotations-Elastographie (ROTEM®).

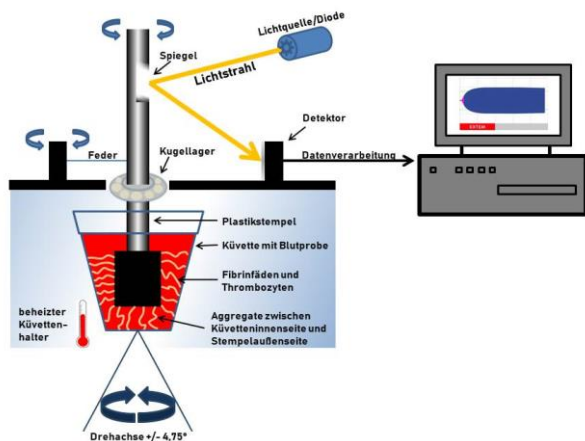


Abb. 5: Prinzip der Rotations-Thrombelastographie

Die Blutprobe wird in eine auf 37°C vorgewärmte Küvette gefüllt, auf welche anschließend ein Plastikstempel gesetzt wird. Zu Beginn kann der Stempel Rotationsbewegungen nach links und rechts in einem Winkel von 4,75° durchführen, bis mit einsetzender Gerinnung und steigender Festigkeit des Gerinnsels die Umdrehungen immer weiter abgebremst werden. Durch das veränderte Ausmaß der Rotation aufgrund des immer fester werdenden Gerinnsels wird die Strahlung einer Lichtquelle von einem am oberen Ende der Achse befestigten Spiegel abgelenkt und die Reflektion der Lichtstrahlung durch einen Sensor detektiert. Der Startzeitpunkt und das Ausmaß der Gerinnelbildung werden durch eine Computersoftware ausgewertet.

Im Unterschied zur klassischen TEG rotiert beim ROTEM® Gerät nicht mehr eine Kunststoffküvette um den freihängenden Stempel, sondern die Küvette sitzt fest in der Halterung des Gerätes und der Stempel bewegt sich nun mittels torsionselastischer Feder alternierend mit je 4,75° nach links und rechts. Die Änderung der Kinetik wird durch ein optisches Meßsystem detektiert und mittels Computer berechnet (Abb. 5). Hierdurch können einzelne Analysen zu den Gerinnungsvorgängen interpretiert werden. Die Zeit zwischen dem Start der Messung und dem Einsetzen der Gerinnelbildung ist die Gerinnungszeit (Clotting Time; CT). Die Gerinnelbildungszeit (Clott Formation Time; CFT) beginnt nach der Gerinnungszeit und misst die Zeit vom Beginn der Gerinnelbildung bis die Amplitude der Gerinnselfestigkeit einen Wert von 20 mm aufweist und gibt Aussagen über die Kinetik der Gerinnung. Diese beiden Messgrößen werden in Sekunden angegeben. Als maximale Gerinnselfestigkeit (Maximal Clott Firmness; MCF) ist die maximale Amplitude definiert, welche die maximale Gerinnselfestigkeit widerspiegelt. Die Beurteilung der Fibrinolyse erfolgt durch Messungen zu einem fortgeschrittenen Zeit-

punkt, wie beispielsweise dem Lyse Index 30 Min. nach der Gerinnungszeit (LI30) oder der Maximalen Lyse (ML).

Im Thrombelastographen sollte *in vitro* die Situation im Blut simuliert werden, wie sie in Pancreaskarzinompatienten während der Erkrankung vorherrschen. Nach Hinzugabe von karzinomatösen Zellen oder MP zu Vollblut gesunder Spender wurden die verschiedenen TEG-Parameter bestimmt.

2.2.4.2.2 Allgemeine Versuchsdurchführung

Der Küvettenhalter stand zunächst auf einem Wärmeblock und wurde auf 37°C vorgewärmt. Die darin eingelegte Kunststoffküvette wurde mit 270 µl citriertem Vollblut von gesunden Spendern befüllt. Danach wurde je Küvette 30 µl Probenlösung hinzu pipettiert und durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren das Gemisch vorsichtig ohne Blasenbildung vermischt. Bei jedem Experiment wurden einer Küvette stets 30 µl Puffer anstatt der Probenlösung hinzugegeben. Daraufhin wurde die Gerinnung durch die Zugabe von 60 µl einer Ca²⁺/Hepes-Lösung gestartet.

2.2.5 Einfluss verschiedener Inhibitoren auf Karzinomzellen sowie deren MP

Um nähere Erkenntnisse zum molekularen Mechanismus der Gerinnungsaktivierung von Pancreaskarzinomzellen sowie deren MP zu erhalten, wurden die folgenden spezifischen Inhibitoren eingesetzt:

Anti-Tissue-Factor-AK (Anti-TF-AK)	Dieser Antikörper richtet sich gegen den TF, welcher als Cofaktor und Rezeptor der Serinprotease FVIIa für die Ausbildung des funktionell aktiven TF-FVIIa-Komplexes zur Aktivierung von FX notwendig ist.
Corn Trypsin Inhibitor (CTI)	CTI inhibiert den aktivierten FXII und somit die Initiierung der Gerinnung durch die Kontaktaktivierung des Gerinnungssystems (Six et al., 2017)
Anti-Tissue-Factor-Pathway-Inhibitor-AK Kunitz 1 [ADG 4903] (TFPI)	TFPI als Plasma-Serinprotease-Inhibitor wird in den vaskulären Endothelzellen synthetisiert und enthält drei Kunitz-Typ Inhibitor-domänen (Broze & Girard, 2012). Dieser monoklonale Antikörper bindet die Kunitz-Typ 1-Domäne des Tissue Factor Pathway Inhibitors. Der Antikörper neutralisiert dadurch TFPI und richtet sich gegen ein Epitop, welches für die Interaktion mit dem TF/FVIIa-Komplex verantwortlich ist.
Anti-Protein-Disulfid-Isomerase-AK [RL 90] (anti-PDI-AK)	Dieser Antikörper inhibiert die Oxidoreduktase PDI, welche an der Bildung von Disulfidbindungen und der Isomerisation am TF beteiligt ist (Reinhardt et al., 2008).
Annexin V	Als zelluläres Protein weist Annexin V eine hohe Affinität zu PS

	auf. Hierbei konkurriert es mit anderen Gerinnungsfaktoren um dieses Phospholipid. Annexin V bildet einen Schild um negativ-geladene Phospholipidmoleküle und inhibiert dadurch Gerinnungsreaktionen und besitzt ebenfalls die Fähigkeit bereits an oberflächliche Phospholipide gebundene Gerinnungsfaktoren wieder zu dissoziieren (Rand, 2000).
Anti-Transmembranprotein-16F-AK [G-14] (Anti-TMEM16F-AK)	TMEM16F ist ein Acht-Transmembran-Protein, welches als kalziumabhängige Phospholipid Scramblase PS an die Zelloberfläche transportiert (Suzuki et al., 2013). PS ist essentiell für die Funktionalität des TF-FVIIa-Komplexes.
Methyl- β -Cyclodextrin	Methyl- β -Cyclodextrin ist ein cyclisches Oligosaccharid bestehend aus 7 Glucosemolekülen und einer polaren Außenfläche, das spezifisch an Membran-Cholesterin bzw. cholesterinreiche Mikrodomänen bindet.
Duramycin	Duramycin gilt mit seinen 19 Aminosäuren als kleinstes Polypeptid mit einer dreidimensionalen Struktur. Es bindet mit einem 1:1 Verhältnis spezifisch an PE (Zhao, Li, & Bugenhagen, 2008). In Gegenwart von PS zeigt PE zwar nur eine geringe prokoagulatorische Aktivität, jedoch reduziert PE drastisch die Notwendigkeit des Vorhandenseins von PS für die TF-FVIIa-Aktivität (Neuenschwander, Bianco-Fisher, Rezaie, & Morrissey, 1995).

2.2.6 Anti-TF-AK

Anti-TF-AK bzw. der entsprechende Kontroll-AK IgG wurden in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Die MP (Endkonzentration 50 $\mu\text{g/ml}$) wurden für 30 Min. mit den beiden Antikörpern bei RT inkubiert und danach gewaschen. Für die FXa-Bildung wurden die MP in 50 μl Resuspuffer gelöst und nach dem Protokoll im Kap. 2.2.2 prozessiert.

Für die Messung im TEG wurden die MP in 30 μl PBS aufgenommen. Direkt nach erfolgter Blutabnahme wurden 270 μl des citrierten Vollblutes in den Küvetten des TEG vorgewärmt, die MP hinzugefügt und die Gerinnung mittels Zugabe von 60 μl Ca^{2+} /Hepes-Lösung gestartet. Das Hinzugeben der Antikörper erfolgte bei den Kontrollmessungen mit Vollblut 1 Min. vor dem Start der Gerinnung durch die Ca^{2+} /Hepes-Lösung.

2.2.7 CTI

270 μl des frisch abgenommenen citrierten Vollblutes wurden den Küvetten zugegeben und mit den 30 μl der MP-Lösung versetzt (50 $\mu\text{g/ml}$). CTI (80 $\mu\text{g/ml}$) wurde kurz vor dem Starten der

Messung mittels 60 μl Ca^{2+} /Hepes-Lösung hinzugegeben. Als Kontrolle erfolgte die Bestimmung der Vollblutgerinnung mit der Vehikellösung PBS.

2.2.8 Annexin V

Intakte bzw. lysierte humane Fibroblasten (2000 Zellen) wurden mit Annexin V (100 nM) in Ca^{++} /PBS-Lösung für 10 Min. bei RT vorinkubiert. Danach wurde die FXa-Bildung bestimmt. Im TEG wurde mit der Zugabe von 2000 Karzinom-Zellen bzw. 50 $\mu\text{g/ml}$ Karzinom-MP das Einsetzen der Fibrinbildung mit vorheriger Inkubation von Annexin V bei RT (5 Min.) mit einer Kalzium/PBS-Lösung (Endkonzentration 100 nM) in den Konzentrationen 100 nM, 200 nM und 500 nM untersucht. Diese unterschiedlichen Konzentrationen dienten zur Festlegung der benötigten Konzentration an Annexin V mit der in den folgenden Versuchen weitergearbeitet wurde. Die Experimente mit intakten und lysierten Karzinomzellen wurden dahingehend abgewandelt, dass die 60 μl Kalzium zum Start der Gerinnung im TEG zuerst in das Vollblut hinzugefügt wurden und danach die mit Annexin V vorinkubierte Probe hineinpipettiert wurde, da das vorgelegte TNC in der Blutabnahmespritze sonst dem Annexin V das Kalzium entziehen könnte.

2.2.9 Anti-TFPI-AK

2.000 bzw. 20.000 intakte bzw. lysierte Karzinomzellen sowie deren MP (50 $\mu\text{g/ml}$) wurden in Resuspuffer suspendiert. Die Gemische wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Anti-TFPI-AK für 15 Min. bei RT vorinkubiert und anschließend die FXa Bildung gemessen.

2.2.10 Anti-TMEM16F-AK

2.000 bzw. 20.000 intakte sowie lysierte Karzinomzellen und deren MP wurden für 15 Min. bei RT mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Anti-TMEM16F-AK präinkubiert und anschließend die Aktivität des Faktor Xa gemessen.

2.2.11 Anti-PDI-AK

2.000 bzw. 20.000 intakte sowie lysierte Pankreaskarzinomzellen bzw. deren MP (50 $\mu\text{g/ml}$) wurden für 15 Min. mit Anti-PDI-AK (20 $\mu\text{g/ml}$) bei RT inkubiert. Danach wurde die FXa Bildung bzw. die Vollblutgerinnung (TEG) bestimmt.

2.2.12 Methyl- β -Cyclodextrin

Die Messung von Faktor Xa unter Einfluss von Methyl- β -Cyclodextrin (5 mM) wurde mit 2.000 bzw. 20.000 intakten sowie lysierten Karzinomzellen bzw. deren MP durchgeführt. Hierbei wur-

den die Zellen eingangs für 30 Min. mit Methyl- β -Cyclodextrin bei RT in Resuspuffer inkubiert und danach zweimal gewaschen.

2.2.13 Duramycin

Zu 2.000 in Vollblut suspendierten bzw. 20.000 intakte sowie lysierte Karzinomzellen bzw. MP wurde Duramycin (5 – 500 nM) bzw. Vehikel zugegeben. Danach erfolgte der Start der Blutgerinnung mit Hilfe von Kalzium (60 μ l Ca^{2+} /Hepes-Lösung).

2.2.13.1 Duramycin-vorinkubierte L3.6pl- und KCP-MP

Vollblut wurde für 5 Min. bei 37°C mit Kollagen in einer Endkonzentration von 10 μ g/ml inkubiert. Zuvor wurden L3.6pl-MP mit 50 μ M Duramycin versetzt und anschließend gewaschen. Danach wurden die in 30 μ l Probenvolumen gelösten MP dem Vollblut in der Küvette hinzugegeben und das Thrombelastogramm mit der Zugabe von 60 μ l Ca^{2+} /Hepes-Lösung gestartet.

Mit der Austestung einer weiteren Zelllinie sollte untersucht werden, ob die Wirkung des Duramycins nicht nur spezifisch auf die orthotopen Pankreaskarzinomzelllinien einen Effekt zeigte, sondern auch die MP anderer Pankreaskarzinomzelllinien durch Duramycin beeinflusst werden. Durch die Vorinkubation der MP von KCP-Zellen, die aus einem transgenen Mausmodell entstammten, wurde ebenfalls die prokoagulatorische Eigenschaft analysiert.

Für die Vollblut-Experimente wurden die KCP-MP für eine Min. bei RT mit einer Endkonzentration von 2, 5, 10, 15 bzw. 25 μ M Duramycin präinkubiert. Bei einem Versuchsaufbau wurde das Volumen der MP/Duramycin-Lösung dann auf 30 μ l mit PBS aufgefüllt und dieses Probenvolumen für die Thrombelastographie verwendet, bei einem weiteren Versuch sind die MP für 30 Min. mit 17.740 x g zentrifugiert und anschließend gewaschen worden. Auch hier wurden die MP danach in 30 μ l PBS aufgenommen und dem Thrombelastographen zugeführt.

2.2.13.2 Wirkung von Duramycin auf HF-Zellen

In die mit citriertem Vollblut gefüllten Küvetten wurde zuerst Duramycin (End-Konz. 25 bzw. 50 μ M) zugegeben. Danach wurden in das Vollblut humane Fibroblasten (1000 Zellen) pipettiert, die in 30 μ l PBS gelöst waren. Die Messung der Gerinnungszeit begann mit dem Hinzufügen von 60 μ l Ca^{2+} /Hepes-Lösung.

2.2.14 Prinzip der konfokalen Mikroskopie

In der konfokalen Laserscanmikroskopie (kLSM) werden mittels Laser Fluorophore eines zu mikroskopierenden Objektes angeregt und dabei das Präparat punktweise abgetastet.

Der Laserstrahl verläuft durch ein Objektiv und trifft dann auf eine Lochblende (Pinhole), wodurch eine beugungsbegrenzte Fokussierung des Lichtes auf das Objekt gewährleistet wird und eine Ausblendung von Strahlen, die nicht in der Fokusebene liegen, garantiert wird. Über einen dichroitischen Spiegel gelangt der Strahl dann auf das Präparat (Abb. 6). Da Fluores-

zenzlicht den Spiegel durchdringen kann, verläuft das Emissionslicht des fluoreszierenden Präparates nun durch den Spiegel und einer weiteren Lochblende zum Photomultiplier, welcher die Strahlung detektiert und in ein elektrisches Signal umwandelt. Da das Objekt Punkt für Punkt durch den Laser abgetastet wurde, ist eine anschließende Rekonstruktion des Bildes notwendig, um eine dreidimensionale Gesamtdarstellung des Präparates zu erhalten.

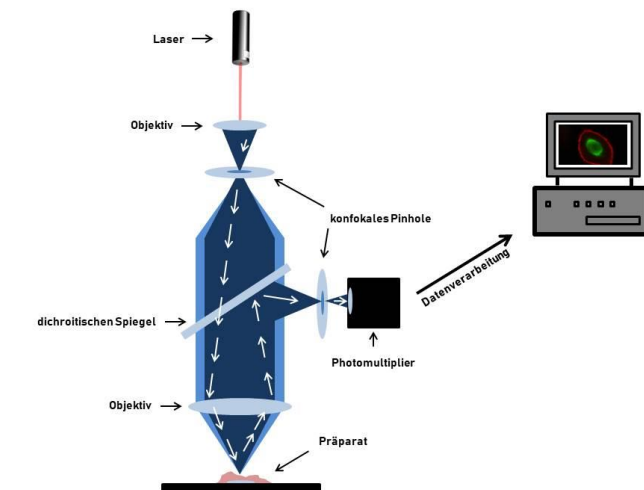


Abb. 6: Prinzip der konfokalen Laserscanmikroskopie

Ein Computer errechnet mit einer entsprechenden Software aus den optischen Schnittbildern der verschiedenen Fokusebenen ein dreidimensionales Bild des Präparates. Der Abstand der einzelnen Schnittbilder in der z-Achse betrug $0,5 \mu\text{m}$.

Die Verwendung unterschiedlicher Fluorophore konnte durch das hier verwendete Laserscanmikroskop LSM 510 Meta (Zeiss) aufgrund der Ausstattung mit einem Argon-Laser für die Emission von blauem bis grünem Licht und durch drei Helium-Neon-Laser für oranges bis rotes Licht ermöglicht werden.

2.2.15 Markierung von CHO-Zellen und L3.6pl-Zellen mit biotinyliertem Duramycin

Zur Darstellung von Phosphatidylethanolamin auf der Plasmamembran von CHO- und L3.6pl-Zellen wurden die Zellen mit biotinyliertem Duramycin inkubiert. Duramycin wurde zuvor mittels Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit nach den Herstellerangaben biotinyliert.

50.000 Zellen wurden jeweils in ein Well einer Zellkulturplatte (μDish , Ibidi) mit $200 \mu\text{l}$ des entsprechenden Zellmediums (ohne FBS) ausgesät. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit biotinyliertem Duramycin ($5 \mu\text{M}$) unter Hinzugabe eines mit einem Fluorophor gekoppelten anti-Biotin-Antikörpers bei RT in Dunkelheit. Die Kontrolle erfolgte mit dem Fluoreszenzantikörper alleine ohne Zugabe von Duramycin.

2.2.16 Färbungen der Zellen mit FM 4-64FX und Vybrant DiO

Um eine mögliche Interaktion von L3.6pl-MP mit Erythrozyten zu analysieren, wurden Erythrozyten mit dem Fluorophor FM 4-64FX markiert sowie die MP mit Vybrant DiO. Danach wurden die markierten Erythrozyten mit den markierten MP über einen Zeitraum von einer Stunde inkubiert. Käme es zu einer Fusion der MP mit der Plasmamembran der Erythrozyten, würde im konfokalen Mikroskop eine Überlagerung der unterschiedlichen Fluoreszenzfärbungen der MP sowie der Erythrozytenmembran resultieren.

In unterschiedlichen Versuchen wurden die Plasmamembranen sowohl der L3.6pl-MP, CHO-Zellen, L3.6pl-Zellen als auch der Erythrozyten mittels FM 4-64FX markiert. In wässrigen Lösungen zeigt dieser Membranmarker nur eine schwache Fluoreszenz, im lipophilen Milieu der Plasmamembran hingegen kommt es zu einem starken roten Leuchtsignal. Der hier verwendete Fluorophor bietet aufgrund einer spezifischen Modifikation auch den Vorteil, dass es nicht zu einer Translokation des Farbstoffes bei Fixierung der Zellen und MP mit aldehydhaltigen Reagenzien kommt.

Zur Markierung der MP wurde das gewonnene citrierte Vollblut gesunder Probanden im Verhältnis 1:1000 mit Resuspuffer verdünnt. 1 µg MP wurde zu 100 µl des verdünnten Blutes hinzugegeben. Zuvor wurden die MP für 15 Min. mit Duramycin (5 µM Endkonzentration) vorinkubiert. 3 Min. vor dem Waschen der MP wurde der FM 4-64FX Farbstoff im Verhältnis 1:30 dem Probenvolumen hinzugesetzt.

Bei den Internalisierungsversuchen wurden zusätzlich zu den MP auch die Erythrozytenmembranen mit FM 4-64FX eingefärbt. Die Wells einer Zellkulturplatte (µDish, Ibidi) wurden mit Poly-L-Lysin (1:10 mit H₂O verdünnt) gecoatet und für 15 Min. bei 37°C gelagert und anschließend mit dest. H₂O gewaschen und feucht gehalten. Die MP wurden mit Duramycin (5 bzw. 20 µM) vorinkubiert. Dann wurde zu jedem Well 2 µg fluoreszenz-markierte L3.6pl-MP in 200 µl citriertem Vollblut (Verdünnung mit HEPESpuffer 1:1000) hinzugegeben. Zur Fixierung der Zellen wurde nach 1, 30 und 60 Min. 2 % Paraformaldehyd (PFA) und daraufhin der FM 4-64FX Farbstoff in das MP/Blut-Gemisch hinein pipettiert.

2.2.17 Quantitative Analyse und Statistik

Zur quantitativen Auswertung der konfokalmikroskopischen Bilder wurde die Software LSM 510 Release 4.0 der Firma Zeiss verwendet. Die statistische Auswertung zur Berechnung der Signifikanz der Stichproben wurde mit der Software GraphPad Prism 9.0.0 durchgeführt. Unverbundene und nicht normalverteilte Stichproben wurden mittels One Way ANOVA-Test verglichen. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) und ein p-Wert von <0,05 galt als statistisch signifikant.

3 Ergebnisse

3.1 Mechanismen der Gerinnungsaktivierung durch Karzinomzellen und deren MP *in vitro*

Um den Einfluss humaner Fibroblasten bzw. von Pankreaskarzinomzellen und ihrer MP auf die Aktivierung der Blutgerinnung zu untersuchen, wurden Koagulationsassays zur Bildung der Gerinnungsfaktoren Xa und XIIa *in vitro* verwendet.

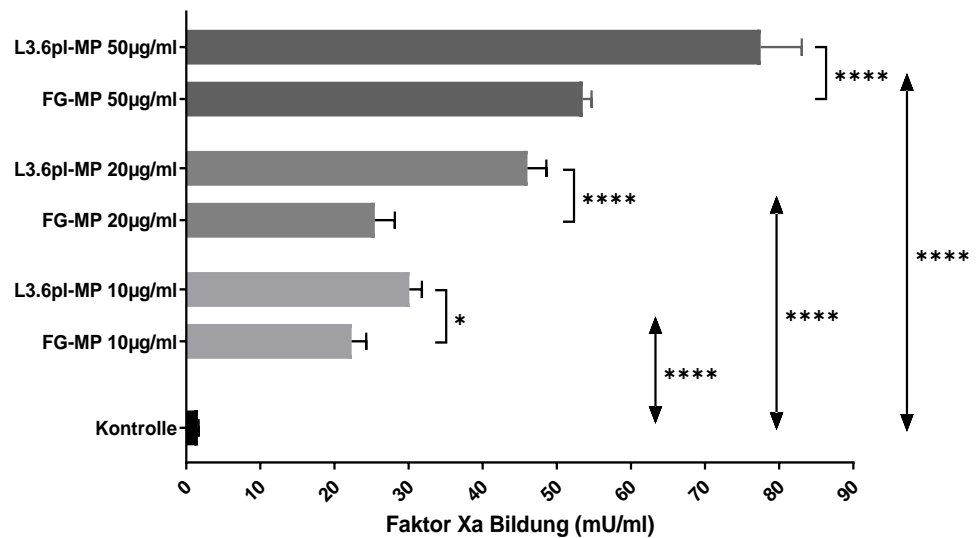
3.1.1 Faktor Xa Aktivitätsmessung

3.1.1.1 Einfluss der MP von Karzinomzellen auf die Gerinnung

In Anwesenheit von L3.6pl-MP kam es zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der FXa Aktivität gegenüber der Kontrolle ohne MP (Abb. 7). Die MP der stark metastasierenden Zelllinie L3.6pl zeigten verglichen mit MP der FG-Zelllinie eine stärkere Aktivierung des Faktor X (Abb. 7).

Abb. 7: Bestimmung der Faktor Xa Bildung durch Pankreaskarzinom-MP der Zelllinien L3.6pl und FG

Messung der Faktor Xa Aktivität im chromogenen Assay. Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), * p<0,05, **** p<0,0001 gegenüber Kontrolle sowie Pankreaskarzinom-MP. One Way ANOVA for multiple comparisons.



3.1.1.2 Einfluss intakter und lysierter Karzinomzellen auf die Gerinnung

Lysierte L3.6pl-Zellen induzierten hierbei die ausgeprägteste Aktivierung von Faktor X. Dieses zeigte sich sowohl im Fall von 500 Zellen als auch bei 2000 Zellen (Abb. 8 A + B). Im Fall der lysierten L3.6pl-Zellen (2000) war die Faktor Xa Bildung am stärksten ausgeprägt. Die lysierten FG-Zellen stimulierten hingegen die FXa Bildung nur geringfügig (Abb. 8 B).

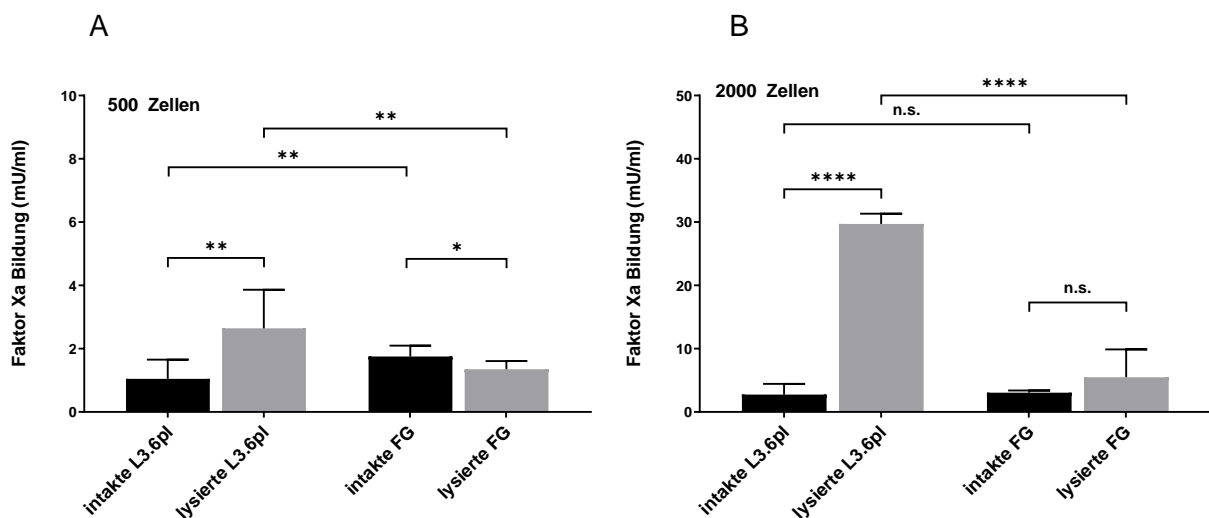


Abb. 8: Faktor Xa Bildung durch 500 (A) bzw. 2000 (B) intakte und lysierte L3.6pl- bzw. FG-Zellen

Die Bildung von Faktor Xa wurde mit einem chromogenen Assay analysiert. Hierbei wurden jeweils 500 (A) bzw. 2000 (B) Karzinomzellen eingesetzt. Mittelwerte \pm SD, n=9, n.s.=nicht signifikant, * p<0,05, ** p<0,01, **** p<0,0001 gegenüber entsprechenden intakten Zellen. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.2 Intrinsischer und extrinsischer Blutgerinnungsweg

Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Weg führen zur Aktivierung von Faktor X. Um zwischen diesen Wegen zu differenzieren, wurde die Rolle der jeweiligen Starterproteine Faktor XII und TF untersucht.

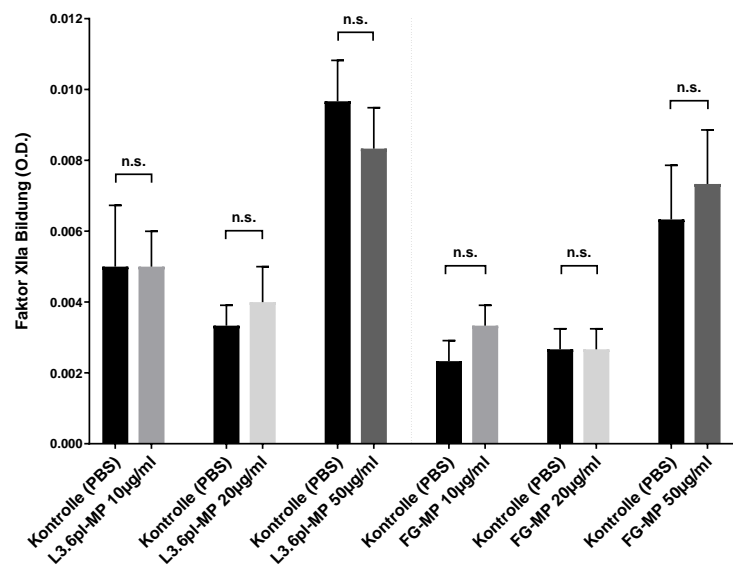
3.1.2.1 Intrinsische Blutgerinnung

3.1.2.1.1 Wirkung der Tumor-MP auf die Faktor XIIa Bildung

Keine der getesteten Konzentrationen von L3.6pl- und FG-MP induzierte die Bildung von FXIIa (Abb. 9).

Abb. 9: Faktor XIIa Bildung durch Pankreaskarzinom-MP

Zur Bestimmung der Faktor XIIa Bildung wurde ein chromogener Assay angewandt. Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant gegenüber jeweiliger Kontrolle (PBS). One Way ANOVA for multiple comparisons.



3.1.2.2 Extrinsische Blutgerinnung

3.1.2.2.1 Beteiligung von TF

Um zu prüfen, welchen Einfluss MP-assoziiertes TF an der Gerinnungsaktivierung hat, wurde im chromogenen Assay die Bildung von FXa in Ab- und Anwesenheit von Anti-TF-AK gemessen. Nach Zugabe des Anti-TF-AK resultierte eine massive Inhibierung der durch L3.6pl- bzw. FG-MP induzierten Faktor Xa Bildung im Vergleich zur Isotyp-AK-Kontrolle (Abb. 10).

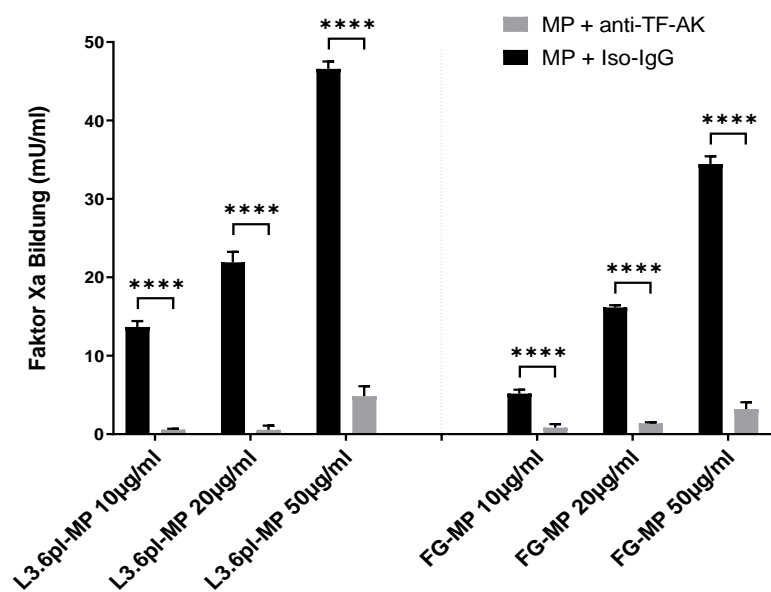


Abb. 10: Faktor Xa Aktivitätsmessung mit Pankreaskarzinom-MP der Zelllinien L3.6pl und FG

In einem chromogenen Faktor Xa Assay wurden Proben mit 10, 20 und 50 µg/ml L3.6pl- bzw. FG-MP getestet. Die Messung der Faktor Xa Aktivität erfolgte nach Zugabe von Anti-TF-AK bzw. dem Isotyp-AK (10 µg/ml). Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), **** p<0,0001 gegenüber Pankreaskarzinom-MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3 Vollblutgerinnung

Die Zugabe von 1000 intakten bzw. lysierten Tumorzellen führte zu einem schnelleren Eintreten der Fibrinbildung im Vollblut (Abb. 11). Die prokoagulatorische Aktivität der L3.6pl- und FG-Zellen konnte durch Lyse deutlich gesteigert werden.

Die L3.6pl- und FG-Zellen untereinander zeigten keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 11). Diese Ergebnisse entsprachen weitgehend den Ergebnissen zur FXa Bildung.

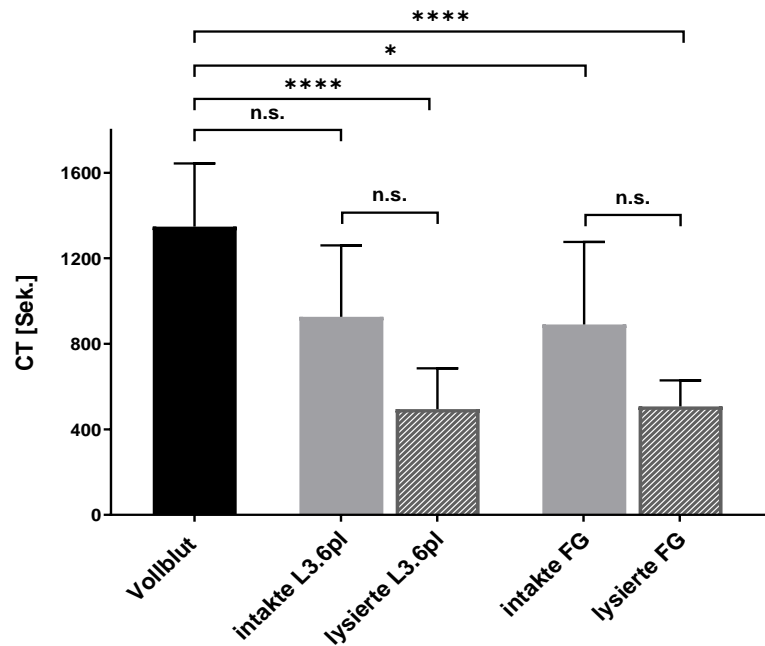
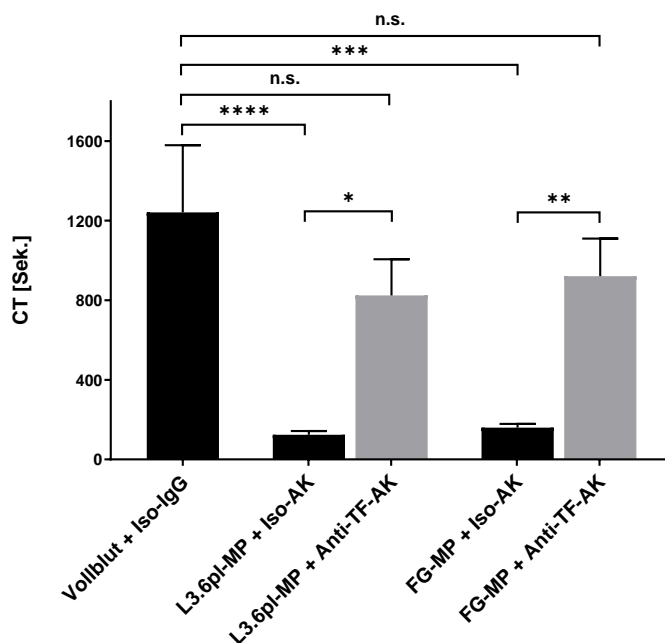


Abb. 11: Messung der Fibrinbildung im Vollblut in Anwesenheit verschiedener intakter bzw. lysierter Zellen

Mittels TEG wurden die Gerinnungszeit von citriertem Vollblut mit je 1000 Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie L3.6pl und FG gemessen. Mittelwerte \pm SD, n=5, n.s.=nicht signifikant, * p<0,05, **** p<0,0001 gegenüber den entsprechenden intakten Zellen bzw. Vollblut. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.1 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-TF-AK



Nach Zugabe der mit Anti-TF-AK vorinkubierten L3.6pl- und FG-MP zu Vollblut war die Fibrinbildung wesentlich verlängert.

Hierbei unterschieden sich die Gerinnungszeiten der mit Anti-TF-AK vorinkubierten MP nur noch gering von Anti-TF-AK vorinkubierten Vollblut-Probe ohne MP (Abb. 12).

Abb. 12: Fibrinbildung durch Anti-TF-AK vorinkubierte Pankreaskarzinom-MP

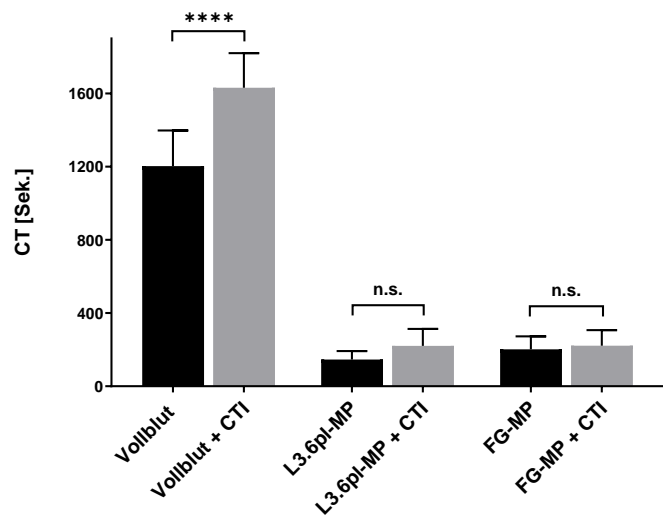
Die CT von zuvor mit 50 μ g/ml Anti-TF-AK präinkubierten Pankreaskarzinom-MP wurde im Thrombelastographen gemessen. Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 gegenüber Vollblut + Iso-IgG bzw. Pankreaskarzinom-MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.2 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Corn Trypsin Inhibitor

Nach Inhibierung des Starterproteins Faktor XIIa durch Komplexbildung mit CTI zeigte sich eine verspätete Fibrinbildung in der Kontrolle (Abb. 13). Nach Zugabe der Karzinom-MP kam es jedoch zu keiner Veränderung der Fibrinbildung in Anwesenheit der MP.

Abb. 13: Bestimmung der Fibrinbildung durch Pankreaskarzinom-MP nach Zugabe von CTI

Je 50 µg/ml der karzinomatösen MP wurden mit 50 µg/ml CTI im TEG eingesetzt und die CT bestimmt. Die Kontrollmessung erfolgte ohne den Einsatz von MP. Mittelwerte ± SD, n=4, n.s.=nicht signifikant, **** p<0,0001 gegenüber Vollblut bzw. Pankreaskarzinom-MP. One Way ANOVA for multiple comparisons.



3.1.3.3 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Annexin V

Nach Zugabe von Annexin V war sowohl bei den intakten Fibroblasten als auch bei den lysierten Fibroblasten die Faktor Xa Bildung deutlich herabgesetzt (Abb. 14).

Die lysierten Zellen weisen allgemein in diesem prokoagulatorischen Assay eine erhöhte Aktivität des FXa gegenüber den intakten Zellen auf. Im Vollblut induzierte Annexin V im Falle der L3.6pl-Zellen eine dosisabhängig verzögerte Fibrinbildung (Abb. 15 A). Dieser Effekt liess sich im Fall der FG-Zellen bzw. der MP beider Zelllinien nicht reproduzieren (Abb. 15 A + B). Wurde jedoch die Ca²⁺/Hepes-Lösung anstatt wie sonst zum Schluss als Startlösung der Gerinnung ins Vollblut im TEG hinzugegeben und anschließend die Probe mit Annexin V versetzt, wurde die prokoagulatorische Aktivität aller drei Zelllinien (L3.6pl, FG) verringert (Abb. 15 C). Dieser Effekt wurde sowohl im Fall der intakten als auch der lysierten Zellen betrachtet, wobei die Fibrinbildung bei lysierten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden intakten Zellen immer früher eintrat (Abb. 15 C).

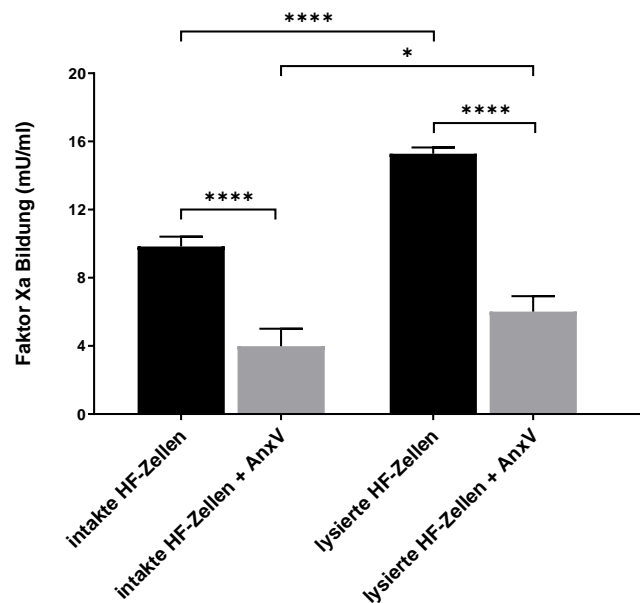
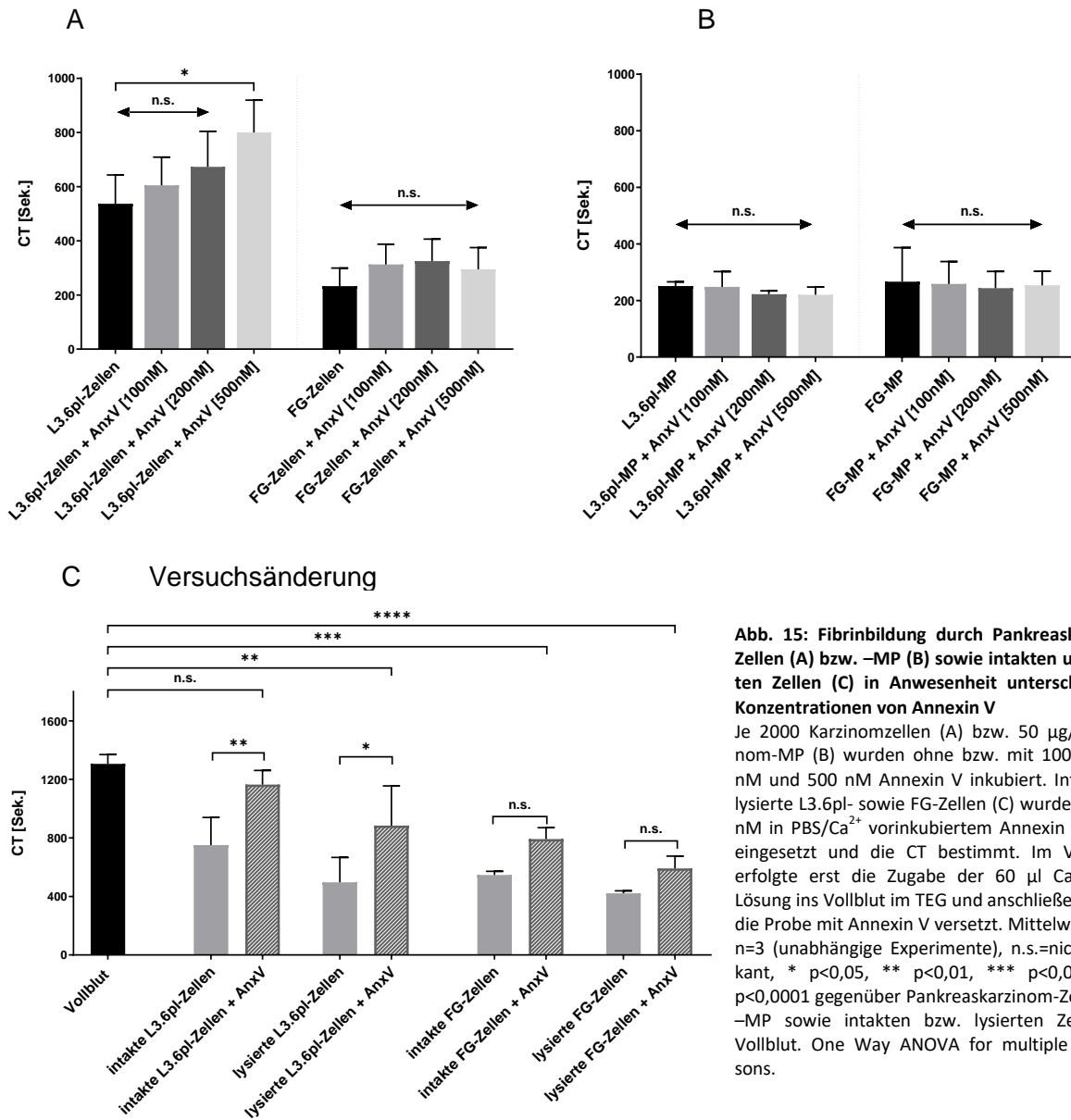


Abb. 14: Wirkung von Annexin V auf die Faktor Xa Bildung durch HF-Zellen

100 nM Annexin V wurden mit PBS/Ca²⁺ vorinkubiert. Für die Faktor Xa Aktivierung wurden je 2000 humane Fibroblasten mit/ohne 100 nM Annexin V inkubiert. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), * p<0,05, **** p<0,0001 gegenüber intakten bzw. lysierten HF-Zellen. One Way ANOVA for multiple comparisons.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von Annexin V die Anwesenheit von Ca^{2+} im Vorinkubationsmedium erfordert und dass die PS-Exposition für die prokoagulatorische Aktivität der Karzinomzellen und ihrer MP mitverantwortlich ist.



3.1.3.4 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-TFPI-AK

In Anwesenheit des Anti-TFPI-Antikörpers wurde die Faktor Xa Bildung sowohl bei Konzentrationen von 2.000 als auch 20.000 intakten und lysierten Krebszellen nicht beeinflusst (Abb. 16 A). Die leicht erhöhte FXa Bildung nach Inhibierung von TFPI bei 2.000 lysierten FG-Zellen wurde in den Experimenten mit 20.000 Zellen nicht bestätigt. Auch die Faktor Xa Bildung durch die karzinomatösen MP wurde durch Inhibierung des TFPI nicht beeinflusst (Abb. 16 B).

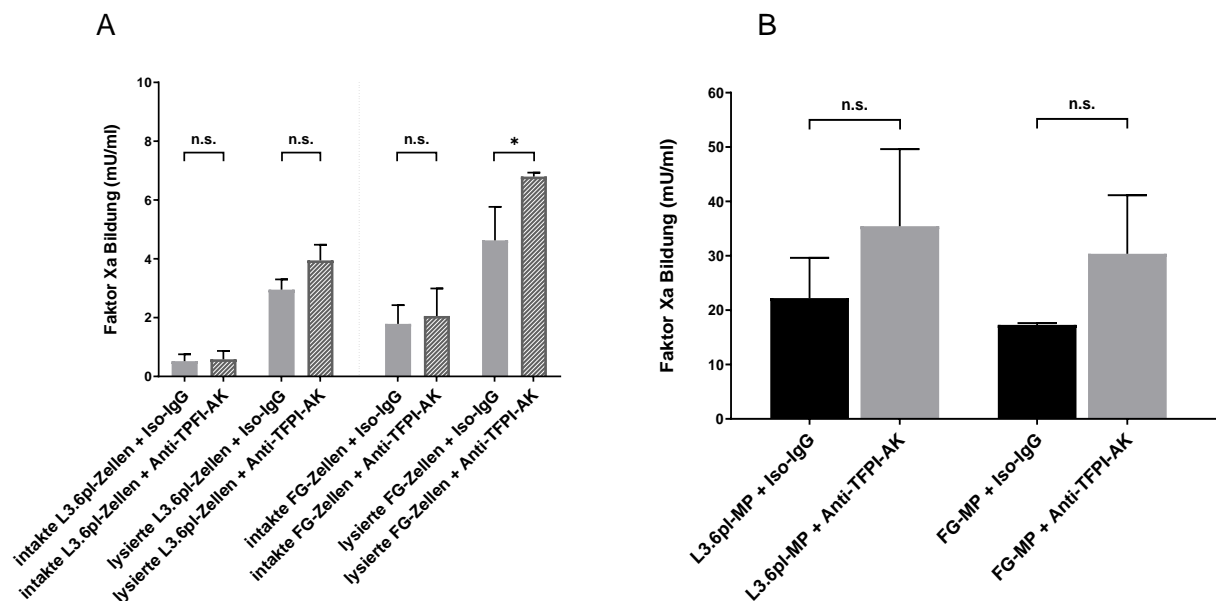


Abb. 16: Faktor Xa Bildung durch intakte und lysierte Pankreaskarzinomzellen (A) sowie deren MP (B) nach Zugabe von Anti-TPFI-AK
 In Anwesenheit von je 2.000 (A) intakten sowie lysierten Pankreaskarzinomzellen wurde im chromogenen Assay die Faktor Xa Bildung unter dem Einfluss von 10 µg/ml Anti-TPFI-AK bzw. Iso-IgG sowie karzinomatösen MP (B) bestimmt. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant, * p<0,05 gegenüber intakte Pankreaskarzinom-Zellen bzw. -MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.5 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-TMEM16F-AK

In Anwesenheit des Anti-TMEM16F-AK war die prokoagulatorische Aktivität der lysierten Karzinomzellen, nicht jedoch der intakten Karzinomzellen gesteigert (2000 Zellen; Abb. 17 A). Im Fall der karzinomatösen MP waren keine Wirkungen des Anti-TMEM16F-AK festzustellen (Abb. 17 B).

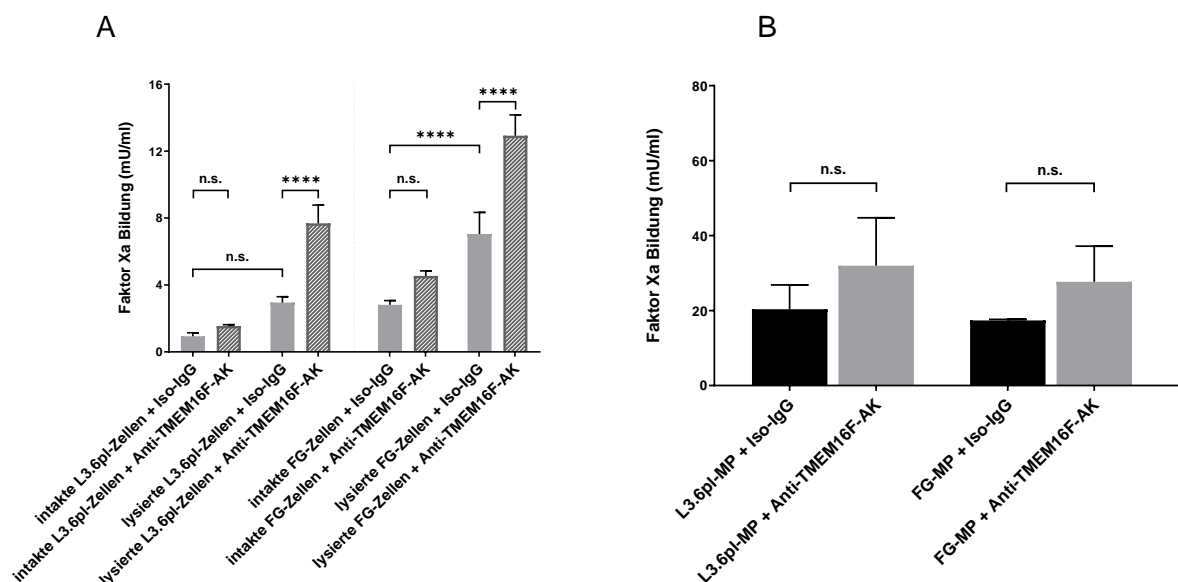


Abb. 17: Wirkung von Anti-TMEM16F-AK auf die Bildung von Faktor Xa durch Karzinomzellen (A) und deren MP (B)
 Die Messung der FXa Aktivität der 2.000 (A) intakten und lysierten Krebszellen sowie von deren MP (B) erfolgte nach Zugabe von je 10 µg/ml Anti-TMEM16F-AK bzw. Iso-IgG. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant, **** p<0,0001 gegenüber intakte Pankreaskarzinom-Zellen bzw. -MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.6 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Anti-PDI-AK

Unter dem Einfluss von Anti-PDI-AK (20 µg/ml) zeigte sich im Faktor Xa Assay keine Änderung der Faktor Xa Bildung durch die Karzinomzellen (Abb. 18 A). Auch bei den MP kam es durch

Zugabe des Anti-PDI-AK zu keinem eindeutigen Effekt, eher wurde die Aktivität durch die Inhibierung der PDI noch leicht gesteigert (Abb. 18 B).

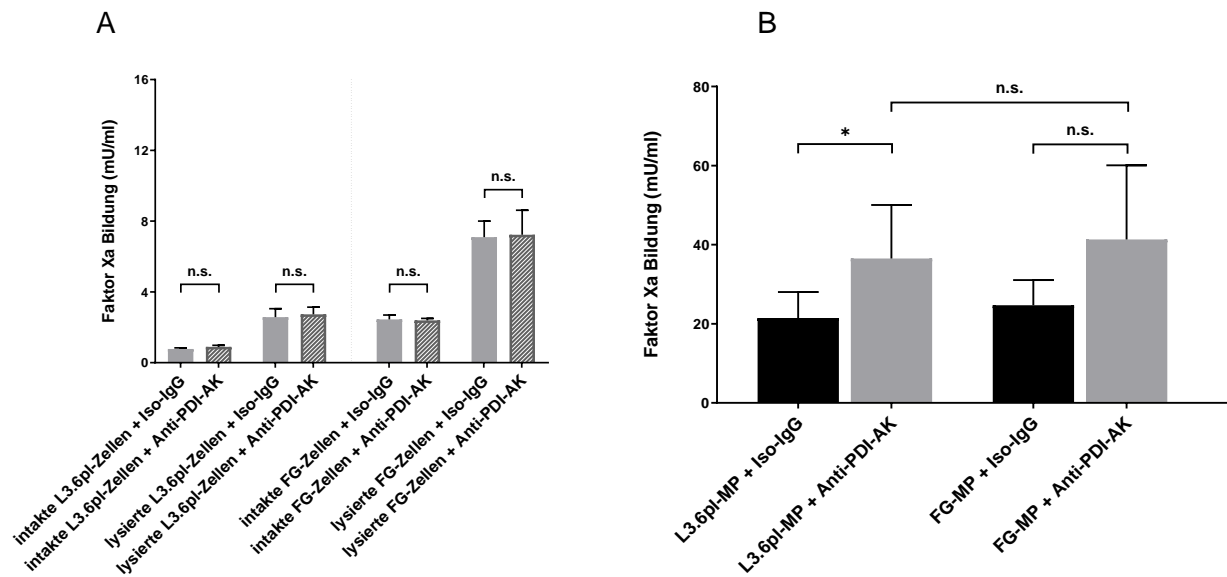


Abb. 18: Faktor Xa Bildung durch Karzinomzellen- (A) bzw. deren MP (B) unter Einfluss von Anti-PDI-AK

Je 2.000 (A) intakte und lysierte Pankreaskarzinomzellen sowie deren MP (50 µg/ml, B) wurden in einen chromogenen Faktor Xa Assay eingesetzt. Zuvor wurden die Zellen und MP mit 20 µg/ml Anti-PDI-AK bzw. Iso-IgG vorinkubiert. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant, * p<0,05 gegenüber intakte Pankreaskarzinom-Zellen bzw. -MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

Die durch L3.6pl- bzw. FG-MP induzierte Vollblut-Fibrinbildung war nach Zugabe des Anti-PDI-AK bei L3.6pl- und FG-MP unverändert (Abb. 19).

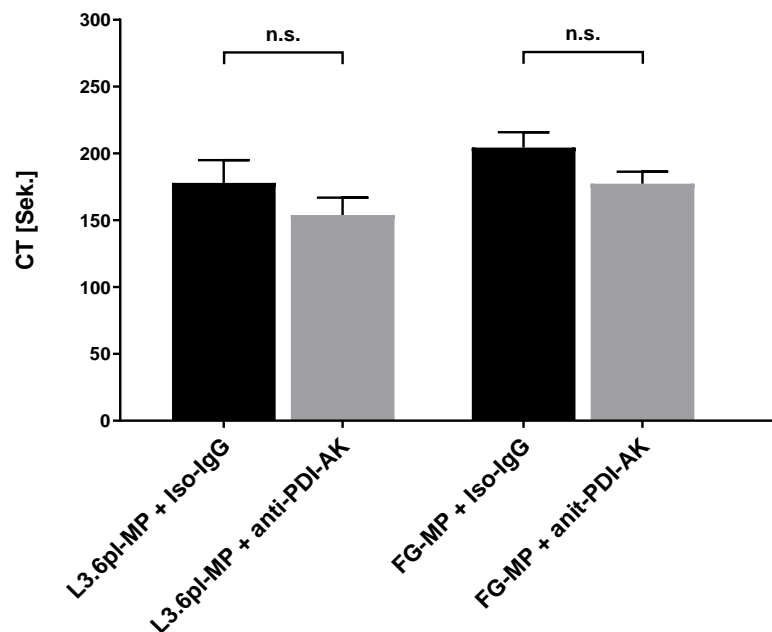


Abb. 19: Bestimmung der Fibrinbildung durch Pankreaskarzinom-MP im Vollblut nach Zugabe von Anti-PDI-AK

Nach Zugabe von je 50 µg/ml karzinomatöser MP zusammen mit 20 µg/ml Anti-PDI-AK bzw. Iso-IgG im TEG wurde die Fibrinbildung bestimmt. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant gegenüber Pankreaskarzinom-MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.7 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Methyl-β-Cyclodextrin

Unter der Wirkung von Methyl-β-Cyclodextrin (5 mM/ml) zeigt sich bei der FXa Aktivitätsmessung mit 2.000 intakten und lysierten Zellen keine signifikante Änderung der FXa Bildung (Abb. 20 A), wohingegen im Fall der höheren Tumorzellkonzentration insbesondere die intakten L3.6pl-Zellen eine deutlich gehemmte FXa Bildung unter Einfluss von Methyl-β-Cyclodextrin zeigten. Auch die lysierten Zellen beider Zelllinien (L3.6pl und FG) zeigten eine verminderte

FXa Bildung (Abb. 20 B). Die MP hingegen wurden durch die Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin nicht beeinflusst (Abb. 20 C).

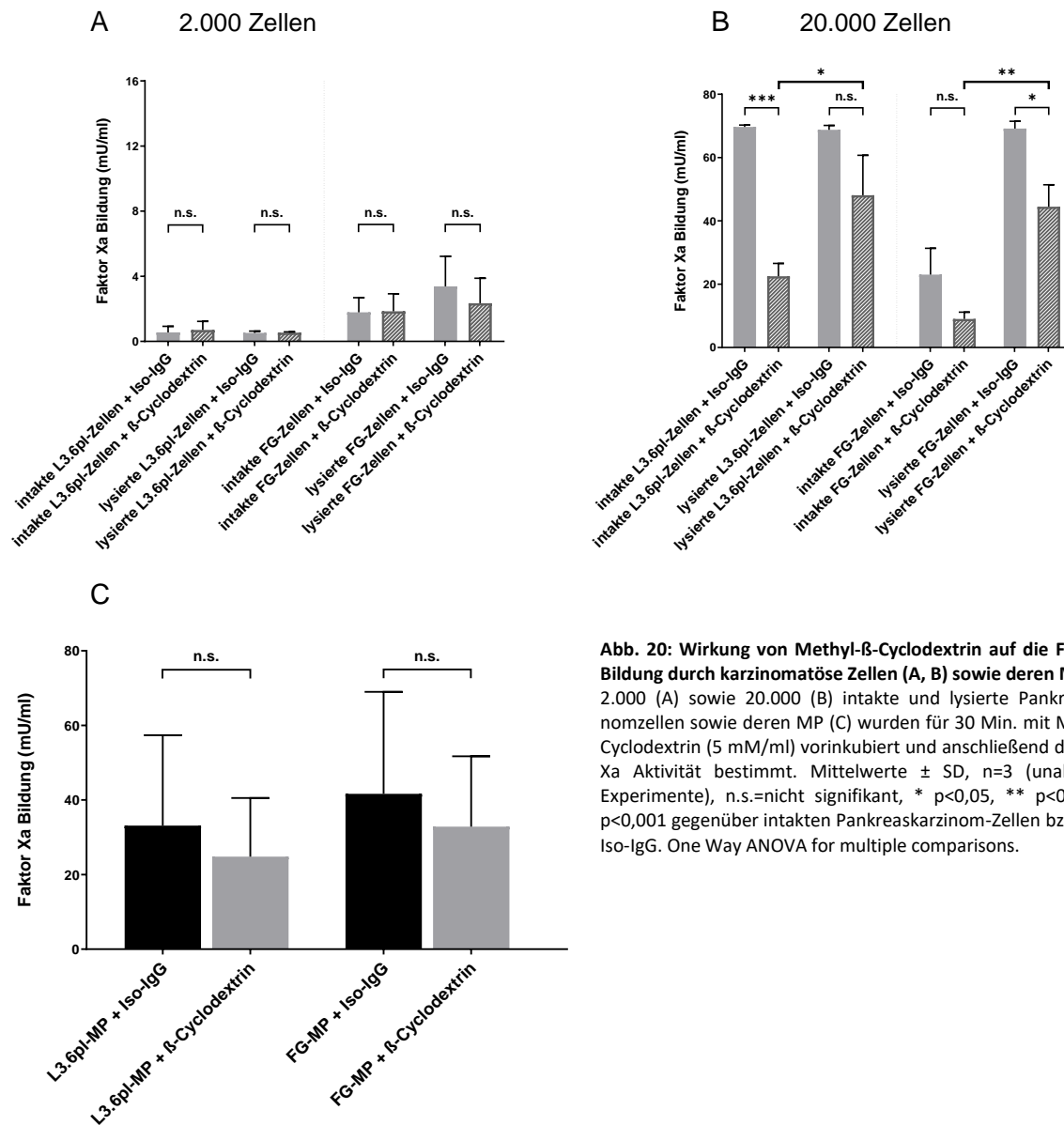


Abb. 20: Wirkung von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Faktor Xa Bildung durch karzinomatöse Zellen (A, B) sowie deren MP (C) 2.000 (A) sowie 20.000 (B) intakte und lysierte Pankreaskarzinomzellen sowie deren MP (C) wurden für 30 Min. mit Methyl- β -Cyclodextrin (5 mM/ml) vorinkubiert und anschließend die Faktor Xa Aktivität bestimmt. Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 gegenüber intakten Pankreaskarzinom-Zellen bzw. -MP + Iso-IgG. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.8 Beeinflussung der Fibrinbildung durch Duramycin

Um die Beteiligung der PE-Exposition an der Gerinnungsaktivierung durch Tumorzellen bzw. deren MP zu detektieren, wurden FXa Assays nach Zugabe von je 500 μ M Duramycin durchgeführt. Sowohl bei den Versuchsansätzen mit 2.000 intakten und lysierten Krebszellen als auch bei den 20.000 Zellen induzierte Duramycin eine deutliche Hemmung der Faktor Xa Bildung (Abb. 21 A und B). Besonders wurde diese Inhibierung in den Ansätzen mit 20.000 Zellen deutlich (Abb. 21 B). Zu einer massiven Hemmung der Faktor Xa Bildung durch die Zugabe von Duramycin kam es ebenfalls bei den Versuchen mit je 50 μ g/ml MP (Abb. 21 C).

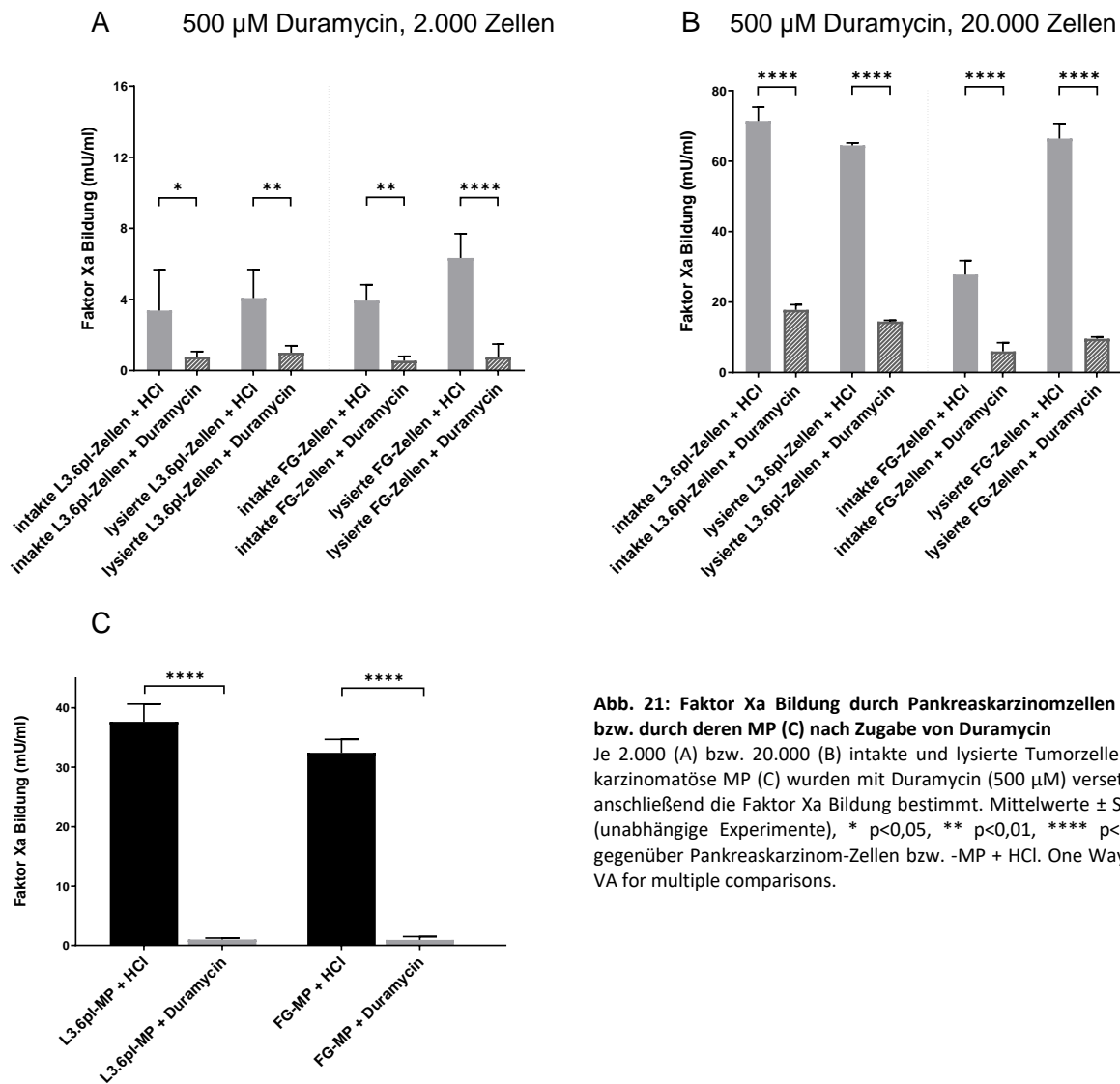


Abb. 21: Faktor Xa Bildung durch Pankreaskarzinomzellen (A, B) bzw. durch deren MP (C) nach Zugabe von Duramycin

Je 2.000 (A) bzw. 20.000 (B) intakte und lysierte Tumorzellen bzw. karzinomatöse MP (C) wurden mit Duramycin (500 μ M) versetzt und anschließend die Faktor Xa Bildung bestimmt. Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), * p<0,05, ** p<0,01, **** p<0,0001 gegenüber Pankreaskarzinom-Zellen bzw. -MP + HCl. One Way ANOVA for multiple comparisons.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob auch geringere Konzentrationen von Duramycin die FXa Bildung beeinflussen. Die prokoagulatorische Aktivität von 20.000 intakten und lysierten Tumorzellen wurde auch mit einer 20-fach geringeren Konzentration an Duramycin (25 μ M) noch deutlich vermindert (Abb. 22 A). Duramycin (25 μ M) inhibierte auch drastisch die MP-induzierte Faktor Xa Bildung (Abb. 22 B). Wie in Abb. 22 C gezeigt, kommt es bei geringeren Duramycin-Konzentrationen als 25 μ M zu keiner Beeinflussung der prokoagulatorischen Aktivität.

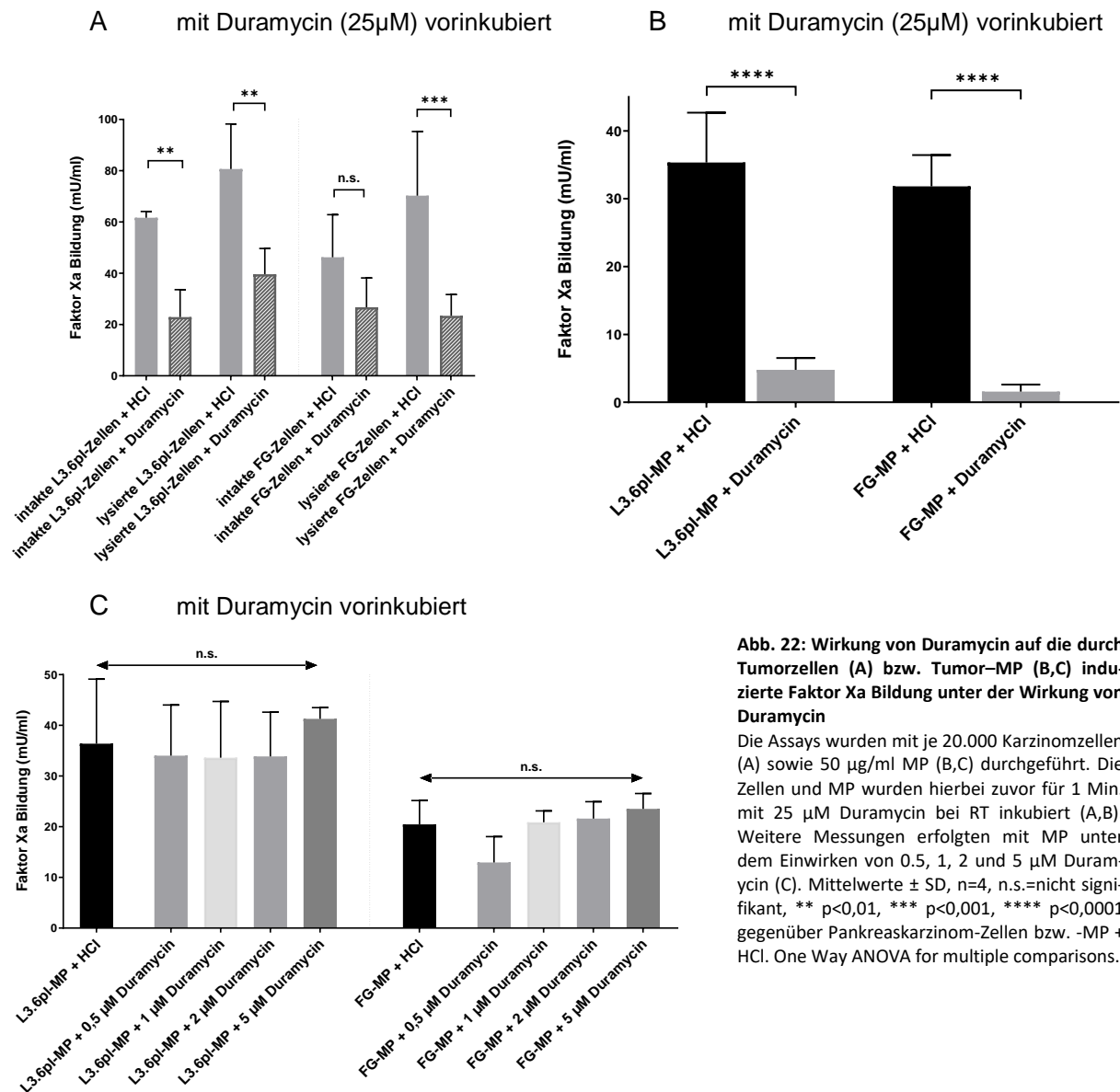
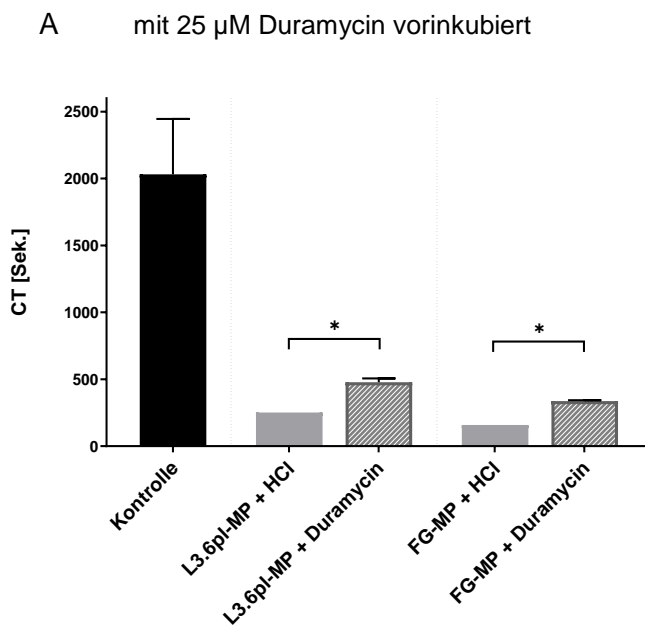


Abb. 22: Wirkung von Duramycin auf die durch Tumorzellen (A) bzw. Tumor-MP (B,C) induzierte Faktor Xa Bildung unter der Wirkung von Duramycin

Die Assays wurden mit je 20.000 Karzinomzellen (A) sowie 50 µg/ml MP (B,C) durchgeführt. Die Zellen und MP wurden hierbei zuvor für 1 Min. mit 25 µM Duramycin bei RT inkubiert (A,B). Weitere Messungen erfolgten mit MP unter dem Einwirken von 0,5, 1, 2 und 5 µM Duramycin (C). Mittelwerte ± SD, n=4, n.s.=nicht signifikant, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001 gegenüber Pankreaskarzinom-Zellen bzw. -MP + HCl. One Way ANOVA for multiple comparisons.

Um den Einfluss von Duramycin unter möglichst physiologischen Bedingungen zu ermitteln, wurden die mit Duramycin präinkubierten Tumorzellen und Tumor-MP auch mittels TEG untersucht. Im Vollblut zeigte sich bei den eingesetzten MP unter Einfluss von Duramycin ein ver-

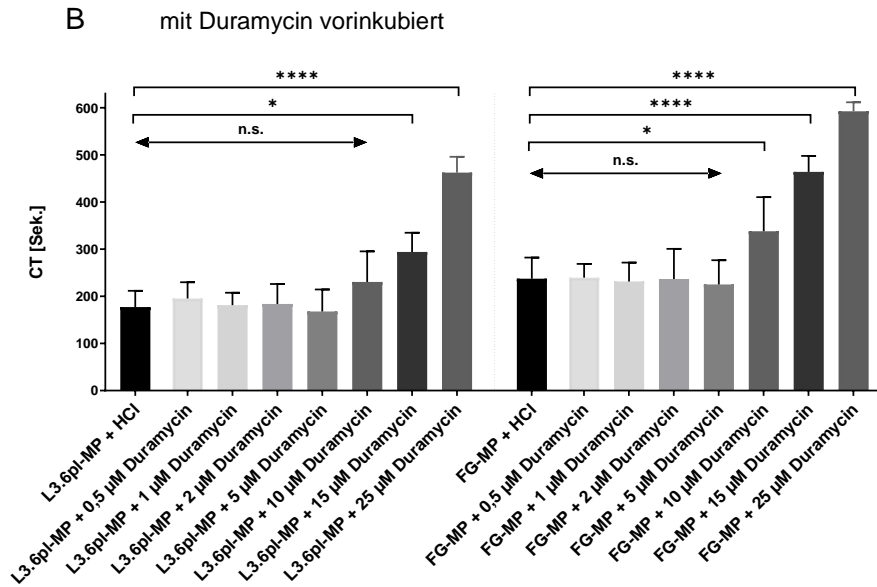


spätetes Einsetzen der Fibrinbildung. Hierbei war die Zeit bis zur Fibrinbildung unter Duramycin fast doppelt so lang wie unter Kontrollbedingungen (Mittelwerte mit/ohne Duramycin: L3.6pl 478 Sek./252 Sek. sowie FG 338 Sek./159 Sek.) (Abb. 23 A). Auch im Fall einer geringeren Konzentration (10 µM) induzierte Duramycin

Abb. 23: Fibrinbildung im Vollblut durch Pankreaskarzinom-MP in Anwesenheit von Duramycin (A,B).

Die Gerinnungszeit (CT) wurde mittels TEG bestimmt. Hierbei wurden 50 µg/ml MP eingesetzt und die angegebenen Duramycin-Konzentrationen gemessen. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant, * p<0,05, **** p<0,0001 gegenüber Pankreaskarzinom-MP + HCl. One Way ANOVA for multiple comparisons.

noch eine Verlängerung der Fibrinbildungszeit (Abb. 23 B).



3.1.3.8.1 Zugabe von Duramycin zu Vollblut vor Zugabe der MP

In weiteren Experimenten wurde Duramycin dem Vollblut hinzugegeben, bevor die MP zugegeben wurden. Unter diesen Bedingungen zeigte Duramycin keine Wirkung auf die prokoagulatorische Aktivität der MP (Abb. 24).

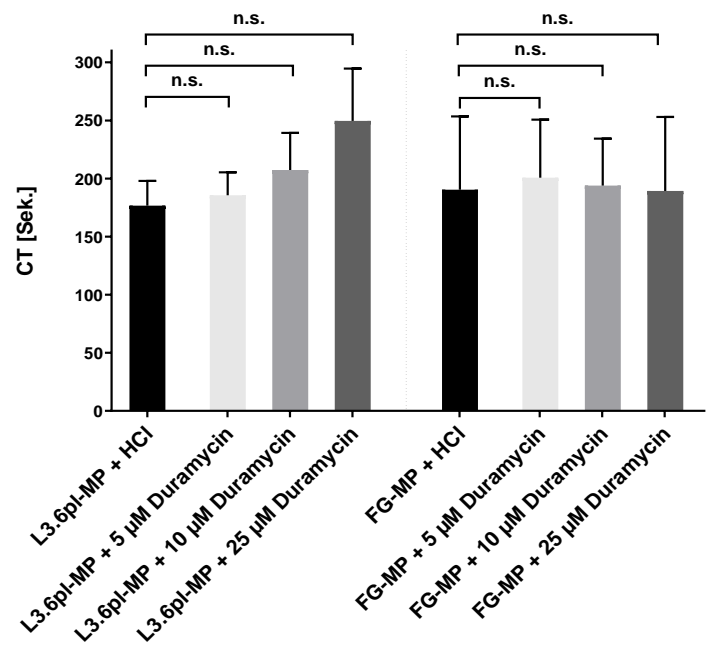


Abb. 24: Messung der durch Pankreaskarzinom-MP induzierten Fibrinbildung in Anwesenheit von direkt applizierten Duramycin. Nach Zugabe von 5, 10 sowie 25 µM Duramycin ins Vollblut wurden je 50 µg/ml karzinomatöse MP hinzugefügt und im TEG die Fibrinbildung bestimmt. Mittelwerte ± SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant gegenüber Pankreaskarzinom-MP + HCl. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.1.3.9 Wirkung von Duramycin auf die Gerinnung mit HF-Zellen

Abb. 25 zeigt, dass die durch HF-Zellen induzierte Fibrinbildung im Vollblut durch die Zugabe der Vehikellösung HCl, in welcher Duramycin gelöst wurde, nicht beein-

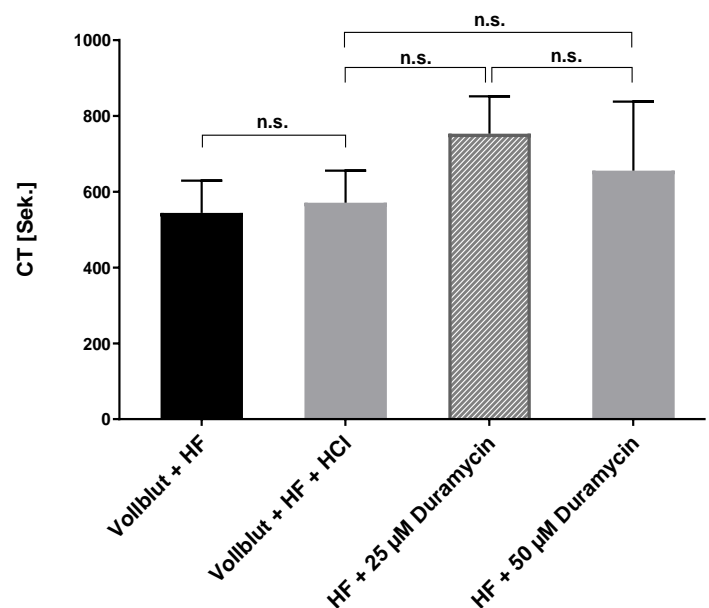


Abb. 25: Vollblutgerinnung durch humane Fibroblasten in Anwesenheit von Duramycin

Im TEG wurde die Gerinnungszeit von citriertem Vollblut nach Zusatz von 1000 humanen Fibroblasten gemessen. In weiteren Ansätzen wurde zu den im Vollblut befindlichen Fibroblasten die Vehikellösung HCl bzw. Duramycin in einer Endkonzentration von 25 µM bzw. 50 µM hinzugegeben. Mittelwerte ± SD, n=4, n.s.=nicht signifikant. One Way ANOVA for multiple comparisons.

flusst wird. Durch die Zugabe von Duramycin wurde die Gerinnungszeit nicht verzögert. Dies bedeutet, dass die hemmende Wirkung von Duramycin auf die prokoagulatorische Aktivität möglicherweise karzinomzellspezifisch ist.

3.1.3.10 Wirkung von Duramycin auf MP der KCP-Zellen

Um den Effekt von Duramycin auf eine Maus-Karzinomzelle zu testen, wurde die KCP-Zelllinie verwendet.

Duramycin hemmt die prokoagulatorische Aktivität der KCP-MP in einer Konzentration von 25 μM (Abb. 26 A). Dies war unabhängig davon, ob die MP nach der Vorinkubation mit Duramycin gewaschen wurden oder nicht (Abb. 26 A und B).

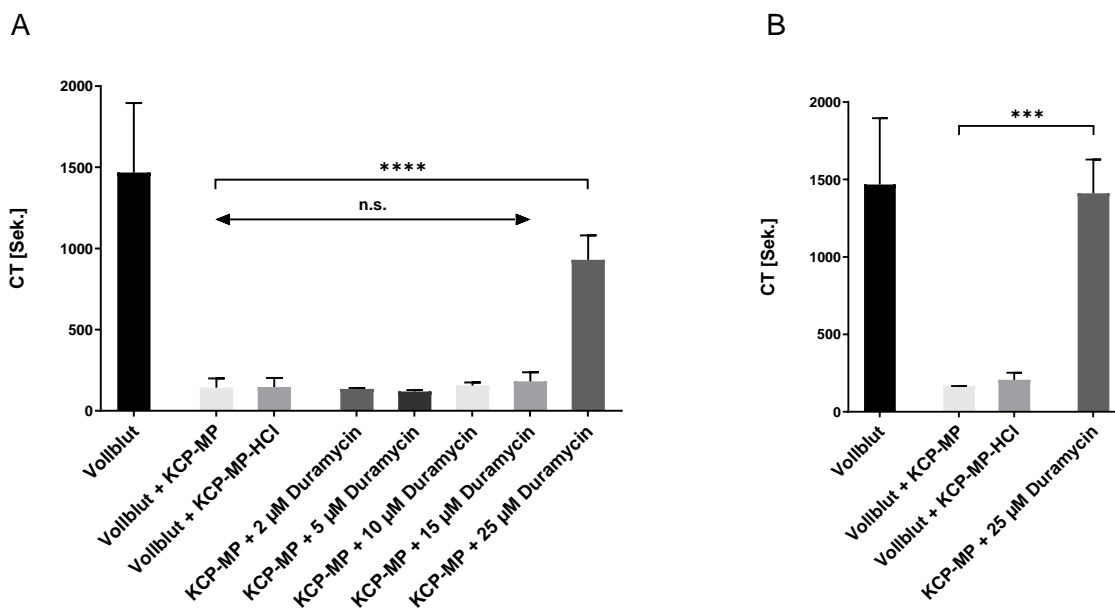
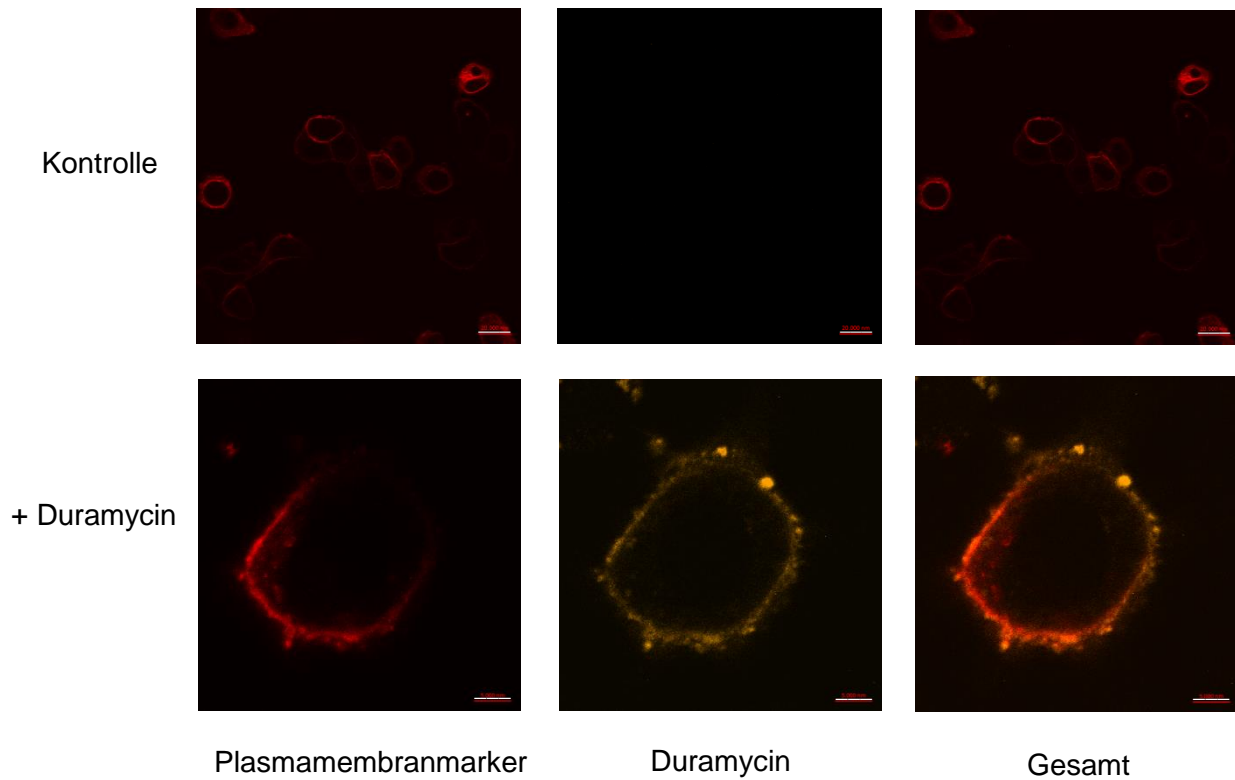


Abb. 26: Fibrinbildung durch KCP-MP unter Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Duramycin bei Verwendung ungewaschener (A) sowie gewaschener (B) MP nach vorheriger Inkubation mit Duramycin
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ karzinomatöse KCP-MP wurden zusammen mit Duramycin (2, 5, 10, 15 bzw. 25 μM) vorinkubiert. Im TEG wurde dann die CT von KCP-MP ohne und mit Duramycinvorinkubation (A) bestimmt, ohne die MP vorher vom überschüssigen Duramycin zu waschen. Weiterhin wurde die Fibrinbildung von MP bestimmt, die nach der Duramycininkubation einmal gewaschen wurden (B). Mittelwerte \pm SD, n=3 (unabhängige Experimente), n.s.=nicht signifikant, *** p<0,001, **** p<0,0001 gegenüber Vollblut + KCP-MP-HCl. One Way ANOVA for multiple comparisons.

3.2 Nachweis von Phosphatidylethanolamin auf L3.6pl-Zellen

Da die *in vitro* Daten auf eine Beteiligung von PE an der Fibrinbildung durch die Karzinomzellen des orthotopen Mausmodells und ihrer MP hinwiesen, wurden in den folgenden Experimenten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Lokalisation von PE auf der Oberfläche der Plasmamembran von L3.6pl-Zellen angefertigt.

Auf der Oberfläche der L3.6pl-Zellen war nach einer Inkubationszeit von 30 Min. PE deutlich nachweisbar (Abb. 27). Der Nachweis erfolgte durch die hochspezifische Bindung von fluoreszenzmarkiertem Duramycin an PE.

L3.6pl-Zellen**Abb. 27: Exposition von Phosphatidylethanolamin auf der Zellmembran von L3.6pl-Zellen**

Zur Darstellung der Exposition von PE auf den Zellmembranen von L3.6pl-Zellen wurden diese für 30 Min. mit biotinyliertem Duramycin bei RT inkubiert (n=2). Die Zellmembran der L3.6pl-Zellen wurde mittels FM 4-64FX (rot) markiert. Duramycin wurde mittels DyLight 550-markiertem Antikörper (gelb) nachgewiesen. Größenindikator oben = 20 μm / unten = 5 μm

3.3 Wirkung der MP auf die Zellen des Blutes *ex vivo*

3.3.1 FM4-64FX-markierte L3.6pl-MP

Aus Abb. 28 B wird ersichtlich, dass es durch eine Vorinkubation der MP mit Duramycin zu einer möglichen Anlagerung der MP an Erythrozyten kommt (gelbe Pfeile).

A Kontrolle

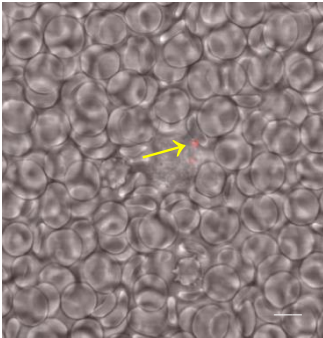
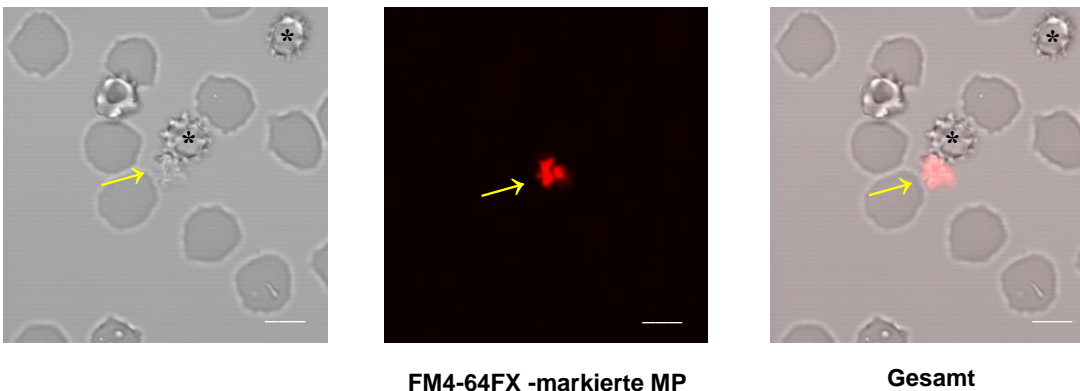


Abb. 28: FM4-64 FX-markierte L3.6pl-MP ohne (A) und mit (B) Duramycin im Vollblut

1 μg L3.6pl-MP wurden entweder ohne (A) oder mit Duramycin (5 μM ; B) vorinkubiert und in beiden Fällen mit dem Fluorophor FM4-64FX markiert. Die MP wurden in 100 μl verdünntem citriertem Vollblut (Verdünnung 1:1000) gelöst und unter dem konfokalen Mikroskop visualisiert. * Akanthozyt. Gelbe Pfeile = MP. Größenindikator = 5 μm

B mit 5 μM Duramycin vorinkubierte L3.6pl-MP



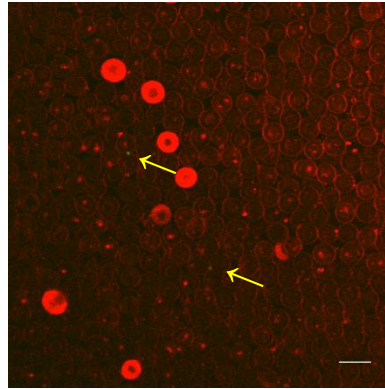
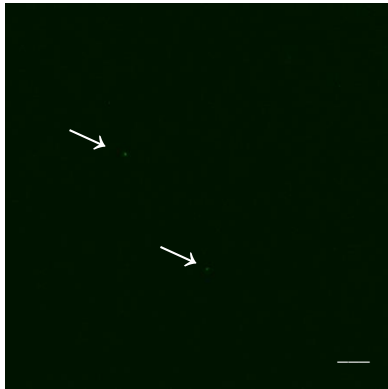
FM4-64FX -markierte MP

Gesamt

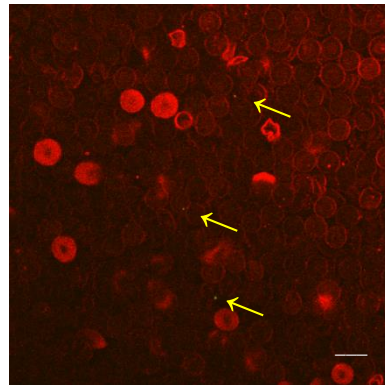
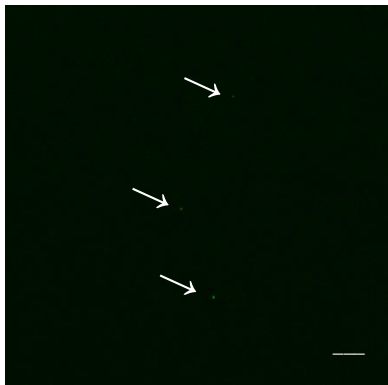
3.3.2 Interaktionen Vybrant DiO-markierter L3.6pl-MP mit FM4-64FX-markierten Erythrozyten im Vollblut

Über die Interaktion von im Blut zirkulierenden MP mit Blutzellen ist bislang noch wenig bekannt. Um eine Interaktion der Tumor-MP mit Erythrozyten *in vitro* genauer zu untersuchen, wurde die Plasmamembran der MP mit Vybrant DiO markiert. Erythrozyten wurden mit FM4-64FX markiert. In der Kontrolle ohne Duramycin kam es bereits nach 1 Min. Koinkubation zur Anlagerung der karzinomatösen MP an die Erythrozyten (Abb. 29 A, gelbe Pfeile). Vorinkubation der MP mit Duramycin sowie längere Inkubationszeiten (60 Min.) beeinflussten nicht die Adhäsion der MP an die Erythrozyten (Abb. 29 B, weiße Pfeile). Eine Internalisierung der MP durch die Erythrozyten konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden.

A



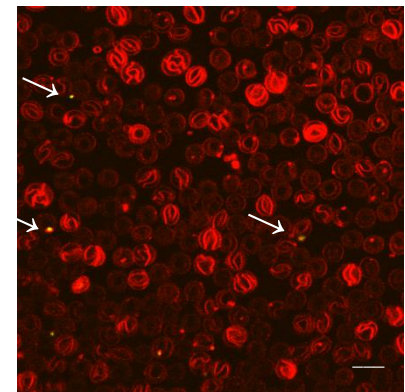
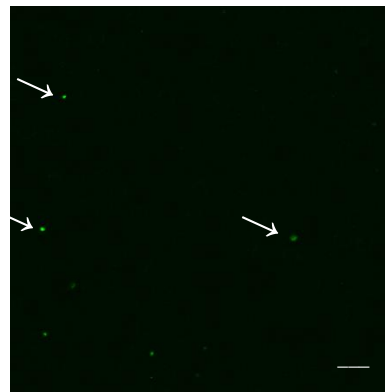
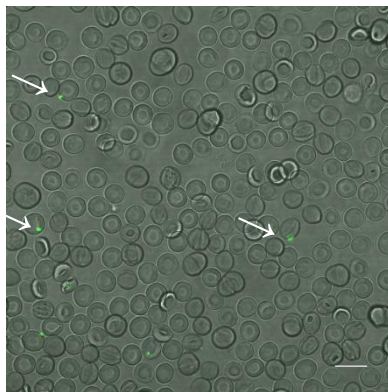
Kontrolle –
1 Min. Inkubationszeit



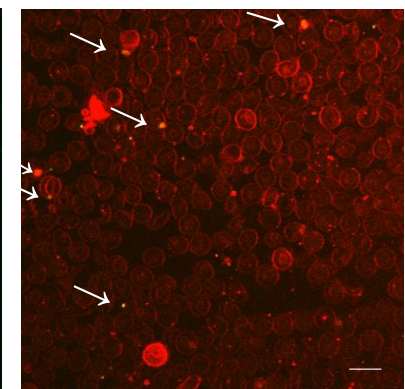
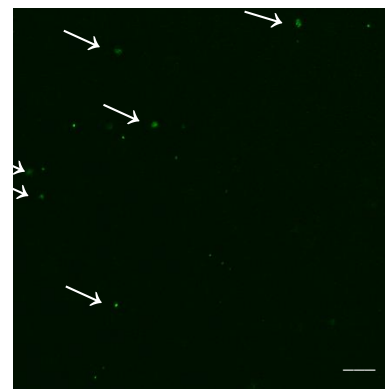
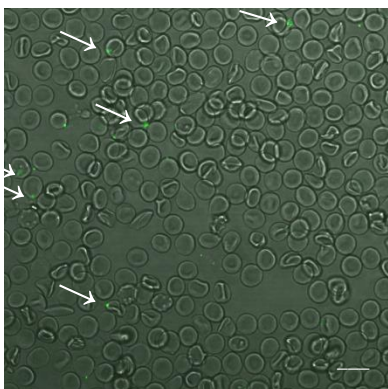
Kontrolle –
60 Min. Inkubationszeit

B

Duramycin-vorinkubierte MP (5 μ M) im Vollblut – 1 Min. Inkubationszeit



Duramycin-vorinkubierte MP (5 μ M) im Vollblut – 60 Min. Inkubationszeit



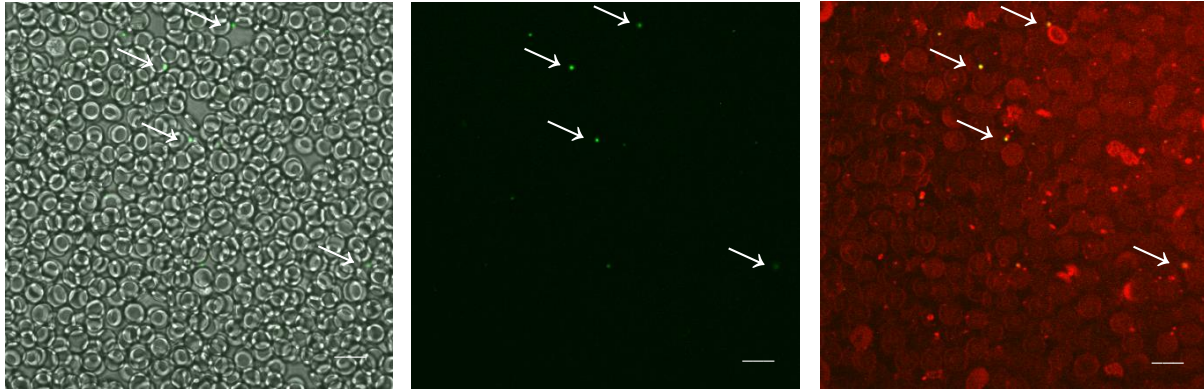
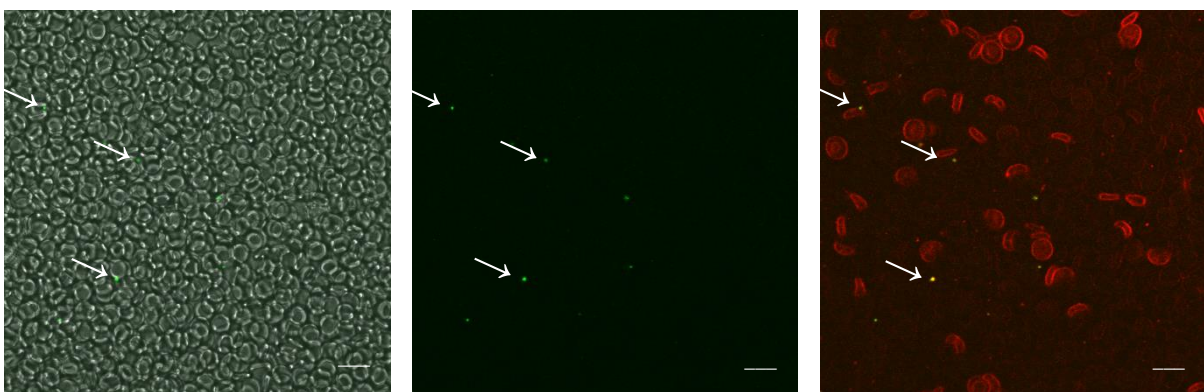
Duramycin-vorinkubierte MP (20 μ M) im Vollblut – 1 Min. InkubationszeitDuramycin-vorinkubierte MP (20 μ M) im Vollblut – 60 Min. Inkubationszeit

Abb. 29: Visualisierung von Vybrant DiO-markierten L3.6pl-MP ohne (A) bzw. mit 5 μ M oder 20 μ M Duramycin (B) im Vollblut
 2 μ g Vybrant DiO-markierte L3.6pl-MP (grün) wurden in stark verdünntem citriertem Vollblut (Verdünnung 1:1000) aufgenommen. Nach 1 und 60 Min. wurde der FM4-64FX Farbstoff in das MP/Blut-Gemisch hinein pipettiert und hierdurch die Erythrozyten rot gefärbt. Weiße/gelbe Pfeile = MP. Größenindikator = 10 μ m

Insbesondere in der Vergrößerung wird deutlich, dass auch eine erhöhte Konzentration von Duramycin und eine Inkubationszeit von 60 Min. zu keiner Internalisierung der MP in die Erythrozyten führte. Die Bilder deuten eher auf eine Fusion der MP mit den Erythrozyten hin (Abb. 30, weiße Pfeile).

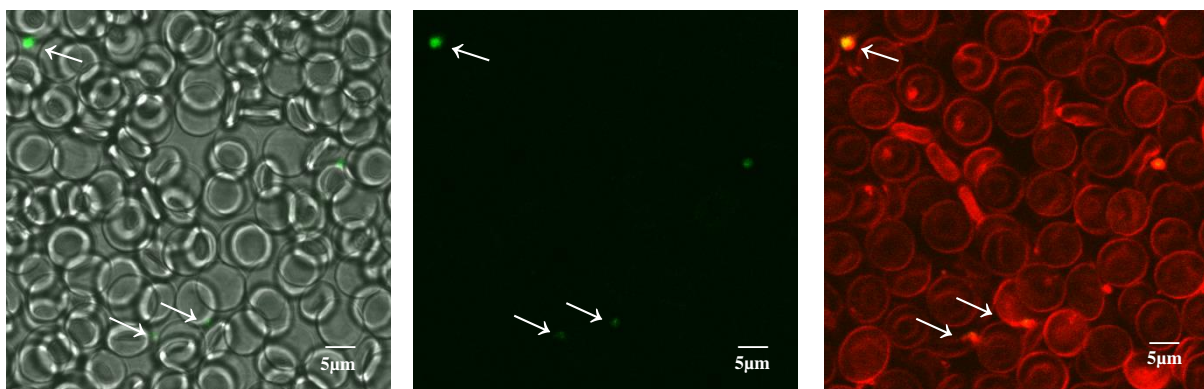
Duramycin-vorinkubierte MP (20 μ M) im Vollblut – 60 Min. Inkubationszeit – vergrößert

Abb. 30: Vergrößerter Ausschnitt zur Interaktion von Vybrant DiO-markierten L3.6pl-MP mit Erythrozyten im Vollblut
 2 μ g Vybrant DiO-markierte L3.6pl-MP (grün) wurden in stark verdünntem citriertem Vollblut (Verdünnung 1:1000) aufgenommen. FM4-64FX Farbstoff (rot) wurde zum Einfärben der Erythrozyten nach 60 Min. dem MP/Blut-Gemisch zugegeben. Weiße Pfeile = MP.

4 Diskussion

Ziel der Experimente der vorliegenden Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der *in vitro* Fibrinbildung durch Pankreaskarzinomzellen und durch deren MP weiter zu klären. Dafür wurden größtenteils Zellen und MP aus einem orthotopen Pankreaskarzinom-Modell untersucht und des Weiteren eine aus einem transgenen Tiermodell isolierte Zelllinie.

4.1 Prokoagulatorische Eigenschaften von Pankreaskarzinomzellen und ihren Mikropartikeln: Rolle des extrinsischen Blutgerinnungsweges

Hyperkoagulopathie und thromboembolische Ereignisse sind typische Komplikationen bei Patienten mit Karzinomen. Bekannterweise kann über die zwei prokoagulatorisch aktiven Proteine TF und Cancer Procoagulant (CP), einer Cystein Proteinase, welche Faktor X auch in Abwesenheit von TF und FVII direkt aktiviert, die Gerinnung unmittelbar durch Tumorzellen gestartet werden (Gordon & Mourad, 1991; Kamocka, Pollard, Suckow, Mielicki, & Rosen, 2008). In einer Studie mit 60 Patienten unterschiedlicher Karzinomtypen aus Lunge, Brust, Verdauungstrakt und Urogenitaltrakt wurde beobachtet, dass im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe bei 72,5 % der Krebspatienten der TF Level im Blut erhöht war. Auch die Arbeiten dieser Dissertation zeigen, dass die Aktivierung der Fibrinbildung durch Zellen und MP des orthotopen Pankreaskarzinommodells maßgeblich auf der Aktivität von TF beruht. Somit verläuft die Fibrinbildung hier vornehmlich über die Gerinnungskaskade des extrinsischen Gerinnungsweges (Abb. 10 + 12). In der Tat zeigte sich in Anwesenheit eines Anti-TF-AK *in vitro* eine fast vollständige Inhibition der Faktor Xa Bildung bzw. der Fibrinbildung im Vollblut.

Wie deutlich insbesondere die karzinomatösen MP die Gerinnungsaktivierung steigern können, konnten wir durch eine Zunahme der Faktor Xa Bildung beim Einsatz steigender MP-Konzentrationen darstellen. Die MP der stark metastasierenden L3.6pl-Zelllinie führten gegenüber denjenigen der nicht metastatischen FG-Zellen zu einer deutlicheren Bildung von Faktor Xa, so dass angenommen werden kann, dass die MP der metastatischen Zelllinie die Gerinnung stärker induzieren können als diejenigen der nicht-metastatischen Zelllinie (Abb. 7).

Im Gegensatz zur Bedeutung des TF-induzierten extrinsischen Gerinnungsweges spiegelt das Kontaktaktivierungssystem offensichtlich nur eine untergeordnete Rolle. Dies konnte in verschiedenen experimentellen Ansätzen u.a. in Anwesenheit eines FXII-Inhibitors bzw. in FXII-defizienten Plasma nachgewiesen werden (Abb. 9 + 10 + 12). Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Fibrinbildung durch Karzinom-MP nicht auf dem intrinsischen Gerinnungsweg basiert.

Die Thrombingenerierung durch die TF-abhängige Gerinnungsaktivierung kann durch spezifische Inhibierung mittels TFPI reguliert werden. Nach Zugabe von Anti-TFPI-AK zu Plasma liess sich die Thrombozyten-MP-abhängige Thrombinbildung steigern (Keuren, Magdeleyns, Govers-Riemslog, Lindhout, & Curvers, 2006). Auch Gheldof et al. (2013) beobachteten an MP

einer humanen Adenokarzinomzelllinie eine verstärkte Thrombinbildung unter Verwendung eines spezifischen Anti-TFPI-AK, der gegen dessen Kunitz 1 Domäne gerichtet war. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Zellen und MP der Pankreaskarzinomzellen zeigten jedoch keinen Effekt des genannten Anti-TFPI-AK auf die prokoagulatorische Aktivität (Abb. 16).

4.2 TF-Aktivatoren in Tumorzellen und deren MP

Bereits mehrfach wurde eine Diskrepanz zwischen der TF-Expression und der gemessenen TF-Aktivität beschrieben (De Palma et al., 2016; Walsh & Geczy, 1991; J. Wang, Pendurthi, & Rao, 2019). Es wird angenommen, dass der TF zunächst funktionell inaktiv vorliegt und sozusagen „verborgen“, encrypted ist (R. Bach & Rifkin, 1990; Drake, Ruf, Morrissey, & Edgington, 1989; Langer & Ruf, 2014).

Auf den Beobachtungen basierend, dass TF zwar häufig auf der Zelloberfläche exprimiert wird, aber in einer nicht koagulatorisch aktiven Form vorliegt, ist bisher noch nicht vollständig verstanden, über welche Mechanismen TF aktiviert wird (decrypted TF, entschlüsselter TF) (Engelmann et al., 2003).

Unsere Ergebnisse mit den FG- und L3.6pl-Zellen deuten darauf hin, dass ein Teil des Zellmembran-TF in einem inaktiven Zustand vorliegt. Für das Vorliegen im inaktiven Zustand spricht, dass die Karzinomzellen nach Lyse eine vermehrte FXa Aktivität zeigten und auch die Vollblutkoagulation (TEG) bei lysierten Zellen schneller eintrat (Abb. 8 B + 11).

In den letzten Jahren wurden verschiedene Hypothesen zur Entschlüsselung von TF postuliert (R. R. Bach, 2006; Dietzen et al., 2004; Reinhardt et al., 2008; Zhou, Hogg, & Grater, 2017).

4.2.1 TF-Aktivierung durch Phosphatidylserin

Es ist bekannt, dass die Exposition von PS an der Außenseite von Zellmembranen an der Aktivierung von TF beteiligt ist. Viele Stimuli, wie beispielsweise Schockgefrieren und Auftauen, Ultraschall oder die Apoptose, welche die prokoagulatorische TF Aktivität erhöhen können, sind mit einer verstärkten Externalisation von PS auf der Zelloberfläche verbunden. Dies konnte in den Experimenten mit intakten und lysierten Fibroblasten bestätigt werden (Abb. 14). Durch die vermehrte PS-Expression könnte die Bindung von FX an die Membran begünstigt werden, wodurch eine effizientere Interaktion zwischen dem membrangebundenen TF-FVIIa-Komplex mit dem membrangebundenen Substrat resultiert. Auch könnte PS die Konvertierung des inaktiven TF-FVIIa Komplexes in einen gerinnungsfördernden TF-FVIIa Komplex begünstigen. In diesem Model resultiert eine direkte Interaktion zwischen PS und dem inaktiven TF oder TF-FVIIa in eine Strukturänderung des TF mit der Exposition der Substratbindestellen für FX und FIX. (R. R. Bach, 2006; Ohkubo, Morrissey, & Tajkhorshid, 2010; Rao, Kothari, & Pendurthi, 2012).

Eine Vielzahl von Tumorzellen präsentieren per se einen höheren PS-Anteil auf ihrer Außenmembran verglichen mit Normalzellen und können dadurch prokoagulatorisch sein (Lima & Monteiro, 2013). Die hier vorgestellten Daten zeigen *in vitro* eine deutliche Abhängigkeit der Fibrinbildung von PS. Dieses gilt gleichermaßen für intakte wie auch für lysierte Karzinomzellen. Die kaum metastatische FG-Zelllinie hingegen zeigte in den Vollblutversuchen auch bei einer hohen Konzentration des PS-bindenden Annexin V keine verstärkte Inhibition der prokoagulatorischen Aktivität gegenüber den unbehandelten FG-Zellen. Selbst eine vorherige Lyse der Zellen hatte im Vergleich zu den intakten FG-Zellen keinen Effekt auf die Gerinnungszeit (Abb. 15 A + C). Somit konnte gezeigt werden, dass bereits die intakten Tumorzellen einen hohen Anteil an PS an ihrer Außenmembran aufweisen und damit thrombogene Eigenschaften aufweisen (Abb. 15 A + C).

Auch von Karzinomzellen freigesetzte MP externalisieren vermehrt PS und begünstigen dadurch die Bildung des Prothrombinasekomplexes (Lima & Monteiro, 2013). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass die thrombogenen Eigenschaften der MP der Pankreaskarzinomzellen unabhängig von der PS-Exposition auf der Außenmembran sind. Der Zeitpunkt bis zur Gerinnungsbildung durch die MP beider Zelllinien blieb von einer Inhibition des PS unbeeinflusst (Abb. 15 B).

Für Plättchen-MP wurde beschrieben, dass sie aufgrund ihrer PS-Exposition nur eine kurze Überlebenszeit haben und schnell durch Zellen des Immunsystems phagozytiert werden (Dasgupta et al., 2009). Somit könnte eine reduzierte Exposition von PS auf den Tumor-MP im Vergleich zu den Tumorzellen einen Schutz gegen ihre schnelle Eliminierung darstellen.

4.2.2 Kein Einfluss des Transmembranprotein TMEM16F auf die TF-Aktivierung

Das Ca^{2+} -abhängige Transmembranprotein TMEM16F fungiert als bidirektionale Scramblase und gilt als Hauptregulator der kalziumabhängigen PS-Exposition (Kunzelmann et al., 2014; Suzuki et al., 2010).

Der neutralisierende Anti-TMEM16F-AK zeigte *in vitro* keinen signifikanten Effekt auf die prokoagulatorische Aktivität der Tumorzellen (Abb. 17 A + B) oder verstärkte sogar die FXa-Aktivität unter bestimmten Bedingungen (Abb. 17 A). Somit hat das TMEM16F keine Bedeutung für die prokoagulatorischen Eigenschaften der Tumorzellen.

Nach Inhibition von exponiertem PS durch Annexin V wurde keine vollständige Hemmung des entschlüsselten TF beobachtet (Wolberg et al., 2000; Wolberg, Monroe, Roberts, & Hoffman, 1999). Somit sind noch weitere Membranmechanismen für die TF-Aktivierung verantwortlich, wie z.B. die lipid rafts.

4.2.3 Zerstörte lipid rafts beeinflussen nicht die TF-Aktivierung

Lipid rafts sind spezifische cholesterolreiche Membrandomänen, die zur Rekrutierung von Proteinen für zelluläre Signalprozesse beitragen. Es konnte gezeigt werden, dass es bei HEK293 Zellen durch eine Zerstörung der lipid rafts in der Zellmembran mittels Methyl- β -Cyclodextrin zu einer 3-fach erhöhten Stimulation der gerinnungsfördernden TF-Aktivität kam (Dietzen et al., 2004).

Die Beobachtungen an Pankreaskarzinomzellen in dieser Arbeit zeigen im Gegensatz dazu eine zellzahlabhängige verminderte FXa Aktivität nach Methyl- β -Cyclodextrin. Während es bei geringer Anzahl von Tumorzellen zu keinem Effekt kam (Abb. 20 A), inhibierte Methyl- β -Cyclodextrin bei hohen Zellzahlen die FXa Aktivität insbesondere bei intakten L3.6pl-Zellen um das 3-fache (Abb. 20 B). Bei den MP wurde kein Effekt durch den Abbau von Cholesterol in der Zellmembran festgestellt (Abb. 20 C); insgesamt zeigte sich eher eine leicht verminderte FXa Aktivität unter Methyl- β -Cyclodextrin. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit Beobachtungen von Mandal et al. (2005) überein. Diese Autoren zeigten, dass nach Cholesterol-Depletion von Fibroblasten-Membranen die TF/FVIIa-Aktivität reduziert war.

Die teilweise divergierenden Ergebnisse sind vermutlich durch die Verwendung unterschiedlicher Zelltypen bzw. unterschiedlicher Stimulationen der PS-Exposition (Kalzium-Ionophor, Lyse) erklärbar.

4.2.4 Kein Einfluss der Oxidoreduktase PDI auf die TF-Aktivierung

In vorhergehenden Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass TF ein intramolekulares allosterisches Disulfid trägt (Cys186-Cys209). Die Oxidoreduktase PDI induziert eine Oxidation dieses Disulfids, wodurch die prokoagulatorische Aktivität von TF in Monozyten und anderen Zelltypen gefördert wird sowie die Thrombosebildung in vivo gesteigert wird (Kiouptsi & Reinhardt, 2016; Manukyan et al., 2008). Weder die intakten noch die lysierten Karzinomzellen bzw. deren MP zeigten signifikante FXa Aktivitätsveränderungen bzw. veränderte Vollblutgerinnungsparameter nach Inhibition von PDI (Abb. 18 + 19). Somit scheint die prokoagulatorische Aktivität des TF auf Karzinomzellen und ihren MP nicht durch PDI getriggert zu sein.

4.2.5 Phosphatidylethanolamin als elementarer TF-Aktivator

PE ist unter nicht aktivierten Bedingungen hauptsächlich in der inneren Hälfte der Plasmamembran lokalisiert (Gilbert & Arena, 1995; Tavoosi et al., 2011; Zwaal, Comfurius, & Bevers, 1998).

In Abwesenheit von PE benötigt der Tenase-Komplex zur optimalen Aktivität Membranen, die zu 20-25% aus PS bestehen. Besteht die Membran zu 20-35% aus PE ist der Bedarf an PS auf nur noch 1% reduziert (Falls, Furie, & Furie, 2000). 2011 konnte zum ersten Mal gezeigt wer-

den, dass Pankreaskarzinomzellen (CFPAC-1, ASPC-1, MIAPaCa-2) und ihre MP PE präsentierten und dieses dort unterschiedlich stark gerinnungsfördernd wirkt.

4.2.5.1 Wirkung von Duramycin auf die TF-Aktivierung

Zur Bestimmung des Einflusses von PE auf die prokoagulatorischen Eigenschaften der Zellen und MP wurde Duramycin verwendet (Yates et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse erweitert. Duramycin inhibierte die gerinnungsfördernden Eigenschaften der FG- und L3.6pl-Zelllinie (Abb. 21 A + B). Einen noch drastischeren Effekt übte Duramycin auf die MP aus. Hier kam es fast zur vollständigen Hemmung der Faktor Xa Bildung (Abb. 21 C). Diese Ergebnisse bestätigen eine bedeutende Rolle des auf Tumor-MP exponierten PE für deren prokoagulatorische Eigenschaften.

Die zuvor beschriebenen Experimente wurden mit einer Konzentration von 500 μM Duramycin durchgeführt. Für Duramycin ist beschrieben, dass es in hohen Konzentrationen durch Porenbildung in Zellmembranen toxisch wirken könnte (Zebedin et al., 2008).

In Versuchen mit geringeren Konzentrationen an Duramycin konnte jedoch gezeigt werden, dass es auch bei einer Konzentration von 25 μM zu einer starken Inhibierung der Faktor Xa-Aktivität sowie Fibrinbildung bei Tumorzellen und deren MP kam (Abb. 22 A + B, Abb. 23 A). Die geringste Konzentration von Duramycin, die noch einen signifikanten Effekt auf die prokoagulatorische Aktivität der MP auslöste, lag bei 10 bzw. 15 μM (Abb. 23 B).

Weitere Ergebnisse zeigten, dass nach direkter Zugabe von Duramycin zum Vollblut nur ein kleiner inhibitorischer Effekt im Falle der metastatischen L3.6pl-MP und kein Effekt bei den FG-MP nachgewiesen werden konnte (Abb. 24). Dies lässt darauf schließen, dass Duramycin zu einem gewissen Teil in die Zellmembran eindringen muss, um inhibitorisch zu wirken.

Duramycin könnte ein Kandidat für die selektive Hemmung von tumorassoziierten Thrombosen darstellen. Die Experimente mit humanen Fibroblasten zeigten, dass Duramycin die durch Fibroblasten induzierte Gerinnungszeit nicht signifikant beeinflusste (Abb. 25). Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass Duramycin die physiologische Koagulation nicht beeinflusst.

Weiterhin wurde analysiert, ob auch die Gerinnungszeit durch MP der KCP-Zelllinie, die aus einem transgenen Mausmodell gezüchtet wurde, von Duramycin beeinflusst werden kann. Auch bei dieser Zelllinie zeigte sich, dass die PE-Inhibition die durch Karzinomzellen induzierte Aktivierung der Koagulation deutlich reduzieren konnte (Abb. 23 + 26).

Somit konnte gezeigt werden, dass Tumorzell-PE die Faktor Xa Bildung sowie die Fibrinbildung deutlich erhöht. Parallele *in vivo* Experimente zeigten, dass Duramycin in der Tat tumorassoziierte Thrombosen hemmt (Stark et al., 2018).

4.3 Erythrozyten wirken als Akzeptorzellen von Tumor-MP im Blut *in vitro*

Untersuchungen der Interaktionen von Tumor-MP mit Erythrozyten mittels konfokaler Mikroskopie zeigten eine Adhäsion der MP an Erythrozyten (Abb. 28). In den Vollblut-Experimenten kam es sowohl unter der Vorinkubation der Tumor-MP mit Duramycin als auch in Abwesenheit

von Duramycin zu einer Agglutination der Tumor-MP untereinander (Abb. 28, 29). Möglicherweise kann durch die Zugabe von Duramycin zum Vollblut und der Agglutination der MP eine Fusion der MP mit den Membranen anderer Zellen vermindert werden, was zu weniger Interaktionen zwischen den Tumor-MP und gesunden Zellen führen könnte.

Eine Internalisierung der Tumor-MP konnte auch nach 60 Min. Inkubationszeit nicht nachgewiesen werden. Vielmehr schien hier eher eine Fusion der MP mit der Erythrozytenmembran stattzufinden (Abb. 30). In zusätzlichen Analysen hinsichtlich einer möglichen Zellmembranfusion karzinomatöser MP mit Erythrozytenmembranen und damit potentieller MP-Clearance kam es bereits nach 1 Min. zu einer Adhäsion der mit Duramycin vorinkubierten MP an die Erythrozyten (Abb. 29).

4.3.1 Spekulationen über die Interaktion von Tumor-MP und Blutzellen

Eventuell werden die MP-tragenden Erythrozyten aber auch in der Leber oder Milz aussortiert. Somit würden die Erythrozyten das Blut möglicherweise von MP bereinigen. Denn es wurde bereits beschrieben, dass Erythrozyten Immunkomplexe binden können und in vivo Studien zeigten, dass die Erythrozyten als Transporter fungierten und so die Immunkomplexe zu fixierten Makrophagen in Leber und Milz brachten (Hess & Schifferli, 2003).

Eventuell dient der hohe PE-Anteil an MP anderen Zellen als „Eat-me“-Signal, wodurch eine gezielte Clearance der MP aus dem Blut resultieren könnte. Andererseits könnte eine Fusion mit anderen Zellen auch dazu führen, dass die MP vor einem gezielten zellulären Abbau geschützt werden. Vielleicht sind aber auch andere (Blut-)Zellen dazu befähigt die MP zu internalisieren und damit aus dem Blut zu beseitigen. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tumor-MP durch Endozytose von Endothelzellen internalisiert wurden (Kawamoto et al., 2012). Aber würde eine Phagozytose aller Duramycin-behandelten MP noch zu einer verlängerten Gerinnungszeit führen? Inwiefern können die Tumorvesikel die Metastasierung des Pankreaskarzinoms über die Fibrinbildung kontrollieren?

Wir führten jegliche Experimente nur unter *in vitro* Bedingungen durch. Ein Ausbleiben der TF-Aktivierung kann auch aufgrund fehlender Interaktion mit Blutzellen oder mechanischem Stress im Gefäßsystem *in vivo* bedingt sein (Osterud & Bjorklid, 2006). Letztlich bleibt somit auch zu klären, ob sich diese Beobachtungen *in vivo* reproduzieren lassen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen der von Pankreaskarzinomzellen und ihren MP induzierten Fibrinbildung *in vitro* analysiert. Die meisten Experimente erfolgten an humanen Zellen aus einem orthotopen Pankreaskarzinommodell. In weiteren Experimenten wurden vergleichend auch Zellen aus einem transgenen Mausmodell des Pankreaskarzinoms untersucht.

Die *in vitro* Experimente zeigten, dass sowohl die Pankreaskarzinom-Zellen und insbesondere ihre MP die Gerinnungsaktivierung TF-abhängig fördern. Eine Inhibierung von TF mittels eines neutralisierenden Antikörpers reduzierte die Bildung des Gerinnungsfaktors Xa deutlich. Die TF-abhängige Gerinnungsaktivierung konnte in Vollblut-Experimenten bestätigt werden.

Es wird angenommen, dass v.a. blutassoziierter TF zumeist in inaktiver Form vorliegt (encrypted TF), um inadäquate Aktivierungen der Blutgerinnung zu verhindern. Die Experimente dieser Arbeit wiesen darauf hin, dass durch die Zellyse der Karzinomzellen deren TF-Aktivität gesteigert wird. Dies spricht für eine Verschlüsselung von TF auf der Oberfläche intakter Pankreaskarzinomzellen.

Das negativ geladene Phospholipid PS fördert die Gerinnungsaktivierung der stark metastatischen Zelllinie, nicht aber die deutliche Aktivierung durch die MP. Auch die Inhibierung der Scramblase TMEM16F, Hemmung von TF durch TFPI sowie die Reduktion von Membran-Cholesterin durch Methyl- β -Cyclodextrin beeinflussten die FXa Aktivität der Tumor-MP nicht.

Neben PS exponieren die MP auch PE an ihrer Außenmembran. Der prokoagulatorische Effekt der Pankreaskarzinomzellen des orthotopen Modells und besonders ihrer MP konnte durch die Duramycin-vermittelte Inhibierung von PE nahezu komplett unterdrückt werden. Die Ergebnisse wiesen darauf hin, dass PE für die Thrombosierung durch Karzinomzellen und mehr noch durch Tumor-MP unerlässlich ist. Auch die MP des transgenen Modells zeigten eine Abhängigkeit der Gerinnungsaktivierung von PE.

Die Visualisierung der Interaktion von Erythrozyten mit MP mittels konfokaler Mikroskopie deutete darauf hin, dass die MP mit hoher Wahrscheinlichkeit an die Erythrozyten adhären und sogar fusionieren. Eine Internalisierung schien hierbei nicht stattzufinden.

Zusammengenommen zeigt diese Arbeit, dass Duramycin bereits in geringen Konzentrationen als ein wirkungsvoller und selektiver Inhibitor von tumor-assoziierten Thrombosen eingesetzt werden könnte ohne hierbei die physiologische Hämostase zu beeinflussen.

6 Summary

The purpose of this work was to investigate the mechanisms of fibrin generation as induced by pancreatic carcinoma cells and their MP *in vitro*.

Both human as well as mouse pancreatic carcinoma cells and especially their MP promoted coagulation activation in a TF-dependent manner. Inhibition of TF using a neutralizing antibody significantly reduced the formation of coagulation factor Xa. TF-dependent coagulation activation by pancreatic tumor cells could be confirmed in whole blood experiments.

It is believed that intravascular (blood-based) TF is initially present in an inactive form to protect against excessive coagulation activation. The experiments in this work indicate that cell lysis of the carcinoma cells, a mechanism used to decrypt TF, increased their procoagulant activity by functional activation of the TF. This suggests that TF encryption on the surface of intact pancreatic carcinoma cells is encrypted.

Accordingly, the experiments showed that the presence of PS alone favored tumor cell-induced coagulation activation, but not coagulation activation by their MP. Also, inhibition of the PS-exposing scramblase TMEM16F, addition of the TF inhibitor TFPI, or addition of methyl- β -cyclodextrin, which reduces membrane cholesterol, did not alter FXa activity in the tumor MP.

In addition to PS, the MP also expose PE on their outer membrane. The pronounced procoagulant effect of the pancreatic carcinoma cells and especially of their MP could be almost completely suppressed by inhibition of PE. The results indicate that PE is essential for thrombosis by pancreatic carcinoma cells and even more so for pancreatic tumor MP.

Visualization of the interaction of erythrocytes with pancreatic tumor MP by confocal microscopy showed that the MP are very likely adhered to and even fused with the erythrocytes. Internalisation of MP into the erythrocytes did not seem to take place.

The study suggests that even at relatively low concentrations duramycin can be used as a potent and selective inhibitor of tumor-associated thrombosis without affecting physiological hemostasis.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA1/2	BReast CAncer 1/2
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CT	Clotting Time
C-terminal	Carboxy-terminal
CTI	Corn Trypsin Inhibitor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
F	Faktor
FBS	Fetal Bovine Serum
HCl	Chlorwasserstoff
HEK	Human Embryonic Kidney
HF	Humane Fibroblasten
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
K	Kalium
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
kLSM	konfokale Laser Scan Mikroskopie
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma
MP	Mikropartikel
MUC-1	Mucin-1

Na	Natrium
neg.	negativ
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
Opti-MEM	Opti-Minimal Essential Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDI	Protein Disulfid Isomerase
PE	Phosphatidylethanolamin
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SD	Standard Deviation
SMAD4	MAD-Homolog 4
TEG	Thrombelastographie
TF	Tissue Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TMEM16F	Transmembranprotein 16F
TNC	Trinatriumcitrat
VTE	Venöse Thromboembolie
ZnCl ₂	Zinkchlorid

8 Literaturverzeichnis

- Abid Hussein, M. N., Boing, A. N., Sturk, A., Hau, C. M., & Nieuwland, R. (2007). Inhibition of microparticle release triggers endothelial cell apoptosis and detachment. *Thromb Haemost*, *98*(5), 1096-1107.
- Alexandru, N., Badila, E., Weiss, E., Cochior, D., Stepien, E., & Georgescu, A. (2016). Vascular complications in diabetes: Microparticles and microparticle associated MicroRNAs as active players. *Biochem Biophys Res Commun*. doi:10.1016/j.bbrc.2016.02.038
- Amabile, N., Heiss, C., Chang, V., Angeli, F. S., Damon, L., Rame, E. J., . . . Yeghiazarians, Y. (2009). Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant*, *28*(10), 1081-1086. doi:10.1016/j.healun.2009.06.005
- Ambrus, J. L., Ambrus, C. M., Pickern, J., Soldes, S., & Bross, I. (1975). Hematologic changes and thromboembolic complications in neoplastic disease and their relationship to metastasis. *J Med*, *6*(5-6), 433-458.
- Bach, R., & Rifkin, D. B. (1990). Expression of tissue factor procoagulant activity: regulation by cytosolic calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(18), 6995-6999.
- Bach, R. R. (2006). Tissue factor encryption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *26*(3), 456-461. doi:10.1161/01.atv.0000202656.53964.04
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Chene, C., Winkler, F. K., Guha, A., Konigsberg, W. H., . . . Kirchhofer, D. (1996). The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature*, *380*(6569), 41-46. doi:10.1038/380041a0
- Barry, O. P., Pratico, D., Lawson, J. A., & FitzGerald, G. A. (1997). Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest*, *99*(9), 2118-2127. doi:10.1172/jci119385
- Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(18), 6934-6938.
- Berckmans, R. J., Sturk, A., van Tienen, L. M., Schaap, M. C., & Nieuwland, R. (2011). Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood*, *117*(11), 3172-3180. doi:10.1182/blood-2010-06-290460
- Bevers, E. M., Comfurius, P., Dekkers, D. W., & Zwaal, R. F. (1999). Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, *1439*(3), 317-330.
- Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M. C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., . . . Grimmond, S. M. (2012). Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature*, *491*(7424), 399-405. doi:10.1038/nature11547
- Biro, E., Akkerman, J. W., Hoek, F. J., Gorter, G., Pronk, L. M., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2005). The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J Thromb Haemost*, *3*(12), 2754-2763. doi:10.1111/j.1538-7836.2005.01646.x
- Blom, J. W., Osanto, S., & Rosendaal, F. R. (2006). High risk of venous thrombosis in patients with pancreatic cancer: a cohort study of 202 patients. *Eur J Cancer*, *42*(3), 410-414. doi:10.1016/j.ejca.2005.09.013
- Boyle, J., Czito, B., Willett, C., & Palta, M. (2015). Adjuvant radiation therapy for pancreatic cancer: a review of the old and the new. *J Gastrointest Oncol*, *6*(4), 436-444. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.014
- Bracci, P. M. (2012). Obesity and pancreatic cancer: overview of epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol Carcinog*, *51*(1), 53-63. doi:10.1002/mc.20778
- Broze, G. J., Jr., & Girard, T. J. (2012). Tissue factor pathway inhibitor: structure-function. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *17*, 262-280.
- Bruns, C. J., Harbison, M. T., Kuniyasu, H., Eue, I., & Fidler, I. J. (1999). In vivo selection and characterization of metastatic variants from human pancreatic adenocarcinoma by using orthotopic implantation in nude mice. *Neoplasia*, *1*(1), 50-62.

- Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., & Touyz, R. M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*, *124*(7), 423-441. doi:10.1042/cs20120309
- Camerer, E., Rottingen, J. A., Gjernes, E., Larsen, K., Skartlien, A. H., Iversen, J. G., & Prydz, H. (1999). Coagulation factors VIIa and Xa induce cell signaling leading to up-regulation of the egr-1 gene. *J Biol Chem*, *274*(45), 32225-32233.
- Chen, K., Detwiler, T. C., & Essex, D. W. (1995). Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *Br J Haematol*, *90*(2), 425-431.
- Chen, V. M., Ahamed, J., Versteeg, H. H., Berndt, M. C., Ruf, W., & Hogg, P. J. (2006). Evidence for activation of tissue factor by an allosteric disulfide bond. *Biochemistry*, *45*(39), 12020-12028. doi:10.1021/bi061271a
- Crompton, E., Van Damme, M., Duveillier, H., Pieters, K., Vermeesch, M., Perez-Morga, D., . . . Stamatopoulos, B. (2015). Avoiding false positive antigen detection by flow cytometry on blood cell derived microparticles: the importance of an appropriate negative control. *PLoS One*, *10*(5), e0127209. doi:10.1371/journal.pone.0127209
- D'Souza-Schorey, C., & Clancy, J. W. (2012). Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. *Genes Dev*, *26*(12), 1287-1299. doi:10.1101/gad.192351.112
- Daleke, D. L. (2003). Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J Lipid Res*, *44*(2), 233-242. doi:10.1194/jlr.R200019-JLR200
- Dasgupta, S. K., Abdel-Monem, H., Niravath, P., Le, A., Bellera, R. V., Langlois, K., . . . Thiagarajan, P. (2009). Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood*, *113*(6), 1332-1339. doi:10.1182/blood-2008-07-167148
- Davila, M., Amirkhosravi, A., Coll, E., Desai, H., Robles, L., Colon, J., . . . Francis, J. L. (2008). Tissue factor-bearing microparticles derived from tumor cells: impact on coagulation activation. *J Thromb Haemost*, *6*(9), 1517-1524. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.02987.x
- De Palma, R., Cirillo, P., Ciccarelli, G., Barra, G., Conte, S., Pellegrino, G., . . . Cimmino, G. (2016). Expression of functional tissue factor in activated T-lymphocytes in vitro and in vivo: A possible contribution of immunity to thrombosis? *Int J Cardiol*, *218*, 188-195. doi:10.1016/j.ijcard.2016.04.177
- Devaraj, S., Kumaresan, P. R., & Jialal, I. (2011). C-reactive protein induces release of both endothelial microparticles and circulating endothelial cells in vitro and in vivo: further evidence of endothelial dysfunction. *Clin Chem*, *57*(12), 1757-1761. doi:10.1373/clinchem.2011.169839
- Diamant, M., Nieuwland, R., Pablo, R. F., Sturk, A., Smit, J. W., & Radder, J. K. (2002). Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, *106*(19), 2442-2447.
- Dietzen, D. J., Page, K. L., & Tetzloff, T. A. (2004). Lipid rafts are necessary for tonic inhibition of cellular tissue factor procoagulant activity. *Blood*, *103*(8), 3038-3044. doi:10.1182/blood-2003-07-2399
- Dignat-George, F., & Boulanger, C. M. (2011). The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(1), 27-33. doi:10.1161/atvbaha.110.218123
- Distler, J. H., Pisetsky, D. S., Huber, L. C., Kalden, J. R., Gay, S., & Distler, O. (2005). Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum*, *52*(11), 3337-3348. doi:10.1002/art.21350
- Donati, M. B. (1994). Cancer and thrombosis. *Haemostasis*, *24*(2), 128-131.
- Drake, T. A., Ruf, W., Morrissey, J. H., & Edgington, T. S. (1989). Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol*, *109*(1), 389-395.
- Dvorak, H. F., Quay, S. C., Orenstein, N. S., Dvorak, A. M., Hahn, P., Bitzer, A. M., & Carvalho, A. C. (1981). Tumor shedding and coagulation. *Science*, *212*(4497), 923-924.
- Ender, F., Freund, A., Quecke, T., Steidel, C., Zamzow, P., von Bubnoff, N., & Gieseler, F. (2020). Tissue factor activity on microvesicles from cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, *146*(2), 467-475. doi:10.1007/s00432-019-03073-0

- Engelmann, B., Luther, T., & Muller, I. (2003). Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost*, *89*(1), 3-8. doi:10.1267/thro03010003
- Enjeti, A. K., Lincz, L. F., & Seldon, M. (2007). Detection and measurement of microparticles: an evolving research tool for vascular biology. *Semin Thromb Hemost*, *33*(8), 771-779. doi:10.1055/s-2007-1000369
- Faille, D., El-Assaad, F., Mitchell, A. J., Alessi, M. C., Chimini, G., Fusai, T., . . . Combes, V. (2012). Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells. *J Cell Mol Med*, *16*(8), 1731-1738. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01434.x
- Falanga, A. (2005). Thrombophilia in cancer. *Semin Thromb Hemost*, *31*(1), 104-110. doi:10.1055/s-2005-863812
- Falls, L. A., Furie, B., & Furie, B. C. (2000). Role of phosphatidylethanolamine in assembly and function of the factor IXa-factor VIIIa complex on membrane surfaces. *Biochemistry*, *39*(43), 13216-13222.
- Frapas, E., David, A., Regenet, N., Toucheffeu, Y., Meyer, J., & Morla, O. (2016). Pancreatic carcinoma: Key-points from diagnosis to treatment. *Diagn Interv Imaging*. doi:10.1016/j.diii.2016.07.008
- Freyssinet, J. M. (2003). Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J Thromb Haemost*, *1*(7), 1655-1662.
- Furlan-Freguia, C., Marchese, P., Gruber, A., Ruggeri, Z. M., & Ruf, W. (2011). P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest*, *121*(7), 2932-2944. doi:10.1172/jci46129
- Gapstur, S. M., Jacobs, E. J., Deka, A., McCullough, M. L., Patel, A. V., & Thun, M. J. (2011). Association of alcohol intake with pancreatic cancer mortality in never smokers. *Arch Intern Med*, *171*(5), 444-451. doi:10.1001/archinternmed.2010.536
- Geddings, J. E., Hisada, Y., Boulaftali, Y., Getz, T. M., Whelihan, M., Fuentes, R., . . . Mackman, N. (2016). Tissue factor-positive tumor microvesicles activate platelets and enhance thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*, *14*(1), 153-166. doi:10.1111/jth.13181
- Geddings, J. E., & Mackman, N. (2013). Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. *Blood*, *122*(11), 1873-1880. doi:10.1182/blood-2013-04-460139
- Genkinger, J. M., Spiegelman, D., Anderson, K. E., Bergkvist, L., Bernstein, L., van den Brandt, P. A., . . . Smith-Warner, S. A. (2009). Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *18*(3), 765-776. doi:10.1158/1055-9965.epi-08-0880
- Ghaneh, P., Costello, E., & Neoptolemos, J. P. (2007). Biology and management of pancreatic cancer. *Gut*, *56*(8), 1134-1152. doi:10.1136/gut.2006.103333
- Gheldof, D., Mullier, F., Chatelain, B., Dogne, J. M., & Chatelain, C. (2013). Inhibition of tissue factor pathway inhibitor increases the sensitivity of thrombin generation assay to procoagulant microvesicles. *Blood Coagul Fibrinolysis*, *24*(5), 567-572. doi:10.1097/MBC.0b013e328360a56e
- Gilbert, G. E., & Arena, A. A. (1995). Phosphatidylethanolamine induces high affinity binding sites for factor VIII on membranes containing phosphatidyl-L-serine. *J Biol Chem*, *270*(31), 18500-18505.
- Ginestra, A., Miceli, D., Dolo, V., Romano, F. M., & Vittorelli, M. L. (1999). Membrane vesicles in ovarian cancer fluids: a new potential marker. *Anticancer Res*, *19*(4c), 3439-3445.
- Gordon, S. G., & Mourad, A. M. (1991). The site of activation of factor X by cancer procoagulant. *Blood Coagul Fibrinolysis*, *2*(6), 735-739.
- Grant, R. C., Selander, I., Connor, A. A., Selvarajah, S., Borgida, A., Briollais, L., . . . Gallinger, S. (2015). Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *148*(3), 556-564. doi:10.1053/j.gastro.2014.11.042
- Graves, L. E., Ariztia, E. V., Navari, J. R., Matzel, H. J., Stack, M. S., & Fishman, D. A. (2004). Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles. *Cancer Res*, *64*(19), 7045-7049. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1800
- Güngör, C., Hofmann, B. T., Wolters-Eisfeld, G., & Bockhorn, M. (2014). Pancreatic cancer. *Br J Pharmacol*, *171*(4), 849-858. doi:10.1111/bph.12401

- Halliez, M., Fouassier, M., Robillard, N., Ternisien, C., Sigaud, M., Trossaert, M., & Bene, M. C. (2015). Detection of phosphatidyl serine on activated platelets' surface by flow cytometry in whole blood: a simpler test for the diagnosis of Scott syndrome. *Br J Haematol*. doi:10.1111/bjh.13391
- Heit, J. A., Silverstein, M. D., Mohr, D. N., Petterson, T. M., O'Fallon, W. M., & Melton, L. J., 3rd. (2000). Risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based case-control study. *Arch Intern Med*, *160*(6), 809-815.
- Hellum, M., Franco-Lie, I., Ovstebo, R., Hauge, T., & Henriksson, C. E. (2017). The effect of corn trypsin inhibitor, anti-tissue factor pathway inhibitor antibodies and phospholipids on microvesicle-associated thrombin generation in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *PLoS One*, *12*(9), e0184579. doi:10.1371/journal.pone.0184579
- Hess, C., & Schifferli, J. A. (2003). Immune adherence revisited: novel players in an old game. *News Physiol Sci*, *18*, 104-108.
- Hisada, Y., Alexander, W., Kasthuri, R., Voorhees, P., Mobarrez, F., Taylor, A., . . . Mackman, N. (2016). Measurement of microparticle tissue factor activity in clinical samples: A summary of two tissue factor-dependent FXa generation assays. *Thromb Res*, *139*, 90-97. doi:10.1016/j.thromres.2016.01.011
- Holme, P. A., Orvim, U., Hamers, M. J., Solum, N. O., Brosstad, F. R., Barstad, R. M., & Sakariassen, K. S. (1997). Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *17*(4), 646-653.
- Hugel, B., Martinez, M. C., Kunzelmann, C., & Freyssinet, J. M. (2005). Membrane microparticles: two sides of the coin. *Physiology (Bethesda)*, *20*, 22-27. doi:10.1152/physiol.00029.2004
- Italiano, J. E., Jr., Mairuhu, A. T., & Flaumenhaft, R. (2010). Clinical relevance of microparticles from platelets and megakaryocytes. *Curr Opin Hematol*, *17*(6), 578-584. doi:10.1097/MOH.0b013e32833e77ee
- Janowska-Wieczorek, A., Marquez-Curtis, L. A., Wysoczynski, M., & Ratajczak, M. Z. (2006). Enhancing effect of platelet-derived microvesicles on the invasive potential of breast cancer cells. *Transfusion*, *46*(7), 1199-1209. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00871.x
- Janowska-Wieczorek, A., Wysoczynski, M., Kijowski, J., Marquez-Curtis, L., Machalinski, B., Ratajczak, J., & Ratajczak, M. Z. (2005). Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer*, *113*(5), 752-760. doi:10.1002/ijc.20657
- Kahn, R., Mossberg, M., Stahl, A. L., Johansson, K., Lopatko Lindman, I., Heijl, C., . . . Karpman, D. (2017). Microvesicle transfer of kinin B1-receptors is a novel inflammatory mechanism in vasculitis. *Kidney Int*, *91*(1), 96-105. doi:10.1016/j.kint.2016.09.023
- Kamocka, M., Pollard, M., Suckow, M., Mielicki, W. P., & Rosen, E. D. (2008). Rat prostate tumors express cancer procoagulant, an activator of coagulation factor X. *Comp Med*, *58*(3), 282-286.
- Kaur, S., Baine, M. J., Jain, M., Sasson, A. R., & Batra, S. K. (2012). Early diagnosis of pancreatic cancer: challenges and new developments. *Biomark Med*, *6*(5), 597-612. doi:10.2217/bmm.12.69
- Kawamoto, T., Ohga, N., Akiyama, K., Hirata, N., Kitahara, S., Maishi, N., . . . Hida, K. (2012). Tumor-derived microvesicles induce proangiogenic phenotype in endothelial cells via endocytosis. *PLoS One*, *7*(3), e34045. doi:10.1371/journal.pone.0034045
- Keuren, J. F., Magdeleyns, E. J., Govers-Riemslog, J. W., Lindhout, T., & Curvers, J. (2006). Effects of storage-induced platelet microparticles on the initiation and propagation phase of blood coagulation. *Br J Haematol*, *134*(3), 307-313. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06167.x
- Khorana, A. A., Ahrendt, S. A., Ryan, C. K., Francis, C. W., Hruban, R. H., Hu, Y. C., . . . Taubman, M. B. (2007). Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *13*(10), 2870-2875. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-2351
- Khorana, A. A., & Fine, R. L. (2004). Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol*, *5*(11), 655-663. doi:10.1016/s1470-2045(04)01606-7
- Khorana, A. A., Francis, C. W., Culakova, E., Kuderer, N. M., & Lyman, G. H. (2007). Thromboembolism is a leading cause of death in cancer patients receiving outpatient chemotherapy. *J Thromb Haemost*, *5*(3), 632-634. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02374.x
- Kim, H. K., Song, K. S., Chung, J. H., Lee, K. R., & Lee, S. N. (2004). Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro. *Br J Haematol*, *124*(3), 376-384.

- Kiouptsi, K., & Reinhardt, C. (2016). Protein disulfide-isomerase - a trigger of tissue factor-dependent thrombosis. *Clin Hemorheol Microcirc*, *64*(3), 279-286. doi:10.3233/ch-168106
- Kolodecik, T., Shugrue, C., Ashat, M., & Thrower, E. C. (2013). Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. *Front Physiol*, *4*, 415. doi:10.3389/fphys.2013.00415
- Kunzelmann, K., Nilius, B., Owsianik, G., Schreiber, R., Ousingsawat, J., Sirianant, L., . . . Heemskerk, J. W. (2014). Molecular functions of anoctamin 6 (TMEM16F): a chloride channel, cation channel, or phospholipid scramblase? *Pflugers Arch*, *466*(3), 407-414. doi:10.1007/s00424-013-1305-1
- Lacroix, R., Judicone, C., Mooberry, M., Boucekine, M., Key, N. S., & Dignat-George, F. (2013). Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haemost*. doi:10.1111/jth.12207
- Langer, F. (2015). [Haemostatic aspects in clinical oncology]. *Hamostaseologie*, *35*(2), 152-164; quiz 165. doi:10.5482/hamo-14-11-0057
- Langer, F., & Ruf, W. (2014). Synergies of phosphatidylserine and protein disulfide isomerase in tissue factor activation. *Thromb Haemost*, *111*(4), 590-597. doi:10.1160/th13-09-0802
- Lannan, K. L., Sahler, J., Kim, N., Spinelli, S. L., Maggirwar, S. B., Garraud, O., . . . Phipps, R. P. (2015). Breaking the mold: transcription factors in the anucleate platelet and platelet-derived microparticles. *Front Immunol*, *6*, 48. doi:10.3389/fimmu.2015.00048
- Lentz, B. R. (2003). Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog Lipid Res*, *42*(5), 423-438.
- Leroyer, A. S., Isobe, H., Leseche, G., Castier, Y., Wassef, M., Mallat, Z., . . . Boulanger, C. M. (2007). Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*, *49*(7), 772-777. doi:10.1016/j.jacc.2006.10.053
- Levitan, N., Dowlati, A., Remick, S. C., Tahsildar, H. I., Sivinski, L. D., Beyth, R., & Rimm, A. A. (1999). Rates of initial and recurrent thromboembolic disease among patients with malignancy versus those without malignancy. Risk analysis using Medicare claims data. *Medicine (Baltimore)*, *78*(5), 285-291.
- Lima, L. G., & Monteiro, R. Q. (2013). Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Biosci Rep*, *33*(5). doi:10.1042/bsr20130057
- Lovren, F., & Verma, S. (2013). Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem*, *59*(8), 1166-1174. doi:10.1373/clinchem.2012.199711
- Lucas, A. L., Frado, L. E., Hwang, C., Kumar, S., Khanna, L. G., Levinson, E. J., . . . Frucht, H. (2014). BRCA1 and BRCA2 germline mutations are frequently demonstrated in both high-risk pancreatic cancer screening and pancreatic cancer cohorts. *Cancer*, *120*(13), 1960-1967. doi:10.1002/cncr.28662
- Lysov, Z., Dwivedi, D. J., Gould, T. J., & Liaw, P. C. (2016). Procoagulant effects of lung cancer chemotherapy: impact on microparticles and cell-free DNA. *Blood Coagul Fibrinolysis*. doi:10.1097/mbc.0000000000000546
- Mackman, N. (2005). Tissue-specific hemostasis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *25*(11), 2273-2281. doi:10.1161/01.atv.0000183884.06371.52
- Malvezzi, M., Bertuccio, P., Rosso, T., Rota, M., Levi, F., La Vecchia, C., & Negri, E. (2015). European cancer mortality predictions for the year 2015: does lung cancer have the highest death rate in EU women? *Ann Oncol*, *26*(4), 779-786. doi:10.1093/annonc/mdv001
- Mandal, S. K., Iakhsiaev, A., Pendurthi, U. R., & Rao, L. V. (2005). Acute cholesterol depletion impairs functional expression of tissue factor in fibroblasts: modulation of tissue factor activity by membrane cholesterol. *Blood*, *105*(1), 153-160. doi:10.1182/blood-2004-03-0990
- Manly, D. A., Boles, J., & Mackman, N. (2011). Role of tissue factor in venous thrombosis. *Annu Rev Physiol*, *73*, 515-525. doi:10.1146/annurev-physiol-042210-121137
- Manukyan, D., von Bruehl, M. L., Massberg, S., & Engelmann, B. (2008). Protein disulfide isomerase as a trigger for tissue factor-dependent fibrin generation. *Thromb Res*, *122* Suppl 1, S19-22. doi:10.1016/s0049-3848(08)70013-6
- Mao, Y., Tao, M., Jia, X., Xu, H., Chen, K., Tang, H., & Li, D. (2015). Effect of Diabetes Mellitus on Survival in Patients with Pancreatic Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep*, *5*, 17102. doi:10.1038/srep17102

- Mege, D., Panicot-Dubois, L., Ouaisi, M., Robert, S., Sielezneff, I., Sastre, B., . . . Dubois, C. (2016). The origin and concentration of circulating microparticles differ according to cancer type and evolution: A prospective single-center study. *Int J Cancer*, *138*(4), 939-948. doi:10.1002/ijc.29837
- Minagar, A., Jy, W., Jimenez, J. J., Sheremata, W. A., Mauro, L. M., Mao, W. W., . . . Ahn, Y. S. (2001). Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*, *56*(10), 1319-1324.
- Misumi, K., Ogawa, H., Yasue, H., Soejima, H., Suefuji, H., Nishiyama, K., . . . Nakamura, S. (1998). Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, *81*(1), 22-26.
- Mohning, M. P., Thomas, S. M., Barthel, L., Mould, K. J., McCubbrey, A. L., Frasch, S. C., . . . Janssen, W. J. (2018). Phagocytosis of microparticles by alveolar macrophages during acute lung injury requires MerTK. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *314*(1), L69-l82. doi:10.1152/ajplung.00058.2017
- Morel, O., Morel, N., Jesel, L., Freyssinet, J. M., & Toti, F. (2011). Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Semin Immunopathol*, *33*(5), 469-486. doi:10.1007/s00281-010-0239-3
- Morrell, C. N., Aggrey, A. A., Chapman, L. M., & Modjeski, K. L. (2014). Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells. *Blood*, *123*(18), 2759-2767. doi:10.1182/blood-2013-11-462432
- Mostefai, H. A., Andriantsitohaina, R., & Martinez, M. C. (2008). Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer. *Physiol Res*, *57*(3), 311-320.
- Mrvar-Brecko, A., Sustar, V., Jansa, V., Stukelj, R., Jansa, R., Mujagic, E., . . . Kralj-Iglic, V. (2010). Isolated microvesicles from peripheral blood and body fluids as observed by scanning electron microscope. *Blood Cells Mol Dis*, *44*(4), 307-312. doi:10.1016/j.bcmd.2010.02.003
- Muller, I., Klocke, A., Alex, M., Kotzsch, M., Luther, T., Morgenstern, E., . . . Engelmann, B. (2003). Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *Faseb j*, *17*(3), 476-478. doi:10.1096/fj.02-0574fje
- Munnix, I. C., Harmsma, M., Giddings, J. C., Collins, P. W., Feijge, M. A., Comfurius, P., . . . Bevers, E. M. (2003). Store-mediated calcium entry in the regulation of phosphatidylserine exposure in blood cells from Scott patients. *Thromb Haemost*, *89*(4), 687-695. doi:10.1267/thro03040687
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., & D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, *123*(Pt 10), 1603-1611. doi:10.1242/jcs.064386
- Murphy, W. G., Moore, J. C., & Kelton, J. G. (1987). Calcium-dependent cysteine protease activity in the sera of patients with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood*, *70*(5), 1683-1687.
- Neuenschwander, P. F., Bianco-Fisher, E., Rezaie, A. R., & Morrissey, J. H. (1995). Phosphatidylethanolamine augments factor VIIa-tissue factor activity: enhancement of sensitivity to phosphatidylserine. *Biochemistry*, *34*(43), 13988-13993.
- Nieri, D., Neri, T., Petrini, S., Vagaggini, B., Paggiaro, P., & Celi, A. (2016). Cell-derived microparticles and the lung. *Eur Respir Rev*, *25*(141), 266-277. doi:10.1183/16000617.0009-2016
- Nomura, S., Nakamura, T., Cone, J., Tandon, N. N., & Kambayashi, J. (2000). Cytometric analysis of high shear-induced platelet microparticles and effect of cytokines on microparticle generation. *Cytometry*, *40*(3), 173-181.
- Nomura, S., & Shimizu, M. (2015). Clinical significance of procoagulant microparticles. *J Intensive Care*, *3*(1), 2. doi:10.1186/s40560-014-0066-z
- Norling, L. V., & Dalli, J. (2013). Microparticles are novel effectors of immunity. *Curr Opin Pharmacol*, *13*(4), 570-575. doi:10.1016/j.coph.2013.05.008
- Nozaki, T., Sugiyama, S., Sugamura, K., Ohba, K., Matsuzawa, Y., Konishi, M., . . . Ogawa, H. (2010). Prognostic value of endothelial microparticles in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*, *12*(11), 1223-1228. doi:10.1093/eurjhf/hfq145
- Ohkubo, Y. Z., Morrissey, J. H., & Tajkhorshid, E. (2010). Dynamical view of membrane binding and complex formation of human factor VIIa and tissue factor. *J Thromb Haemost*, *8*(5), 1044-1053. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03826.x

- Osterud, B., & Bjorklid, E. (2006). Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost*, 32(1), 11-23. doi:10.1055/s-2006-933336
- Owens, A. P., 3rd, & Mackman, N. (2010). Tissue factor and thrombosis: The clot starts here. *Thromb Haemost*, 104(3), 432-439. doi:10.1160/th09-11-0771
- Paudel, K. R., Panth, N., & Kim, D. W. (2016). Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression. *Scientifica (Cairo)*, 2016, 8514056. doi:10.1155/2016/8514056
- Pfeiler, S., Thakur, M., Grunauer, P., Megens, R. T. A., Joshi, U., Coletti, R., . . . Engelmann, B. (2019). CD36-triggered cell invasion and persistent tissue colonization by tumor microvesicles during metastasis. *Faseb j*, 33(2), 1860-1872. doi:10.1096/fj.201800985R
- Pichler Hefti, J., Leichtle, A., Stutz, M., Hefti, U., Geiser, T., Huber, A. R., & Merz, T. M. (2016). Increased endothelial microparticles and oxidative stress at extreme altitude. *Eur J Appl Physiol*. doi:10.1007/s00421-015-3309-3
- Pokharel, D., Padula, M. P., Lu, J. F., Tacchi, J. L., Luk, F., Djordjevic, S. P., & Bebawy, M. (2014). Proteome analysis of multidrug-resistant, breast cancer-derived microparticles. *J Extracell Vesicles*, 3. doi:10.3402/jev.v3.24384
- Popescu, N. I., Lupu, C., & Lupu, F. (2010). Extracellular protein disulfide isomerase regulates coagulation on endothelial cells through modulation of phosphatidylserine exposure. *Blood*, 116(6), 993-1001. doi:10.1182/blood-2009-10-249607
- Porro, C., Lepore, S., Trotta, T., Castellani, S., Ratclif, L., Battaglino, A., . . . Maffione, A. B. (2010). Isolation and characterization of microparticles in sputum from cystic fibrosis patients. *Respir Res*, 11, 94. doi:10.1186/1465-9921-11-94
- Prydz, H., Camerer, E., Rottingen, J. A., Wiiger, M. T., & Gjernes, E. (1999). Cellular consequences of the initiation of blood coagulation. *Thromb Haemost*, 82(2), 183-192.
- Quaglia, M., Dellepiane, S., Guglielmetti, G., Merlotti, G., Castellano, G., & Cantaluppi, V. (2020). Extracellular Vesicles as Mediators of Cellular Crosstalk Between Immune System and Kidney Graft. *Front Immunol*, 11, 74. doi:10.3389/fimmu.2020.00074
- Rand, J. H. (2000). Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*, 15(2), 107-111. doi:10.1006/jaut.2000.0410
- Rao, L. V., Kothari, H., & Pendurthi, U. R. (2012). Tissue factor encryption and decryption: facts and controversies. *Thromb Res*, 129 Suppl 2, S13-17. doi:10.1016/j.thromres.2012.02.021
- Rautou, P. E., Leroyer, A. S., Ramkhelawon, B., Devue, C., Duflaut, D., Vion, A. C., . . . Boulanger, C. M. (2011). Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circ Res*, 108(3), 335-343. doi:10.1161/circresaha.110.237420
- Raynel, S., Padula, M. P., Marks, D. C., & Johnson, L. (2015). Cryopreservation alters the membrane and cytoskeletal protein profile of platelet microparticles. *Transfusion*, 55(10), 2422-2432. doi:10.1111/trf.13165
- Reinhardt, C., von Bruhl, M. L., Manukyan, D., Grahl, L., Lorenz, M., Altmann, B., . . . Engelmann, B. (2008). Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation. *J Clin Invest*, 118(3), 1110-1122. doi:10.1172/jci32376
- Ren, J. G., Man, Q. W., Zhang, W., Li, C., Xiong, X. P., Zhu, J. Y., . . . Liu, B. (2016). Elevated Level of Circulating Platelet-derived Microparticles in Oral Cancer. *J Dent Res*, 95(1), 87-93. doi:10.1177/0022034515592593
- Saito, Y., Hashimoto, Y., Kuroda, J., Yasunaga, M., Koga, Y., Takahashi, A., & Matsumura, Y. (2011). The inhibition of pancreatic cancer invasion-metastasis cascade in both cellular signal and blood coagulation cascade of tissue factor by its neutralisation antibody. *Eur J Cancer*, 47(14), 2230-2239. doi:10.1016/j.ejca.2011.04.028
- Sartori, M. T., Della Puppa, A., Ballin, A., Saggiorato, G., Bernardi, D., Padoan, A., . . . Cella, G. (2011). Prothrombotic state in glioblastoma multiforme: an evaluation of the procoagulant activity of circulating microparticles. *J Neurooncol*, 104(1), 225-231. doi:10.1007/s11060-010-0462-8
- Schneitler, S., Kropil, P., Riemer, J., Antoch, G., Knoefel, W. T., Haussinger, D., & Graf, D. (2015). Metastasized pancreatic carcinoma with neoadjuvant FOLFIRINOX therapy and R0 resection. *World J Gastroenterol*, 21(20), 6384-6390. doi:10.3748/wjg.v21.i20.6384

- Shah, M. D., Bergeron, A. L., Dong, J. F., & Lopez, J. A. (2008). Flow cytometric measurement of microparticles: pitfalls and protocol modifications. *Platelets*, *19*(5), 365-372. doi:10.1080/09537100802054107
- Sinauridze, E. I., Kireev, D. A., Popenko, N. Y., Pichugin, A. V., Panteleev, M. A., Krymskaya, O. V., & Ataullakhanov, F. I. (2007). Platelet microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated platelets. *Thromb Haemost*, *97*(3), 425-434.
- Sinning, J. M., Losch, J., Walenta, K., Bohm, M., Nickenig, G., & Werner, N. (2011). Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*, *32*(16), 2034-2041. doi:10.1093/eurheartj/ehq478
- Six, K. R., Devloo, R., Van Aelst, B., Vandekerckhove, P., Feys, H. B., & Compernelle, V. (2017). A Microfluidic Flow Chamber Model for Platelet Transfusion and Hemostasis Measures Platelet Deposition and Fibrin Formation in Real-time. *J Vis Exp*(120). doi:10.3791/55351
- Stahl, A. L., Sartz, L., & Karpman, D. (2011). Complement activation on platelet-leukocyte complexes and microparticles in enterohemorrhagic Escherichia coli-induced hemolytic uremic syndrome. *Blood*, *117*(20), 5503-5513. doi:10.1182/blood-2010-09-309161
- Stark, K., Schubert, I., Joshi, U., Kilani, B., Hoseinpour, P., Thakur, M., . . . Massberg, S. (2018). Distinct Pathogenesis of Pancreatic Cancer Microvesicle-Associated Venous Thrombosis Identifies New Antithrombotic Targets In Vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *38*(4), 772-786. doi:10.1161/atvbaha.117.310262
- Street, J. M., Barran, P. E., Mackay, C. L., Weidt, S., Balmforth, C., Walsh, T. S., . . . Dear, J. W. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *J Transl Med*, *10*, 5. doi:10.1186/1479-5876-10-5
- Subramaniam, S., Jurk, K., Hobohm, L., Jackel, S., Saffarzadeh, M., Schwierczek, K., . . . Ruf, W. (2017). Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development. *Blood*, *129*(16), 2291-2302. doi:10.1182/blood-2016-11-749879
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., & Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J Biol Chem*, *288*(19), 13305-13316. doi:10.1074/jbc.M113.457937
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J., & Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature*, *468*(7325), 834-838. doi:10.1038/nature09583
- Svanstrom, A., & Grantham, J. (2016). The molecular chaperone CCT modulates the activity of the actin filament severing and capping protein gelsolin in vitro. *Cell Stress Chaperones*, *21*(1), 55-62. doi:10.1007/s12192-015-0637-5
- Takano, K., Asazuma, N., Satoh, K., Yatomi, Y., & Ozaki, Y. (2004). Collagen-induced generation of platelet-derived microparticles in whole blood is dependent on ADP released from red blood cells and calcium ions. *Platelets*, *15*(4), 223-229. doi:10.1080/09537100410001682797
- Talamini, G., Falconi, M., Bassi, C., Sartori, N., Salvia, R., Caldiron, E., . . . Cavallini, G. (1999). Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol*, *94*(5), 1253-1260. doi:10.1111/j.1572-0241.1999.01075.x
- Tavoosi, N., Davis-Harrison, R. L., Pogorelov, T. V., Ohkubo, Y. Z., Arcario, M. J., Clay, M. C., . . . Morrissey, J. H. (2011). Molecular determinants of phospholipid synergy in blood clotting. *J Biol Chem*, *286*(26), 23247-23253. doi:10.1074/jbc.M111.251769
- Terrisse, A. D., Puech, N., Allart, S., Gourdy, P., Xuereb, J. M., Payrastre, B., & Sie, P. (2010). Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow. *J Thromb Haemost*, *8*(12), 2810-2819. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.04088.x
- Tesselaar, M. E., Romijn, F. P., Van Der Linden, I. K., Prins, F. A., Bertina, R. M., & Osanto, S. (2007). Microparticle-associated tissue factor activity: a link between cancer and thrombosis? *J Thromb Haemost*, *5*(3), 520-527. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02369.x
- Thaler, J., Ay, C., Mackman, N., Bertina, R. M., Kaider, A., Marosi, C., . . . Pabinger, I. (2012). Microparticle-associated tissue factor activity, venous thromboembolism and mortality in pancreatic, gastric, colorectal and brain cancer patients. *J Thromb Haemost*, *10*(7), 1363-1370. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04754.x

- Thaler, J., Ay, C., Mackman, N., Metz-Schimmerl, S., Stift, J., Kaider, A., . . . Pabinger, I. (2013). Microparticle-associated tissue factor activity in patients with pancreatic cancer: correlation with clinicopathological features. *Eur J Clin Invest*, *43*(3), 277-285. doi:10.1111/eci.12042
- Timp, J. F., Braekkan, S. K., Versteeg, H. H., & Cannegieter, S. C. (2013). Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood*, *122*(10), 1712-1723. doi:10.1182/blood-2013-04-460121
- Tschuur, C., Asmis, L. M., Lenzlinger, P. M., Tanner, M., Harter, L., Keel, M., . . . Stover, J. F. (2008). In vitro norepinephrine significantly activates isolated platelets from healthy volunteers and critically ill patients following severe traumatic brain injury. *Crit Care*, *12*(3), R80. doi:10.1186/cc6931
- Tushuizen, M. E., Diamant, M., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2011). Cell-derived microparticles in the pathogenesis of cardiovascular disease: friend or foe? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*(1), 4-9. doi:10.1161/atvbaha.109.200998
- Tzanakakis, G. N., Margioris, A. N., Tsatsakis, A. M., & Vezeridis, M. P. (2003). The metastatic potential of human pancreatic cell lines in the liver of nude mice correlates well with cathepsin B activity. *Int J Gastrointest Cancer*, *34*(1), 27-38. doi:10.1385/ijgc:34:1:27
- Vadivel, K., & Bajaj, S. P. (2012). Structural biology of factor VIIa/tissue factor initiated coagulation. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *17*, 2476-2494.
- van den Berg, Y. W., Osanto, S., Reitsma, P. H., & Versteeg, H. H. (2012). The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood*, *119*(4), 924-932. doi:10.1182/blood-2011-06-317685
- Van Der Meijden, P. E., Van Schilfgaarde, M., Van Oerle, R., Renne, T., ten Cate, H., & Spronk, H. M. (2012). Platelet- and erythrocyte-derived microparticles trigger thrombin generation via factor XIIa. *J Thromb Haemost*, *10*(7), 1355-1362. doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04758.x
- VanWijk, M. J., VanBavel, E., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2003). Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, *59*(2), 277-287.
- Vinuela-Berni, V., Doniz-Padilla, L., Figueroa-Vega, N., Portillo-Salazar, H., Abud-Mendoza, C., Baranda, L., & Gonzalez-Amaro, R. (2015). Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Immunol*, *180*(3), 442-451. doi:10.1111/cei.12598
- Waddell, N., Pajic, M., Patch, A. M., Chang, D. K., Kassahn, K. S., Bailey, P., . . . Grimmond, S. M. (2015). Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*, *518*(7540), 495-501. doi:10.1038/nature14169
- Walsh, J. D., & Geczy, C. L. (1991). Discordant expression of tissue factor antigen and procoagulant activity on human monocytes activated with LPS and low dose cycloheximide. *Thromb Haemost*, *66*(5), 552-558.
- Wang, J., Pendurthi, U. R., & Rao, L. V. M. (2019). Acid sphingomyelinase plays a critical role in LPS- and cytokine-induced tissue factor procoagulant activity. *Blood*, *134*(7), 645-655. doi:10.1182/blood.2019001400
- Wang, Y., Duan, H., Yang, X., & Guo, J. (2014). Cigarette smoking and the risk of pancreatic cancer: a case-control study. *Med Oncol*, *31*(10), 184. doi:10.1007/s12032-014-0184-4
- Whiteside, T. L. (2005). Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *Br J Cancer*, *92*(2), 209-211. doi:10.1038/sj.bjc.6602360
- Williamson, P., & Schlegel, R. A. (2002). Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta*, *1585*(2-3), 53-63.
- Wolberg, A. S., Kon, R. H., Monroe, D. M., Ezban, M., Roberts, H. R., & Hoffman, M. (2000). Deencryption of cellular tissue factor is independent of its cytoplasmic domain. *Biochem Biophys Res Commun*, *272*(2), 332-336. doi:10.1006/bbrc.2000.2783
- Wolberg, A. S., Monroe, D. M., Roberts, H. R., & Hoffman, M. R. (1999). Tissue factor de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms. *Blood Coagul Fibrinolysis*, *10*(4), 201-210.
- Wormann, S. M., Song, L., Ai, J., Diakopoulos, K. N., Kurkowski, M. U., Gorgulu, K., . . . Algul, H. (2016). Loss of P53 Function Activates JAK2-STAT3 Signaling to Promote Pancreatic Tumor Growth, Stroma Modification, and Gemcitabine Resistance in Mice and Is Associated With Patient Survival. *Gastroenterology*, *151*(1), 180-193.e112. doi:10.1053/j.gastro.2016.03.010

- Yadav, D., & Lowenfels, A. B. (2013). The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology*, *144*(6), 1252-1261. doi:10.1053/j.gastro.2013.01.068
- Yang, H., Kim, A., David, T., Palmer, D., Jin, T., Tien, J., . . . Jan, L. Y. (2012). TMEM16F forms a Ca²⁺-activated cation channel required for lipid scrambling in platelets during blood coagulation. *Cell*, *151*(1), 111-122. doi:10.1016/j.cell.2012.07.036
- Yates, K. R., Welsh, J., Echris, H. H., Greenman, J., Maraveyas, A., & Madden, L. A. (2011). Pancreatic cancer cell and microparticle procoagulant surface characterization: involvement of membrane-expressed tissue factor, phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine. *Blood Coagul Fibrinolysis*, *22*(8), 680-687. doi:10.1097/MBC.0b013e32834ad7bc
- Zahra, S., Anderson, J. A., Stirling, D., & Ludlam, C. A. (2011). Microparticles, malignancy and thrombosis. *Br J Haematol*, *152*(6), 688-700. doi:10.1111/j.1365-2141.2010.08452.x
- Zebedin, E., Koenig, X., Radenkovic, M., Pankevych, H., Todt, H., Freissmuth, M., & Hilber, K. (2008). Effects of duramycin on cardiac voltage-gated ion channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *377*(1), 87-100. doi:10.1007/s00210-007-0248-5
- Zhao, M., Li, Z., & Bugenhagen, S. (2008). 99mTc-labeled duramycin as a novel phosphatidylethanolamine-binding molecular probe. *J Nucl Med*, *49*(8), 1345-1352. doi:10.2967/jnumed.107.048603
- Zhou, B., Hogg, P. J., & Grater, F. (2017). One-Way Allosteric Communication between the Two Disulfide Bonds in Tissue Factor. *Biophys J*, *112*(1), 78-86. doi:10.1016/j.bpj.2016.12.003
- Zillmann, A., Luther, T., Muller, I., Kotsch, M., Spannagl, M., Kauke, T., . . . Engelmann, B. (2001). Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun*, *281*(2), 603-609. doi:10.1006/bbrc.2001.4399
- Zwaal, R. F., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (1993). Mechanism and function of changes in membrane-phospholipid asymmetry in platelets and erythrocytes. *Biochem Soc Trans*, *21*(2), 248-253.
- Zwaal, R. F., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (1998). Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta*, *1376*(3), 433-453.
- Zwaal, R. F., Comfurius, P., & Bevers, E. M. (2004). Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*, *1636*(2-3), 119-128. doi:10.1016/j.bbali.2003.07.003
- Zwicker, J. I., Furie, B. C., & Furie, B. (2007). Cancer-associated thrombosis. *Crit Rev Oncol Hematol*, *62*(2), 126-136. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.01.001
- Zwicker, J. I., Liebman, H. A., Neuberg, D., Lacroix, R., Bauer, K. A., Furie, B. C., & Furie, B. (2009). Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy. *Clin Cancer Res*, *15*(22), 6830-6840. doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-0371

9 Danksagung

Ich bedanke mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernd Engelmann für die freundliche Überlassung des spannenden Themas, seinem Engagement, die hervorragende Betreuung während der Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten sowie die angenehme Zusammenarbeit mit ihm.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser sowie Herrn Prof. Dr. med. Michael Vogeser verpflichtet, die mir durch die Bereitstellung der technischen Geräte die Durchführung meiner Experimente am Institut für Laboratoriumsmedizin ermöglicht haben.

Mein Dank gilt auch der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. med. Christiane Bruns für die Bereitstellung der Pankreaskarzinomzelllinien sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Steffen Massberg für die gute Kooperation.

Außerdem möchte ich meinen Dank den zahlreichen, blutspendenden Probanden aussprechen ohne die jegliche Versuche zur Fibrinbildung in Vollblut gar nicht in der Form möglich gewesen wären.

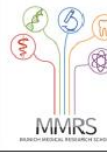
Ein großes Dankeschön geht auch an alle nicht genannten Mitarbeiter des Instituts für Laboratoriumsmedizin, die jederzeit helfend zur Seite standen sowie den Personenkreis um die Arbeitsgruppe von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Daniel Teupser, der mich mit guten Ratschlägen und technischen Geräten sehr unterstützte.

Ein besonderes Dankeschön geht an die ehemaligen Mitglieder meiner Arbeitsgruppe Susi, Davit, Avinash, Martina, Petra und Caspar, die mir viele methodische Grundkenntnisse der Laborarbeit vermittelten und sich allzeit mir gegenüber hilfsbereit zeigten.

Besonders hervorheben möchte ich hierbei Petra, mit der ich viele gemeinsame lustige Stunden im Labor verbracht habe, woraus sich inzwischen eine gute Freundschaft entwickelt hat.

Abschließend möchte ich mich noch insbesondere bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben, mir uneingeschränkt Unterstützung und Rückhalt zugesprochen haben und mich auf dem Weg zu dieser Arbeit geduldig und motivierend begleitet haben.

10 Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Bäumer, Markus

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Mechanismen der Fibrinbildung durch Pankreaskarzinomzellen und ihre Mikropartikel in vitro

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Basel, 04. Mai 2022

Markus Bäumer

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

11 Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Stark K., Schubert I., Joshi U., Kilani B., Hoseinpour P., Thakur M., Grünauer P., Pfeiler S., Schmidergall T., Stockhausen S., **Bäumer M.**, Chandraratne S., von Brühl ML., Lorenz M., Coletti R., Reese S., Laitinen I., Wörmann SM., Algül H., Bruns CJ., Ware J., Mackman N., Engelmann B., Massberg S.

Distinct pathogenesis of pancreatic cancer microvesicle associated venous thrombosis identifies new antithrombotic targets in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018 Apr; 38(4):772-786.

Weitere von dieser Arbeit unabhängige Publikationen:

Bäumer M., Grokovski R., Christ E., Benz M., Wild D.

Renal and hematologic toxicities of re-challenge [⁹⁰Y]- and/or [¹⁷⁷Lu]-DOTATOC in patients with neuroendocrine tumors. *In progress.*

Braun M., Cachovan M., Kaul F., Caobelli F., **Bäumer M.**, Vija A.H., Pagenstert G., Wild D., Kretzschmar M.

Accuracy comparison of various quantitative ^{99m}Tc-DPD SPECT/CT reconstruction techniques in patients with symptomatic hip- and knee joint prostheses. *Submitted to Journal of Nuclear Medicine.*

Kahl M., Gökçen A., Fischer S., **Bäumer M.**, Wiesner J., Lochnit G., Wygrecka M., Vilcinskas A., Preissner K.T.

Maggot Excretion Products from the Blowfly *Lucilia sericata* Contain Contact Phase/Intrinsic Pathway-like Proteases with Procoagulant Functions. *Thromb Haemost.* 2015 Jul 28; 114(2):277-88.