

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II – Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang A. Linke

**Die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter  
laminaren Fließbedingungen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Berger, Dominik Sebastian

aus Lörrach

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank U. Müller

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hermann Schillers
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2021

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Institut für Physiologie II – Direktor: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang A. Linke

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Hermann Schillers

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Johannes A. Eble

### **Zusammenfassung**

Die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter laminaren Fließbedingungen

Berger, Dominik Sebastian

Metastatische Ereignisse im Rahmen von Krebserkrankungen bedingen einen großen Teil der jährlichen Todesfälle in Industrienationen. Die entscheidende Rolle von Thrombozyten bei der Metastasenbildung konnte in den letzten Jahrzehnten immer weiter beleuchtet werden. So begünstigen sie die Invasion von Tumorzellen in Blutgefäße, ihr Überleben im Blutstrom und schließlich auch die Ausbildung eines Sekundärtumors. Neben der schützenden Ummantelung der im Blut zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) lassen neuere Erkenntnisse zusätzlich die Aufnahme von Thrombozyten durch CTCs als zugrunde liegenden Mechanismus vermuten.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Fließinkubationssystem entwickelt, das es ermöglicht, die Wechselwirkung von Tumorzellen und Thrombozyten unter laminaren Fließbedingungen quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten zunächst äußerlich an CTCs adhärten, um im zeitlichen Verlauf von diesen internalisiert zu werden.

Tumorstammzellen (CSCs) wird eine besondere Bedeutung für den Metastasierungsprozess zugeschrieben. Die in dieser Arbeit mittels *Sphere-formation Assay* gewonnenen CSCs zeichneten sich dadurch aus, mehr Thrombozyten in kürzerer Zeit an sich binden zu können. Eine Internalisierung letzterer konnte bei ihnen jedoch kaum beobachtet werden.

P-Selektin ist maßgeblich an der Kontaktbildung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten beteiligt. Durch den Einsatz des niedermolekularen Heparins, Tinzaparin, konnte dieses Oberflächenprotein inhibiert werden. Der hemmende Effekt auf die Wechselwirkung mit Thrombozyten war sowohl bei differenzierten Tumorzellen als auch Tumorstammzellen signifikant.

Aus dieser Arbeit geht hervor, dass Tumorzellen mit Thrombozyten unter Fließbedingungen P-Selektin-abhängig interagieren. Vor dem Hintergrund der damit einhergehenden Schutzwirkung ließ sich die besondere Rolle von Tumorstammzellen bei der Metastasierung erneut unterstreichen. Aus der sowohl äußerlichen Anheftung sowie Internalisierung der Blutplättchen lassen sich wichtige Schlüsse auf Metastasierungs-fördernde Mechanismen ziehen, die als Grundlage zur Erforschung antineoplastischer Therapiekonzepte dienen können.

Tag der mündlichen Prüfung: 21.12.2021

# ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel

## **Die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter laminaren Fließbedingungen**

im Institut für Physiologie II, Universitätsklinikum Münster

unter der Anleitung von

Prof. Dr. rer. nat. Hermann Schillers

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt habe.

Münster, den

---

Dominik Berger

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>I.1 Allgemeine Hintergrundinformationen</b>	<b>1</b>
<b>I.2 Thrombozyten</b>	<b>2</b>
I.2.1 Thrombozytäre Oberflächenproteine	2
I.2.2 Thrombozytäre Granula	2
I.2.3 Platelet-derived Microparticels	3
I.2.4 Die Hämostase	3
I.2.4.1 Initiationsphase	3
I.2.4.2 Extension	4
I.2.4.3 Stabilisation	5
I.2.5 Mechanismen zur Verhinderung ungewollter Plättchenaktivierung	6
I.2.6 Abbau der Thrombozyten	6
<b>I.3 Tumorzellen und Thrombozyten, ein Wechselspiel mit verheerenden Folgen</b>	<b>7</b>
I.3.1 Die Epithelial-mesenchymale Transition und ihre Bedeutung für die Tumorprogression	8
I.3.2 Thrombozyten schützen Tumorzellen im Blutkreislauf	10
I.3.2.1 Der <i>protektive Mantel</i>	10
I.3.2.2 Natürliche Killerzellen im Kampf gegen CTCs	11
I.3.2.3 Scherkräfte schaden CTCs	11
I.3.3 Tumorzellarrest und Extravasation	12
I.3.4 Etablierung einer <i>metastatischen Nische</i>	13
I.3.5 Die Wirkung von Tumorzellen auf Thrombozyten	14
I.3.5.1 Tumorzell-induzierte Thrombozytose	14
I.3.5.2 Tumorzellen aktivieren Thrombozyten	14
<b>I.4 Die Heterogenität der Tumorzellen</b>	<b>15</b>
I.4.1 Tumorstammzellen und ihre Eigenschaften	17
I.4.1.1 Plastizität der Tumorstammzellen	17
I.4.1.2 Die Bedeutung der EMT für Tumorstammzellen	18
I.4.2 Therapieresistenz der Tumorstammzellen	19
I.4.3 Identifizierung und Isolation von CSCs	20
<b>I.5 Fragestellung, Arbeitshypothese und Ziel der Untersuchung</b>	<b>21</b>
<b>II Material und Methoden</b>	<b>23</b>
<b>II.1 Materialien</b>	<b>23</b>
II.1.1 Geräte	23
II.1.2 Software	23
II.1.3 Laborutensilien	23
II.1.4 Chemikalien und Lösungen	24
II.1.5 Medien und Puffer	25
II.1.6 Verwendete Zelllinie	26
<b>II.2 Methoden</b>	<b>27</b>
II.2.1 Zellkultur	27
II.2.1.1 Vereinzlung der A549 Zellen	28

II.2.1.2	Selektion der Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften	28
II.2.1.3	Sphere-Formation Assay	28
II.2.1.4	Vereinzelung der CSCs	29
II.2.1.5	Zellzählung	30
II.2.2	Untersuchung der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion unter Fließbedingungen	30
II.2.2.1	Versuchsaufbau	30
II.2.2.2	Bestimmung einer praktikablen Flussgeschwindigkeit	31
II.2.2.3	Anpassung der Schlauchlänge	32
II.2.2.4	Pflege der Schläuche	33
II.2.3	Thrombozytenvorbereitung	33
II.2.3.1	Blutentnahme	33
II.2.3.2	Färbung der Thrombozyten mit PKH-67	33
II.2.3.3	Erstellung der Kontrolle	34
II.2.4	Die Anwendung von Tinzaparin	35
II.2.5	Erstellung des Inkubationsansatzes	35
II.2.6	Versuchsdurchführung	36
II.2.7	Fixierung der Zellen	37
II.2.8	Auswertung	37
II.2.8.1	Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers	37
II.2.8.2	Waschschritte vor der Untersuchung im Durchflusszytometer	37
II.2.8.3	Auswertung im Durchflusszytometer	38
II.2.8.4	Gating-Strategie	38
II.2.8.5	Untersuchung mit dem Konfokalmikroskop	39
II.2.8.6	Vorbereitung des FluoroDish	39
II.2.8.7	TRITC-WGA- und DAPI-Färbung	40
<b>II.3</b>	<b>Statistische Analysen</b>	<b>40</b>
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>III.1</b>	<b>Die Interaktion differenzierter A549-Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen</b>	<b>42</b>
<b>III.2</b>	<b>Die Interaktion von Tumorstammzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen</b>	<b>47</b>
<b>III.3</b>	<b>Der Einfluss von Tinzaparin auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen</b>	<b>53</b>
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
<b>IV.1</b>	<b>Betrachtung der Methoden</b>	<b>58</b>
IV.1.1	Das Schlauchmodell	58
IV.1.2	Der Inkubationsansatz	60
IV.1.2.1	Das Tumorzell-/Thrombozyten-Verhältnis	60
IV.1.2.2	Thrombozyten	60
IV.1.2.3	Tumorzellen	61
IV.1.2.4	Selektion Stammzell-ähnlicher Tumorzellen (CSCs)	61
IV.1.2.5	Tinzaparin	62
IV.1.3	Mögliche Fehlerquellen der Messverfahren	62
<b>IV.2</b>	<b>Betrachtung der Ergebnisse</b>	<b>63</b>
IV.2.1	Die Interaktion differenzierter Tumorzellen mit Thrombozyten unter Fließbedingungen	63
IV.2.1.1	Intrazelluläre Fluoreszenz	64
IV.2.1.2	Die Bedeutung internalisierter Thrombozyten für die Physiologie von Tumorzellen	66
IV.2.1.3	Die Beteiligung von PDMPs am metastatischen Geschehen	67
IV.2.2	Die Interaktion von Tumorstammzellen mit Thrombozyten unter Fließbedingungen	67

IV.2.2.1	Subpopulationen innerhalb eines Tumorzellkollektivs	68
IV.2.2.2	Der Stammzellstatus und die Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion	70
IV.2.3	Der Einfluss von Tinzaparin auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten	71
<b>IV.3</b>	<b>Ausblick</b>	<b>73</b>
<b><i>Bibliografie</i></b>		<b>74</b>
<b><i>Danksagung</i></b>		<b>90</b>
<b><i>Lebenslauf</i></b>		<b>91</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der thrombozytären Beteiligung am metastatischen Geschehen.....	8
Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von adhären-wachsenden Tumorzellen der Linie A549 mit einem 5x (A) und 10x (B) Objektiv.....	27
Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme nicht-adhäsiv wachsender und Sphäroid-bildender A549-Stammzellen mit einem 5x Objektiv .....	29
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.....	31
Abbildung 5: Darstellung einer Blutprobe nach erfolgter Zentrifugation.....	34
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Inkubationsansatzes im Schlauchsystem.....	36
Abbildung 7: Gating-Strategie zur Identifizierung der A549-Tumorzellen, Beseitigung von Duplets und Bestimmung des Anteils positiver Zellen.....	39
Abbildung 8: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von A549-Tumorzellen nach der Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen.....	43
Abbildung 9: Zeitabhängiger Zuwachs positiver A549-Zellen unter Fließbedingungen .....	44
Abbildung 10: Interaktionsmuster zwischen Thrombozyten und A549-Tumorzellen nach 5-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.....	45
Abbildung 11: Interaktionsmuster zwischen Thrombozyten und A549-Tumorzellen nach 45-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.....	46
Abbildung 12: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von Tumorstammzellen nach der Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen .....	47
Abbildung 13: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von Tumorstammzellen nach 1 und 2,5-minütiger Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen.....	48
Abbildung 14: Zeitabhängiger Zuwachs positiver Tumorstammzellen (CSCs) unter Fließbedingungen.....	49
Abbildung 15: Interaktionsmuster zwischen A549-Tumorstammzellen (CSCs) nach 5-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.....	50
Abbildung 16: Aufnahme einer vollständig von Thrombozyten umschlossenen Tumorstammzelle (CSC).....	50
Abbildung 17: Interaktionsmuster zwischen A549-Tumorstammzellen (CSCs) nach 45-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.....	51
Abbildung 18: Vergleich von A549-Tumorzellen und vorselektierten A549-Tumorstammzellen (CSCs) hinsichtlich ihrer Interaktion mit Thrombozyten nach 5-, 15-, 30- und 45-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.....	52
Abbildung 19: Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der positiven A549-Tumorzellen und CSCs.....	53
Abbildung 20: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von A549-Tumorzellen (A) und Tumorstammzellen (B) nach der Fließinkubation mit Thrombozyten unter dem Einfluss von Tinzaparin .....	55
Abbildung 21: Einfluss von Tinzaparin auf die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen.....	56
Abbildung 22: Einfluss von Tinzaparin auf die Wechselwirkung zwischen Tumorstammzellen (CSCs) und Thrombozyten unter Fließbedingungen.....	57

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	23
Tabelle 2: Verwendete Software.....	23
Tabelle 3: Verwendete Laborutensilien .....	24
Tabelle 4: Verwendete Zutaten und Chemikalien.....	25
Tabelle 5: Eingesetzte Wachstumsfaktoren .....	25
Tabelle 6: Eingesetzte Farbstoffe.....	25
Tabelle 7: Eingesetzte Medien und Puffer .....	26
Tabelle 8: Zusammensetzung des Kulturmediums .....	27
Tabelle 9: Zusammensetzung des im Rahmen des Sphere-formation-Assays eingesetzten Kulturmediums.....	29
Tabelle 10: Auflistung der Daten zu den verschiedenen Abschnitten des peripheren Gefäßsystems .....	31
Tabelle 11: Benötigte Schlauchlängen im Bezug zur angestrebten Inkubationszeit .....	33
Tabelle 12: Zusammensetzung des Inkubationsansatzes .....	35

## Abkürzungsverzeichnis

ABC-Transporter:	ATP-bindende Kasette-Transporter
ADP:	Adenosindiphosphat
ALDH1:	Aldehyd-Dehydrogenase 1
ATP:	Adenosintriphosphat
bFGF:	Basic fibroblast growth factor
BSA:	Bovines Serumalbumin
CD:	Cluster of differentiation
CLEC-2:	C-type lectin-like receptor 2
COX:	Cyclooxygenase
CSC:	Tumorstammzelle
CSF:	Koloniestimulierender Faktor
CTC:	Zirkulierende Tumorzelle
CXCL:	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand
CXCR:	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
DAPI:	4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride
ECM:	Extrazelluläre Matrix
EGF:	Epidermal growth factor
EMT:	Epithelial-mesenchymale Transition
EMT-TFs:	EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren
FGF:	Fibroblast growth factor-basic
GP:	Glykoprotein
HGF:	Hepatocyte growth factor
HSC:	Hämatopoetische Stammzelle
IGF:	Insulin-like growth factor-I
IL:	Interleukin
LDH:	Laktat-Dehydrogenase
Lgr5:	Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5
mRNA:	Messenger RNA
miRNA:	Micro RNA
MHC-I:	Major histocompatibility complex class I
MET:	Mesenchymal-epitheliale Transition
MFI:	Mittlere Fluoreszenzintensität
MMP:	Matrix-Metalloprotease
NF:	Nuclear factor
NK:	Natürliche Killerzelle

NO:	Stickstoffmonoxid
NRF2:	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
OLIG:	Oligodendrocyte transcription factor
PAR:	Protease-aktivierter Rezeptor
PDGF:	Platelet-derived growth factor
PDMP:	Platelet-derived microparticle
PFA:	Paraformaldehyd
PGI <sub>2</sub> :	Prostacyclin
POU3F2:	POU domain, class 3, transcription factor 2
PRP:	Platelet rich plasma
PSGL-1:	P-selectin glycoprotein ligand 1
SALL2:	Spalt-like transcription factor 2
SCC:	Surface connected compartment
SIRP $\alpha$ :	Signal regulatory protein $\alpha$
SOX:	SRY-related HMG-box
SP:	Seitpopulation
TCIPA:	Tumorinduzierte-Plättchenaggregation
TF:	Gewebefaktor
TGF- $\beta$ :	Transforming growth factor beta
TIMP-4:	Tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-4
TIM4:	T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 4
TPO:	Thrombopoietin
TRITC-WGA:	5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat-wheat germ agglutinin
TxA <sub>2</sub> :	Thromboxan A <sub>2</sub>
VCAM-1:	Vascular cell adhesion molecule 1
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VLA-4:	Very late antigen 4
vWF:	Von-Willebrand-Faktor
WHO:	Weltgesundheitsorganisation
WMA:	Weltärztebund
Wnt:	Wingless-INT
YAP1:	Yes-associated protein 1

# I Einleitung

## 1.1 Allgemeine Hintergrundinformationen

Der demografische Wandel stellt westliche Gesellschaften vor zahlreiche Herausforderungen. Mit steigendem Alter der Bevölkerung nimmt auch die Häufigkeit von Krebserkrankungen zu. Krebs wird definiert als eine Ansammlung von sich übermäßig vermehrender Zellen, die sich der Regulierung des Körpers entzogen haben (1). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) identifizierte in ihrem 2014 erschienenen *World Cancer Report* Tumorerkrankungen als die zweithäufigste Todesursache weltweit. 2012 starben acht Millionen Menschen an einem Tumorleiden oder an dessen Folgen. Weitere 14 Millionen Neuerkrankte wurden im selben Jahr diagnostiziert. Schätzungen gehen davon aus, dass die Zahl der Neuerkrankten bis 2025 auf 20 Millionen steigen wird (2).

In 90% der krebsbedingten Todesfälle liegen eine oder mehrere Metastasen vor (3). Die Metastasierung beschreibt den Prozess der Verschleppung vitaler Tumorzellen an eine vom Primärtumor entfernte Stelle im Körper mit anschließender Ausbildung eines Sekundärtumors (4). Mit dem Auftreten einer Metastase verschlechtert sich die Prognose des Patienten zumeist erheblich. So ändert sich mit dem Nachweis von Fernmetastasen die therapeutische Strategie von der lokalen operativen Entfernung und Bestrahlung des Tumors mit kurativer Absicht hin zu systemischen Ansätzen mit zumeist rein palliativer Intention (5).

Die Ausbildung von Fernmetastasen erfolgt über kanalikuläre Strukturen wie Lymph- (lymphogene Metastasierung) und Blutgefäße (hämatogene Metastasierung) (4). Die lymphogene Metastasierung findet hierbei zumeist zeitlich früher statt und ist in der Regel mit einer besseren Prognose verbunden als die hämatogene. Seltener erfolgt die Metastasierung entlang seröser Häute, über Sekretaustführungsgänge, Atemwege oder über Biopsie-Stichkanäle (6).

Der Fokus dieser wissenschaftlichen Arbeit liegt auf der hämatogenen Metastasierung. Es handelt sich hierbei um einen dynamischen Prozess, der mit dem Ausbruch einzelner Tumorzellen aus dem Zellkollektiv beginnt. Durch die anschließende Invasion in ein angrenzendes Blutgefäß gelangen sie ins Blutsystem und werden von da an als zirkulierende Tumorzellen (CTCs) bezeichnet. Gelingt es der Tumorzelle, das Gefäß zu einem späteren Zeitpunkt wieder zu verlassen (Extravasation), kann sie unter den richtigen Bedingungen eine metastatische Nische etablieren und so das Wachstum eines Sekundärtumors induzieren (6).

Jeder der oben beschriebenen Schritte stellt zahlreiche Herausforderungen an die metastasierende Tumorzelle. Neben den durch den Blutstrom generierten biomechanischen Kräften, den Scherkräften, verursacht auch die Konfrontation mit dem menschlichen Immunsystem einen hohen Überlebensdruck für die CTCs. Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere natürliche Killerzellen (NKs) an ihrer Elimination beteiligt sind (7). Man geht davon aus, dass nur 0,01% der Tumorzellen, die ihren Zellverbund verlassen, am Ende einen Sekundärtumor ausbilden (8). Aktuelle Forschungsergebnisse

zeigen jedoch, dass Tumorzellen bei der Metastasierung nicht auf sich allein gestellt sind. Bei jedem der oben beschriebenen Schritte erhalten sie Hilfe durch körpereigene Thrombozyten (9).

## I.2 Thrombozyten

Thrombozyten (Blutplättchen) sind frei im Blut zirkulierende Zellen. Mit einem Durchmesser von ungefähr 3  $\mu\text{m}$  und einer Dicke von ungefähr 1  $\mu\text{m}$  sind sie die kleinsten Hämatozyten des menschlichen Körpers. Sie entstehen durch Abschnürungen von Megakaryozyten, den größten Zellen im Knochenmark. Ihre Konzentration im Blut liegt zwischen 150.000 - 400.000 Zellen/ $\mu\text{l}$ . Bei niedrigeren Werten spricht man von einer Thrombozytopenie und bei höheren von einer Thrombozytose (10,11). Thrombozyten zirkulieren etwa zehn Tage im Blutsystem, bis sie in Milz, Leber oder Lunge abgebaut werden (12). Die Plättchen verfügen über keinen Zellkern und damit über keine genomische DNA. Sie sind dafür mit einem großen Repertoire an messengerRNA (mRNA) und microRNA (miRNA) ausgestattet, deren Funktion noch Gegenstand aktueller Forschung ist (13,14). Neben der gut untersuchten Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase wird ihre Rolle in pathophysiologischen Prozessen immer weiter erforscht. Hierzu zählen Entzündungsreaktionen, die Atherogenese, die antimikrobielle Abwehr sowie die Tumorprogression (15).

### I.2.1 Thrombozytäre Oberflächenproteine

Die thrombozytäre Zellmembran ist mit zahlreichen Rezeptoren ausgestattet, darunter Glykoproteine (GP Ib/IX/V, Toll-like Rezeptoren und Integrine wie  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  (GPIIb/IIIa),  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$ ), G-Protein gekoppelte Rezeptoren (PAR-1 und PAR-4 Thrombin-Rezeptoren, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> ADP-Rezeptoren, TP $\alpha$  und TP $\beta$  TxA<sub>2</sub>-Rezeptoren), Proteine aus der Immunglobulin-Superfamilie (GPVI und Fc $\gamma$ RIIA), C-Typ-Lektin-Rezeptoren (P-Selektin), Tyrosinkinase-Rezeptoren (Thrombopoetin-Rezeptor) und vielen weiteren (CD63, CD36, P-selectin ligand 1 (PSGL-1), TNF receptor type etc.) (10,16).

### I.2.2 Thrombozytäre Granula

Im Zytoplasma der Thrombozyten finden sich, neben Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen und dem Zytoskelett,  $\alpha$ -Granula und  $\delta$ -Granula (elektronendichte Granula). Dies sind Thrombozyten-spezifische Speicher. Die  $\alpha$ -Granula enthalten hämostatisch relevante Proteine wie Plättchenfaktor, Thrombospondin, vWF, PECAM-1, P-Selektin,  $\beta$ -Thromboglobulin, platelet derived growth factor, diverse Gerinnungsfaktoren (FV, FIX, FXIII) und eine Reserve an GPIIb/IIIa. Die  $\delta$ -Granula enthalten Nukleotide (Adenosin Di- und Triphosphat (ADP und ATP)), Serotonin, Histamin, Pyrophosphate und Calcium (10,16). Eine Sonderstellung nehmen die auch als Lysosomen bezeichneten  $\lambda$ -Granula ein, die, gefüllt mit thrombozytären Enzymen, entscheidend zum zellulären Stoffwechsel beitragen (17). Unter Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Ausschüttung der Granula. Dies kann durch ihre Fusion mit dem offenen kanalikulären System der Blutplättchen geschehen oder durch ihre direkte Verschmelzung mit der Zellmembran (15,18,19).

### I.2.3 Platelet-derived Microparticels

Nahezu alle eukaryotischen Zellen können bei hinreichender Stimulation oder im Rahmen der Apoptose Mikropartikel sezernieren (20,21). Es wird angenommen, dass 2/3 der im Blut befindlichen Mikropartikel den Thrombozyten entstammen (22). Diese können zwei Arten dieser Vesikel freisetzen: 1) Exosomen haben einen Durchmesser von 40 nm - 100 nm, werden durch Exozytose sezerniert und sind primär an der Immunantwort beteiligt (23). 2) Die 100 nm - 1 µm großen platelet-derived microparticles (PDMPs) entstehen durch Membranabschnürungen (24). Garcia *et al.* konnten bei Untersuchungen des Proteoms der PDMPs 578 verschiedene Proteine, darunter P-Selektin, GPIIb/IIIa und GPIb $\alpha$ , nachweisen (24,25). Darüber hinaus enthalten PDMPs genetisches Material in Form thrombozytärer mRNA und miRNA.

### I.2.4 Die Hämostase

Thrombozyten sind die Hauptakteure der Hämostase. Dieser komplexe Prozess dient der Blutstillung und damit der Vorbeugung großer Blutverluste nach Gewebsverletzungen. Er umfasst die anfängliche Vasokonstriktion – vermittelt durch freigesetztes Serotonin und Thromboxan (TxA<sub>2</sub>) –, die Adhäsion und Aggregation aktivierter Thrombozyten an der Läsionsstelle und zuletzt die Bildung eines festen Fibrinnetzes. Der hierbei entstehende Thrombus sorgt physiologischerweise für einen sicheren Verschluss der Gefäßläsion (15). Die Fähigkeit der Thrombozyten, an defekten Gefäßwandabschnitten zu adhären und Aggregate zu bilden, wurde bereits im 19. Jahrhundert durch Bizzozero beschrieben (26).

In der Literatur wird die Thrombusbildung häufig in drei Phasen eingeteilt: In der Initiationsphase arretieren erste Thrombozyten an dem freigelegten Subendothelium unter Bildung eines *Monolayers*. Anschließend kommt es zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten durch die lokale Freisetzung diverser Agonisten (Extensionsphase). Während der Stabilisationsphase sorgen Quervernetzungen der Thrombozyten untereinander und die Verdichtung des Gerinnsels für die Bildung eines festen Thrombus (11,16,17).

#### I.2.4.1 Initiationsphase

Aufgrund ihrer Beschaffenheit im Blutstrom finden sich in den wandnahen Bereichen des Gefäßes zwei- bis dreifach höhere Konzentrationen an Blutplättchen als im Zentrum (11). Dieser Umstand gestattet ihnen das Abtasten des Endothels auf Schäden. Beim Vorliegen einer Gefäßläsion werden extrazelluläre Matrix-Komponenten freigelegt. Thrombozyten können direkt oder indirekt über ein Bindeprotein an diese adhären. Zu den relevanten Liganden zählen insbesondere Kollagen, Von-Willebrand-Faktor (vWF), Laminin, Fibronectin und Thrombospondin. Die Beteiligung der verschiedenen Bindeproteine ist abhängig von den herrschenden rheologischen Bedingungen. So erfolgt die Adhäsion bei niedrigen Scherkräften – wie sie in venösen Gefäßen oder großen Arterien vorzufinden sind – über Laminin, Fibronectin oder direkt an Kollagen Typ I und Typ III. In kleineren oder

arteriosklerotisch verschlossenen Gefäßen findet eine vWF-vermittelte Adhäsion statt (17). Dieses in Megakaryozyten, Endothelzellen und auch Thrombozyten produzierte Bindeprotein zeigt eine besonders hohe Affinität gegenüber Kollagen Typ I, III und IV. Frei im Blut flottierend, liegt vWF in einer zusammengefalteten Form vor. Erst durch den Kontakt zu subendothelialen Kollagenfasern in Verbindung mit hohen Scherkräften kommt es zu seiner Konformationsänderung, die die Bindung von Thrombozyten ermöglicht. Diese findet über GPIIb<sub>α</sub>, einem Teil des GPIIb/IX/V-Komplexes, statt (27). Eine intrazelluläre Signalkaskade führt anschließend zur Aktivierung des thrombozytären GPIIb/IIIa-Rezeptors, der durch weitere Bindungen mit dem vWF eine irreversible Adhäsion ermöglicht (10).

#### I.2.4.2 Extension

Die initiale Adhäsion erster Thrombozyten an der Läsionsstelle hat ihre Aktivierung zur Folge. Diese geht mit ihrer Formänderung, der gesteigerten Fähigkeit, Bindungen untereinander auszubauen und ihrer Degranulation mit para- und autokrinen Effekten einher. So wird eine Kaskade angestoßen, die die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Thrombozyten zur Folge hat (17). Hierbei sind insbesondere ADP, Plättchenfaktor, Thromboxan A<sub>2</sub> (10), Matrix-Metalloprotease-2 (MMP-2) (28) sowie Epinephrin und Thrombin (16) relevant.

ADP bindet an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> und löst so zahlreiche Aktivierungsereignisse, wie den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Anstieg, die TxA<sub>2</sub>-Synthese, die zelluläre Formänderung, die Degranulation und die Aktivierung von GPIIb/IIIa aus. Elektronendichte Granula stellen den größten Speicher für ADP dar und somit maßgeblich an der Hämostase beteiligt. Der in der klinischen Praxis häufig verwendete Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel setzt an diesen Rezeptoren an (15,29).

TxA<sub>2</sub> wird in aktivierten Blutplättchen durch die Cyclooxygenase (COX) und die TxA<sub>2</sub>-Synthase gebildet und ist ein potenter Vasokonstriktor und Thrombozyten-Agonist. Seine Wirkung wird über den TxA<sub>2</sub>-Rezeptor vermittelt (30). In übermäßiger Form produziert, ist TxA<sub>2</sub> oft mit der Pathogenese thrombotischer Ereignisse, wie Myokardinfarkten, Lungenembolien und instabiler Angina Pectoris vergesellschaftet (31). Im klinischen Alltag wird Aspirin aufgrund seines hemmenden Effekts auf die COX und damit die TxA<sub>2</sub>-Produktion bei kardiovaskulären Risikopatienten eingesetzt (32).

Der potenteste Plättchen-Agonist ist die Serin-Proteinase Thrombin. Sie wird im Rahmen der humoralen Gerinnungskaskade aus ihrer frei im Plasma zirkulierenden inaktiven Form, dem Prothrombin, gebildet. Dies geschieht primär über den „Prothrombinase“-Komplex, bestehend aus den Gerinnungsfaktoren FVa und FXa. Thrombin sorgt über einen positiven Feedback-Mechanismus für die Steigerung der Gerinnungskaskade, katalysiert die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und wirkt außerdem als hochpotenter Thrombozyten-Aktivator (33). Seine Wirkung an Thrombozyten selbst entfaltet er primär



über Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) (34). Dabei wird dem PAR-1 eine besondere Bedeutung bei der Aktivierung humaner Thrombozyten zugesprochen (15).

Unter der Aktivierung kommt es durch die Depolymerisation der Mikrotubuli bei gleichzeitiger Polymerisation der Aktinfilamente zu einer Formänderung der Thrombozyten mit Ausbildung kleiner Ausläufer, der sogenannten Pseudopodien. Diese ermöglichen eine Verzahnung der Thrombozyten untereinander und somit eine stabile Aggregation (10).

Wie eingangs beschrieben wird im Rahmen der Plättchenaktivierung durch ein *inside-out signaling* die Konformationsänderung von GPIIb/IIIa ausgelöst. Dieses wandelt sich dadurch zu einem hochaffinen Rezeptor für vWF und Fibrinogen und gestattet so die Bildung stabiler Brücken zwischen den Thrombozyten untereinander und zur subendothelialen Matrix an der Läsionsstelle (35). GPIIb/IIIa ist mit 40.000-80.000 Kopien das am häufigsten vertretene Oberflächenprotein auf der thrombozytären Membran. Dadurch ist die Voraussetzung für große Plättchenaggregate gegeben (15,16).

#### I.2.4.3 Stabilisation

In der Stabilisationsphase stehen die Thrombozyten bereits in engem Kontakt zueinander. Die Zell-Zell-Abstände liegen unter 50 nm, sodass die Konzentration parakriner Botenstoffe interzellulär stark ansteigt und der Informationsaustausch uneingeschränkt stattfinden kann (16). Prozesse zur Verdichtung und weiteren Stabilisation des Gerinnsels stehen nun im Vordergrund. Diese werden insbesondere durch die Wirkung von Fibrinogen an GPIIb/IIIa stimuliert. Die Formation eines Fibrinnetzes bildet den letzten Schritt der Hämostase und sorgt für die Entstehung eines stabilen Thrombus. Der Gewebefaktor (TF) wirkt agonistisch auf diesen Vorgang (36). Er wird über Mikropartikel zum Thrombus herangetragen. Diese sind mit dem P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) ausgestattet, der es ihnen ermöglicht, an das thrombozytäre P-Selektin zu binden. *In vivo*-Experimente mit P-Selektin-*knockdown* Mäusen zeigten, dass TF im Thrombus kaum nachgewiesen werden konnte und die Bildung des Fibrinnetzes deutlich eingeschränkt war (37).

P-Selektin (Thrombozyten-Selektin) ist ein Zelladhäsionsmolekül, das vor allem in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten und den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen gebildet und gespeichert wird. Unter ausreichend starker Plättchen-Aktivierung, beispielsweise durch Thrombin, wird es an der Zelloberfläche exponiert und ist dann maßgeblich an der Hämostase beteiligt. Die Wechselwirkung des P-Selektins mit seinem Liganden PSGL-1 ist hierbei am besten erforscht. Es ist insbesondere an der Rekrutierung von Leukozyten und der Bereitstellung von Gewebefaktor beteiligt (38). Thrombozyten können P-Selektin-vermittelt über die Endothelzellschicht rollen und diese auf Defekte abtasten. Der thrombozytäre GPIb/IX/V-Komplex konnte ebenfalls als Gegenrezeptor für P-Selektin identifiziert werden. Er ermöglicht somit auch Bindungen zwischen den Thrombozyten untereinander (39).

### I.2.5 Mechanismen zur Verhinderung ungewollter Plättchenaktivierung

Ungewollte und überschießende Thrombozyten-Reaktionen können fatale Konsequenzen für den Organismus in Form thromboembolischer Ereignisse nach sich ziehen (17). Es existieren negative Feedback-Mechanismen, um diese zu verhindern. Inaktive Thrombozyten produzieren inhibitorisch wirkendes Stickstoffmonoxid (NO), MMP-9 und tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase-4 (TIMP-4) (28,40). Endothelzellen ihrerseits sezernieren ebenfalls NO und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) (41). Darüber hinaus exprimieren sie auf ihrer Membran CD39, eine Ektonuklease aus der Gruppe der ATPasen, die ADP spaltet und auf diese Weise die Plättchenaktivierung hemmt (42).

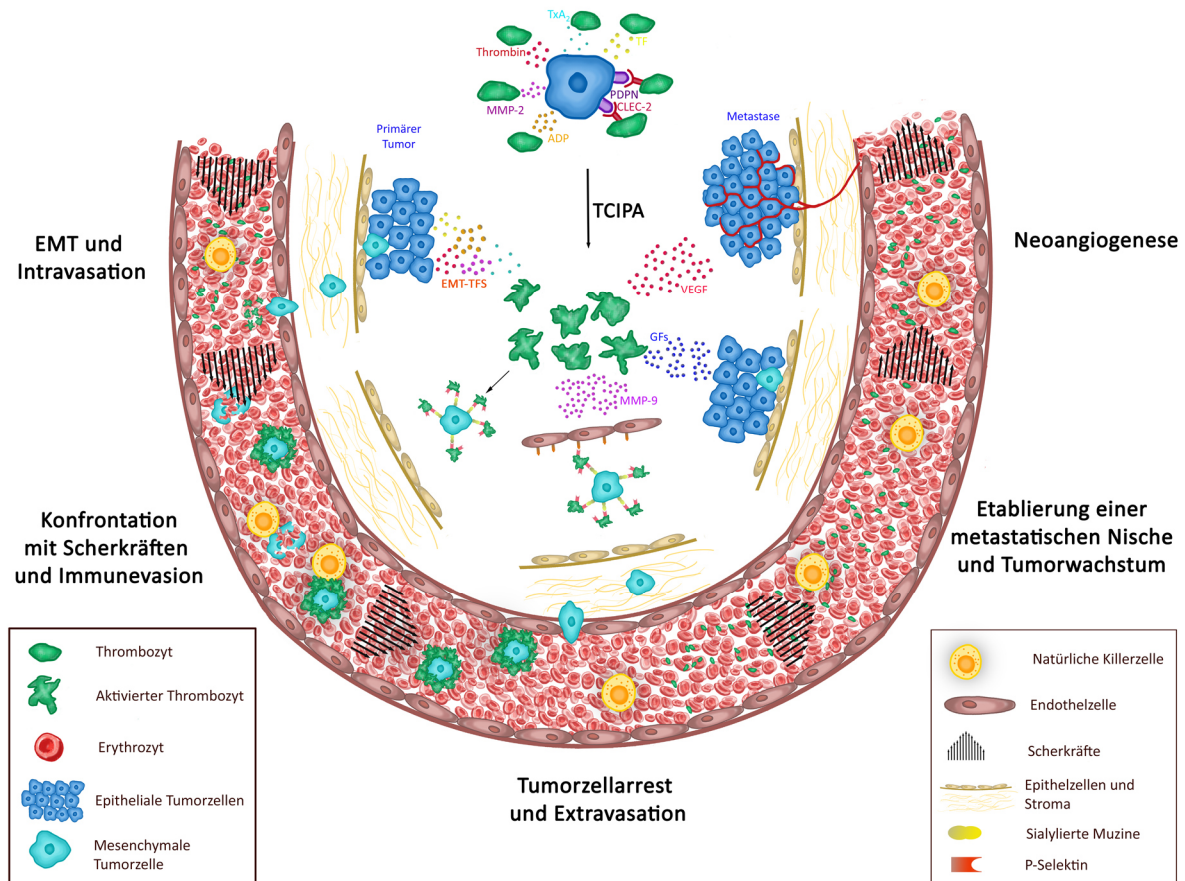
### I.2.6 Abbau der Thrombozyten

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase im menschlichen Körper ist es notwendig, dass apoptotische Zellen abgebaut werden, um so die unkontrollierte Freisetzung von Zellinhalten zu verhindern. Dies geschieht zumeist über die Phagozytose durch Makrophagen. Diese erkennen apoptotische Zellen über die Phospholipid-Verteilung auf ihrer Zellmembran (43). Im Rahmen des programmierten Zelltodes kommt es – vermittelt durch die Aktivierung der Scramblase und Inaktivierung der Flippase – zum Nach-außen-Stülpen (*flip-flop*-Mechanismus) von Phosphatidylserin. Dieses negativ geladene Phospholipid dient als „Friss mich“-Signal. Die T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 4 (TIM4) konnten als Rezeptoren für das Phosphatidylserin seitens der Makrophagen identifiziert werden. Ihre Blockade verhindert die Phagozytose zuverlässig (43). Rand *et al.* belegten die besondere Bedeutung des Phosphatidylserins für den Abbau gealterter Plättchen bereits im Jahr 2004 (44). So zeigen auch humane Thrombozyten ein inhomogenes Verteilungsmuster der Phospholipide auf ihrer Zellmembran. Im nicht aktivierten Zustand sind an der äußeren Schicht neutrale Phospholipide wie Phosphatidylcholin und Sphingomyelin exprimiert. Innen finden sich hingegen negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol. Neben der Induktion apoptotischer Prozesse löst auch die hinreichend starke Aktivierung der Thrombozyten den beschriebenen *flip-flop*-Mechanismus bei ihnen aus. Die nun nach außen gerichteten negativen Phospholipide sind unter anderem an der Aktivierung der Gerinnungsfaktoren X und Prothrombin und damit maßgeblich an der Hämostase beteiligt (45). Sie bilden eine katalytische Oberfläche, auf der Vitamin K-abhängige Gerinnungsfaktoren mit ihren Cofaktoren interagieren können (46).

Der Abbau alter Blutplättchen erfolgt vor allem durch Makrophagen in der Milz. Frische Thrombozyten verhindern ihre vorzeitige Phagozytose durch die Ausbildung des „Friss mich nicht“-Markers CD47, der die Makrophagen-Aktivität über das signal regulatory protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) hemmt (47). Aktivierte Thrombozyten können ebenfalls durch neutrophile Granulozyten phagozytiert werden. Dies geschieht im Rahmen der mit einer Verletzung einhergehenden Entzündungsreaktion. Die Neutrophilen binden an das P-Selektin der Thrombozyten über PSGL-1. Die darauf folgende Internalisierung ist Phosphatidylserin-abhängig (48). Auch Hepatozyten sind in der Lage, Thrombozyten zu internalisieren. Ihre Proliferation wird dabei durch einen horizontalen RNA-Transfer stimuliert (49).

### I.3 Tumorzellen und Thrombozyten, ein Wechselspiel mit verheerenden Folgen

Ein Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und erhöhter Thrombozyten-Aktivität wurde bereits im 19. Jahrhundert durch den französischen Arzt Armand Trousseau festgestellt. Er beobachtete ein erhöhtes Vorkommen thromboembolischer Ereignisse bei Krebspatienten (50). Später konnte im Umkehrschluss durch Kohortenstudien an Patienten, die an einer Venenthrombose oder Lungenembolie litten, eine erhöhte Malignom-Prävalenz nachgewiesen werden (51). 1968 wurde zum ersten Mal ein direkter Zusammenhang zwischen der Metastasierungsrate eines Tumors und der Thrombozytenkonzentration im Blut festgestellt. Gasic *et al.* entdeckten durch Zufall, dass Mäuse mit experimentell induzierter Thrombozytopenie weniger Metastasen ausbildeten als die Kontrollgruppe (52). Seitdem wurde die Rolle der Thrombozyten im Metastasierungsprozess maligner Zellen ausgiebig untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sie bei nahezu allen Schlüsselmomenten unterstützend auf die Tumorzellen wirken. Hierzu zählen die Loslösung aus dem Zellkollektiv, die Intravasation, ihr Überleben im Blutkreislauf und die erneute Extravasation sowie die Etablierung einer metastatischen Nische und zuletzt das Metastasenwachstum (9). Eine Übersicht bietet Abbildung 1.



**Abbildung 1: Darstellung der thrombozytären Beteiligung am metastatischen Geschehen.** Thrombozyten sind auf vielfältige Weise am Prozess der Metastasierung beteiligt. Hierfür werden sie zunächst durch Tumorzellen über die Ausschüttung von Thrombin,  $TxA_2$ , TF, MMP-2 und ADP sowie die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mittels PDNP und CLEC-2 aktiviert (TCIPA). Sie können daraufhin durch die Freisetzung von EMT-TFs (insbesondere  $TGF-\beta$ ) den Übergang epithelialer Tumorzellen in ihre mesenchymale Form induzieren (EMT) und dadurch ihr invasives Potential erhöhen. Im Blutkreislauf wirken die Thrombozyten durch die P-Selektin vermittelte äußere Anheftung protektiv für die zirkulierenden Tumorzellen und schützen sie so vor Scherkräften und natürlichen Killerzellen. Um das Blutgefäß wieder verlassen zu können, rollen die Thrombozyten-besetzten Tumorzellen am Endothel entlang bis sie eine feste Bindung (Tumorzellarrest) aufgebaut haben. Neben P-Selektin sind an diesem Schritt vWF und GPIIb/IIIa (hier nicht dargestellt) beteiligt. Durch die Ausschüttung von ATP, Histamin, Serotonin und  $TxA_2$  (hier nicht dargestellt) sowie MMP-9 durch die aktivierten Thrombozyten wird die Gefäßpermeabilität erhöht und die Extravasation erleichtert. Am Bestimmungsort angekommen ist für das erfolgreiche Metastasenwachstum eine vorteilhafte Mikroumgebung unabdingbar. Thrombozyten sezernieren unter anderem verschiedene Wachstumsfaktoren (GF), die das Tumorwachstum und damit die Entstehung einer metastatischen Nische unterstützen. Dabei spielt die Nährstoffversorgung des Sekundärtumors eine entscheidende Rolle. Sie wird durch die Neovaskulogenese, induziert durch thrombozytäre VEGF-Freisetzung, sichergestellt. **Abkürzungen:**  $TxA_2$ : Thromboxan  $A_2$ ; TF: Gewebefaktor; MMP: Matrix-Metallo-Protease; ADP: Adenosindiphosphat; PDNP: Podoplanin; CLEC-2: C-type lectin-like receptor 2; TCIPA: Tumorinduzierte Plättchenaggregation; EMT: Epithelial-mesenchymale Transition; EMT-TFs: EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren;  $TGF-\beta$ : Transforming growth factor beta; vWF: Von-Willebrand-Faktor; ATP: Adenosintriphosphat; VEGF: vascular endothelial growth factor. (Zeichnung von Jana Katharina Schmitz und Dominik Berger)

### I.3.1 Die Epithelial-mesenchymale Transition und ihre Bedeutung für die Tumorprogression

Malignome epithelialen Ursprungs bezeichnet man als Karzinome. Sie bilden einen Großteil der klinisch relevanten Tumorarten (6). Epithelzellen liegen in polarisierter Form mit apikalem und basolateralem Anteil vor und sind über zahlreiche Bindeproteine mit den umgebenden Zellen und der Basalmembran verbunden. Das Loslösen einzelner Tumorzellen aus dem Zellverbund ist ein entscheidender Schritt zu Beginn des Metastasierungsprozesses. Es konnte gezeigt werden, dass die Tumorzellen dazu von ihrem

epithelialen in einen mesenchymalen Phänotyp übergehen. Hierdurch wird ihre Polarisation aufgehoben, ihre Beweglichkeit und die Resistenz gegenüber Apoptose und damit ihre Invasivität erhöht sowie ihre Bildung von Matrixkomponenten gesteigert. Diesen Prozess bezeichnet man als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (53). Physiologisch findet er vor allem im Rahmen der Embryonalentwicklung statt (54). Die Literatur spricht in diesem Zusammenhang von der EMT Typ I. Die EMT Typ II ist bei der Wundheilung und bei entzündlichen Geschehen zu beobachten. Die EMT Typ III beschreibt dieses Phänomen bei neoplastischen Zellen und wird allgemein mit ihrer Dedifferenzierung in Verbindung gebracht (53,55). Nach den zahlreichen in der Literatur beschriebenen *in vitro*-Nachweisen bei Krebszellen konnten Trimboli *et al.* die EMT zum ersten Mal bei Brustkrebs *in vivo* beobachten (56).

Zahlreiche Faktoren können über verschiedene Signalwege die EMT auslösen. Man bezeichnet sie als EMT-induzierende Transkriptionsfaktoren (EMT-TFs). Neben vielen weiteren wurde der Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) als entscheidender Auslöser der EMT identifiziert. Durch seine gezielte Inhibition konnten die Invasivität und das metastatische Potential von Tumorzellen deutlich reduziert werden (57). TGF- $\beta$  entfaltet seine Wirkung an Tumorzellen über den Smad-NF- $\kappa$ B-Signalweg. Hauptspeicherort im menschlichen Körper sind die Thrombozyten, was ihre Rolle in der EMT vermuten lässt. Labelle *et al.* konnten nicht nur eine gesteigerte Invasivität bei mit Thrombozyten vorbehandelten Tumorzellen *in vivo*, sondern auch EMT-typische Veränderungen nachweisen. So war E-Cadherin, ein Zell-Zell-Kontakt vermittelndes Adhäsionsprotein, in diesen Tumorzellen reduziert (58). Der Verlust von E-Cadherin ist ein entscheidender Schritt im Akquirieren mesenchymaler Eigenschaften und damit der EMT. Transkriptionsfaktoren aus der SNAIL-Familie, wie Snail und Slug, können die Bildung von E-Cadherin unterdrücken und sind somit eng mit der EMT vergesellschaftet. Darüber hinaus können Snail und Slug die EMT über die Steigerung der TGF- $\beta$ -Synthese unterstützen (59,60). Im Mausmodell hatte die ektopische Expression vom Transkriptionsfaktor Twist ebenfalls den Verlust E-Cadherin-vermittelter Zell-Zell-Kontakte und die erhöhte Bildung mesenchymaler Marker, wie Fibronectin und Vimentin, zur Folge. So konnte der EMT-induzierende Einfluss von Twist nachgewiesen werden (61). Zhang *et al.* entdeckten darüber hinaus eine Vergesellschaftung zwischen SOX-4 und TGF- $\beta$ , wobei Brustkrebszellen durch die SOX-4-induzierte EMT eine erhöhte Mobilität und Invasivität aufwiesen (62).

Diese Schritte finden bereits am Primärtumor außerhalb des Gefäßsystems statt. So können extravaskuläre Thrombozyten-Agglomerate die EMT von Tumorzellen induzieren (63). Aber auch bei CTCs können noch epitheliale Marker nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass Tumorzellen mit epitheliale Charakter ins Gefäß eindringen und erst dort eine EMT durchlaufen können (64). Das Überleben epithelialer CTCs im Blutkreislauf ist jedoch stark eingeschränkt. Man geht davon aus, dass 85% der Zellen innerhalb der ersten fünf Minuten zugrunde gehen (65). Neben den im folgenden Kapitel besprochenen Bedrohungen durch Scherkräfte und immunologische Abwehrmechanismen spielt sich

hier ein Prozess ab, der in der Literatur als *Anoikis* bezeichnet wird. Es handelt sich dabei um einen durch die Loslösung von Zellen aus ihrem Zellverbund und den Zell-Matrix-Kontakten verursachten, Apoptose-ähnlichen Prozess (65). Der Begriff *Anoikis* entstammt dem griechischen Wort *Anoikos* („ohne Haus“). Zellen, die sich aus ihrem Zellverbund lösen, verlassen metaphorisch gesehen ihr Heim. Es ist somit nicht verwunderlich, dass das in diesem Kapitel besprochene Phänomen der EMT durch die Vermittlung migratorischer Fähigkeiten eine natürliche Resistenz gegen die Apoptose der *heimatlosen* Zellen bewirkt (66). Haemmerle *et al.* konnten nachweisen, dass Thrombozyten ein YAP-1-abhängiges Transkriptionsprogramm in frei flottierenden epithelialen Tumorzellen auslösen und sie dadurch resistent gegen die *Anoikis* machen konnten. YAP-1 ist ein Transkriptionsregulator-Protein, das an der Unterdrückung apoptotischer Prozesse beteiligt ist (67).

Das Konzept der EMT als Voraussetzung für die Metastasierung wurde kontrovers diskutiert (53). Metastasen epithelialer Tumoren zeigen ihrerseits ebenfalls einen epithelialen und nicht mesenchymalen Aufbau. Diesen Umstand konnten Tsai *et al.* durch den Nachweis der Reversibilität der EMT erklären. Twist-1 gilt als potenter Promotor der EMT (s. oben). Seine Stimulation im Mausmodell führte zur Reduktion epithelialer Marker, wie E-Cadherin und Cateninen, und zur vermehrten Ausbildung mesenchymaler Marker wie Vimentin und Fibronectin. Die in der Folge entstandenen Metastasen zeigten allerdings hohe E-Cadherin-Werte und ein reduziertes Twist-1. Diese Beobachtungen wurden als Beweis für die Reversibilität der EMT interpretiert (68). Die Umkehrung der EMT wird als Mesenchymal-epitheliale Transition (MET) bezeichnet und wurde bereits vor Tsai und Kollegen modellhaft untersucht (69).

### I.3.2 Thrombozyten schützen Tumorzellen im Blutkreislauf

#### I.3.2.1 Der *protektive Mantel*

Die Blutpassage der CTCs ist mit zahlreichen Herausforderungen an ihr Überleben verbunden. Dabei wurden die Einflüsse der körpereigenen zellvermittelten Immunabwehr sowie der durch Turbulenzen entstehenden Scherkräfte besonders gut untersucht. Allgemein geht man davon aus, dass ein Großteil der Tumorzellen im Blutkreislauf aufgrund dieser Einflüsse zugrunde geht (8, 65,70,71).

Der entscheidende Einfluss von Thrombozyten auf diese Phase der Metastasierung konnte schon vielfach nachgewiesen werden. Es besteht ein allgemeiner Konsens darüber, dass Blutplättchen um die CTCs herum aggregieren und dadurch eine schützende Barriere gegen schädliche Umwelteinflüsse bilden. Dieses Konstrukt wird als *protektiver Mantel* bezeichnet. Auch wenn mikroskopische Aufnahmen in der Literatur dieses Phänomen bisher nur andeuten konnten, wurden die zugrunde liegenden Mechanismen bereits ausgiebig untersucht (9).

Der für die Ausbildung einer festen Bindung und damit eines *protektiven Mantels* notwendige Erstkontakt wird über das C-Typ Lektin, P-Selektin, vermittelt (72–75). Thrombozyten speichern P-Selektin in ihren Alpha-Granula und geben es bei Aktivierung frei (76). Tumorzellen bilden ihrerseits

sialylierte und fucosylierte Muzine, an die P-Selektin binden kann. Allgemein sind Tumorentitäten, die solche Muzine bilden, mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet (77). Borsig *et al.* konnten sowohl durch die Depletion von P-Selektin als auch durch die Entfernung sialylierter Muzine die Adhäsion von Thrombozyten an Tumorzellen deutlich reduzieren (78). Darüber hinaus bilden zahlreiche Tumorentitäten, wie beispielsweise Bronchialkarzinomzellen der Reihe A549, PSGL-1 aus, über das ihnen die Bindung an P-Selektin möglich wird (79).

### I.3.2.2 Natürliche Killerzellen im Kampf gegen CTCs

Das menschliche Immunsystem ist in der Lage, im Blut zirkulierende Tumorzellen zu eliminieren. NKs konnten als entscheidende Akteure in dieser zellulären Krebsabwehr identifiziert werden (80). Sie können ihre *Opfer* auf verschiedene Arten erkennen. So exprimieren körpereigene Zellen spezifische Oberflächenmarker, darunter insbesondere den Major Histocompatibility Complex class I (MHC-I). Bildet eine Zielzelle diesen nicht oder in körperfremder Konfiguration aus, wird sie von den NKs angegriffen und beseitigt (81).

Untersuchungen von Nieswandt und Kollegen zeigten, dass unter *in vivo*-Depletion natürlicher Killerzellen die Metastasierungsrate verschiedener Tumorentitäten stark ansteigt. In NK-positiven Mäusen hatte darüber hinaus eine Thrombozyten-Depletion die Reduktion der Metastasierungsrate der untersuchten Fibrosarkomzellen von 5,5% auf 0,2% zur Folge. Interessanterweise hatte bei Abwesenheit von NKs die Induktion einer Thrombozytopenie keinen Einfluss auf die Metastasierungsrate. Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse vermuteten die Autoren, dass Thrombozyten durch ihre protektive Ummantelung Tumorzellen vor der zytolytischen Aktivität der NKs schützten (7). Placke und Kollegen konnten einen Austausch von körpereigenen MHC-I-Komplexen von den adhäsiven Thrombozyten auf die Tumorzellen beobachten. Diese vollführten auf diese Art eine zelluläre Mimikry und konnten von den NKs nicht mehr als fremd erkannt werden (82).

### I.3.2.3 Scherkräfte schaden CTCs

Neben der Immunabwehr stellen die im Gefäßsystem herrschenden Scherkräfte eine Herausforderung für das Überleben von CTCs dar. Scherkräfte sind durch den Blutstrom generierte biomechanische Kräfte (83). Egan *et al.* etablierten ein Modell, in dem sie Tumorzellen Scherstress verschiedener Intensität aussetzten. Erlittene Membranschäden konnten sie über freigesetzte Laktat-Dehydrogenase (LDH) messen. Unter der Zugabe von Thrombozyten wurde deutlich weniger LDH gemessen. Darüber hinaus war dieser Effekt bei Tumorzell-/Thrombozyten-Verhältnissen von 1:200 stärker ausgeprägt als bei einem von 1:50. Mittels Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop konnte dabei die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an den Tumorzellen als der entscheidende Schutzmechanismus identifiziert werden (83).

### I.3.3 Tumorzellarrest und Extravasation

Nach der Verschleppung der CTCs in eine andere Körperregion müssen sie zur Ausbildung einer Metastase das Blutgefäß wieder verlassen. Diesen Prozess bezeichnet man als Extravasation. Sie beginnt mit der Arretierung der CTCs an der Gefäßwand. Dardik *et al.* konnten zeigen, dass verschiedene Tumorzellreihen unter statischen Bedingungen direkt an die subendotheliale extrazelluläre Matrix (ECM) binden können. Unter arteriellen Fließbedingungen war dies nur mit der Hilfe von Thrombozyten möglich. Die Autoren konnten nachweisen, dass das Oberflächenprotein GPIIb/IIIa hierfür entscheidend war (84). Dies passt zu den Beobachtungen von MacCarty und Kollegen, die die Adhäsion von zirkulierenden Tumorzellen an immobilisierten Thrombozyten unter Fließbedingungen *in vitro* untersucht haben. Es zeigte sich ein Adhäsionsverhalten, das sehr an jenes von neutrophilen Granulozyten erinnert. So konnten Tumorzellen, P-Selektin vermittelt, durch einen Thrombozyten-Monolayer eingefangen werden. Sie rollten daraufhin, bewegt durch die Strömung, an diesem entlang. Die endgültige Arretierung fand anschließend über eine feste, GPIIb/IIIa-vermittelte Bindung statt. Auch der vWF ist an der Ausbildung fester Bindungen beteiligt. Seine Inhibition konnte den Anteil arretierter Tumorzellen deutlich reduzieren, wobei die Inhibition von GPIIb/IIIa die Arretierung nahezu unterbinden konnte (85). Mojiri *et al.* zeigten, dass einige Glio- und Osteosarkomzellreihen zur *de novo*-Synthese von vWF fähig waren. In diversen Versuchsmodellen wiesen vWF-bildende Tumorzellen sowohl statisch als auch im Fluss eine gesteigerte Adhäsionsfähigkeit an Endothelzellen, eine erhöhte Transmigrationsfähigkeit und eine allgemein stärker ausgeprägte Fähigkeit zur Extravasation auf (86).

Im Zusammenhang mit metastasierenden Tumorzellen ist oft vom *invasiven Potential* die Rede. Diesem kommt insbesondere im Rahmen der Intra- und Extravasation eine besondere Bedeutung zu, da hier die Gefäßwand durchbrochen werden muss. Es wurde bereits erwähnt, dass Thrombozyten die Invasivität von Tumorzellen durch die Induktion der EMT steigern können. Es sind weitere Mechanismen bekannt, von denen im Folgenden nur einige beispielhaft genannt werden sollen.

CTC-adhärenente Thrombozyten sezernieren zahlreiche Mediatoren, die die Gefäßwandpermeabilität erhöhen und damit die Transmigration für Tumorzellen erleichtern. Dazu zählen insbesondere TxA<sub>2</sub>, ATP, Histamin und Serotonin (9). ATP wirkt dabei über den P2Y<sub>2</sub>-Rezeptor, um die transendotheliale Migration von Tumorzellen zu unterstützen (87). Alonso-Escolano *et al.* konnten ein durch die Inkubation mit Thrombozyten gesteigertes invasives Potential bei Brustkrebszellen *in vitro* beobachten. Dieser Effekt korrelierte eng mit der Bildung von MMP-9 – sowohl durch die Blutplättchen als auch durch die Tumorzellen selbst. MMPs sind neben der Degradation von ECM an vielen Prozessen beteiligt, die die Migration und Invasion von Tumorzellen unterstützen (88).



### I.3.4 Etablierung einer *metastatischen Nische*

Paget postulierte mit seiner *Seed and Soil*-Theorie bereits 1889 die Notwendigkeit eines geeigneten *Bodens* für metastasierende Tumorzellen, um wachsen und einen Sekundärtumor ausbilden zu können (89). Die Literatur spricht in diesem Zusammenhang von der *metastatischen Nische*, einem *Mikroumfeld*, das durch sein Wechselspiel verschiedener Einflüsse das Tumorwachstum begünstigt. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass Thrombozyten maßgeblich an der Etablierung dieser *metastatischen Nische* beteiligt sind.

Thrombozyten können mittels der Chemokine CXCL-5 und -7 Granulozyten an den Ort der Metastase rekrutieren. Diese wiederum unterstützen die Metastasenbildung insbesondere über den Tumorzellarrest und die Extravasation. Sowohl die Hemmung des CXCL-5/7-Rezeptor CXCR-2 als auch die Depletion von Thrombozyten oder Granulozyten konnten die Metastasenbildung signifikant reduzieren (90).

Peripheres Tumorwachstum im Mausmodell von ossär metastasierenden Tumorentitäten zeigte bereits vor dem Auftreten von Knochenmetastasen osteoblastische Veränderungen im Knochengewebe. Nach Plättchendepletion blieben diese prämetastatischen Alterationen aus. Von den Tumorzellen produzierte Proteine, wie in diesem Falle TGF- $\beta$ 1 und MMP-1, können von den Thrombozyten aufgenommen, in den  $\alpha$ -Granula gespeichert und am Bestimmungsort sezerniert werden (91).

Maligne Tumoren sind aufgrund ihrer hohen Proliferationsrate auf eine gute Nährstoffversorgung angewiesen. Das Ausbilden neuer Blutgefäße durch die sogenannte Angiogenese ist für sie überlebenswichtig. Thrombozyten enthalten die unter den Blutzellen größte Menge an Angiogenese regulierenden Faktoren, darunter den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und den basic Fibroblast like Growth Factor (bFGF). Sie sind somit maßgeblich an der Energiebereitstellung der Metastase beteiligt (92). Darüber hinaus sind adhärente Thrombozyten von entscheidender Bedeutung hinsichtlich der Gefäßstabilität (93). Ist diese nicht gegeben, kommt es zu Hämorrhagien, das heißt Einblutungen in die Tumormasse. Ein Tumorwachstum ist so nicht möglich. Battinelli und Kollegen konnten nachweisen, dass der antimetastatische Effekt antithrombotischer Medikamente unter anderem auf die Reduktion der Thrombozyten-induzierten Angiogenese zurückzuführen ist (94). Neben der Bereitstellung von Nährstoffen durch die Bildung neuer Blutgefäße setzen Blutplättchen Wachstumsfaktoren frei, die die Proliferation von Tumorzellen stimulieren. Hierzu zählen PDGF, bFGF, EGF, HGF, IGF1, TGF $\beta$ , VEGF-A und VEGF-C (95).

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse schlugen Yan und Jurasz in ihrem Review eine Umformulierung von Pagets *Seed and Soil*- zur *Seed, Soil and Fertilizer*-Hypothese vor. Diese Ergänzung soll die tragende Rolle der Thrombozyten bei der Etablierung der *metastatischen Nische* als Voraussetzung für die Nidation zirkulierender Tumorzellen hervorheben (96).

### I.3.5 Die Wirkung von Tumorzellen auf Thrombozyten

Basierend auf diesen Erkenntnissen wird offenbar, dass metastasierende Tumorzellen von einer gesteigerten Anzahl und Aktivierung der Thrombozyten profitieren. Sie sind in der Lage, Thrombozyten auf vielfältige Art zu manipulieren. Um ihr eigenes Überleben zu sichern, nehmen sie Einfluss auf die Plättchenzahl, deren Physiologie, Aktivierungsgrad und RNA-Profil (97). Eine Thrombozytose geht mit der erhöhten Mortalität bei Krebspatienten einher (98). Tumorzellen können über verschiedene Wege die Thrombopoese stimulieren und damit die Thrombozytenzahl steigern (99). Zudem sind bei Krebspatienten erhöhte Spiegel an  $\beta$ -Thromboglobulin und Plättchenfaktor IV nachweisbar. Die sonst in den Granula der Thrombozyten befindlichen Proteine belegen den erhöhten Aktivierungszustand der Blutplättchen und liefern prognostische Hinweise auf den Verlauf der Erkrankung. Bei Patienten in Remission sind diese Veränderungen jedoch nicht mehr zu beobachten (100,101).

#### I.3.5.1 Tumorzell-induzierte Thrombozytose

Das Vorliegen einer Thrombozytose erwies sich in vielen Zusammenhängen als negativer prognostischer Marker bei Krebspatienten. So geht sie beispielsweise mit einer gesteigerten Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten einher (102). Eine erhöhte Plättchenzahl ist im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen ein häufig zu beobachtendes Phänomen (98). Dies lässt sich durch den Umstand erklären, dass zahlreiche Tumorentitäten in der Lage sind, die Thrombopoese direkt oder indirekt zu stimulieren. Suzuki *et al.* konnten beispielsweise die Thrombozytose bei Krebspatienten auf die Produktion koloniestimulierender Faktoren (CSF) und IL-6 durch die Tumorzellen zurückführen. Die daraus resultierende gesteigerte Megakaryopoese hatte eine vermehrte Thrombopoese zur Folge (103). Für das von vielen Tumorzellen produzierte IL-6 konnte darüber hinaus eine direkte Wirkung auf die Synthese von Thrombopoietin (TPO) in Hepatozyten *in vivo* nachgewiesen werden. Die Hemmung von TPO und/oder IL-6 im Mausmodell war ausreichend, um die vorliegende Thrombozytose aufzuheben (104). Sasaki *et al.* untersuchten 27 verschiedene Tumorentitäten, von denen fast alle über die nötige mRNA zur TPO-Synthese ausgestattet waren (105).

#### I.3.5.2 Tumorzellen aktivieren Thrombozyten

Thromboembolische Ereignisse sind ein gefürchteter Nebenbefund bei Tumorleiden. Die Fähigkeit von Tumorzellen, Thrombozyten zu aktivieren, wird in der Literatur als Tumorinduzierte-Plättchenaggregation (TCIPA) beschrieben. Die zugrundeliegenden Prozesse sind vielseitig und umfassen den Einsatz von löslichen Faktoren, Mikrovesikeln und adhäsiven Proteinen (97). Hara *et al.* konnten als eine der ersten die TCIPA bei Adenokarzinom- und Neuroblastomzellen nachweisen (106). Eine Studie zur Untersuchung verschiedener Lungenkrebs-Zellreihen zeigte, dass nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzellen der Reihe A549 Thrombin und dass kleinzellige Bronchialkarzinomzellen Thrombin und ADP sezernierten. Beide sind potente Thrombozyten-Agonisten (107). Viele Tumorarten produzieren darüber hinaus TF, der ebenfalls eine TCIPA induziert (108). Die Produktion von  $\text{TxA}_2$  wurde bei Osteosarkomzellen nachgewiesen.

Außerdem konnte durch die pharmakologische Hemmung von  $\text{TXA}_2$  und seinem Rezeptor die TCIPA und damit die weitere  $\text{TxA}_2$ -Freisetzung durch die aktivierten Thrombozyten nahezu vollständig unterbunden werden (109). Die Hemmung der  $\text{TxA}_2$ -Synthese bei Lungenkarzinom-Patienten ging mit einer reduzierten Bildung von Metastasen insgesamt einher (110). Für Lungen-, Brust- und Bindegewebskarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass diese über die Freisetzung von MMP-2 Thrombozyten aktivieren können (28). Bastida *et al.* wiesen darüber hinaus bei *in vitro*-Versuchen die Notwendigkeit von sowohl GPIb als auch GPIIb/IIIa für die TCIPA nach (111).

Podoplanin (*Aggrus*) ist aus verschiedenen Kontexten und Prozessen im menschlichen Körper bekannt. Seinen Namen erhielt es durch sein Vorkommen in renalen Podozyten und seiner Beteiligung an deren Ausbildung fußförmiger Fortsätze. Seine Wirkung entfaltet es über den C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2), der insbesondere auf der Oberfläche von Thrombozyten ausgebildet wird und der zu deren Aktivierung und Aggregation führt (112). Physiologischerweise spielt diese Wechselwirkung eine Rolle bei der embryonalen Entwicklung lymphatischer Gefäße (113). Interessanterweise wird Podoplanin von Endothelzellen des Lymphsystems, nicht aber des Blutgefäßsystems, ausgebildet und ist somit an der Hämostase nicht beteiligt. Das Hauptaugenmerk der Forschung lag bisher auf der Bedeutung dieses Oberflächenproteins für die Tumorprogression. So konnte seine Bildung bei zahlreichen Tumorentitäten nachgewiesen werden. Es ist maßgeblich an der TCIPA beteiligt (114,115).

In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass nicht alle Tumorzellen im gleichen Maße zur TCIPA fähig sind. Jedem Tumor wohnt eine Subpopulation inne, die durch ihre gesteigerte Bereitschaft zur TCIPA ein erhöhtes metastatisches Potential besitzt (116).

#### I.4 Die Heterogenität der Tumorzellen

Tumoren gleicher Entität weisen genetische Unterschiede auf, die einen Einfluss auf ihr Wachstum und ihr Therapieansprechen haben (117). Man spricht von intertumoraler Heterogenität. Endesfelder *et al.* untersuchten zahlreiche Proben aus verschiedenen Regionen desselben soliden Tumors mittels Exom-Sequenzierung sowie Chromosomenaberrations- und Ploidie-Analyse. Ihre Ergebnisse zeigten, dass über 60% der somatischen Mutationen nicht in jeder Probe nachweisbar waren. Daraus geht hervor, dass Tumoren auch über eine intratumorale Heterogenität verfügen (118).

Die Entstehung dieser intratumoralen Heterogenität und die Bildung von Tumoren als solche waren im vergangenen Jahrhundert Gegenstand intensiver Forschung und Diskussion. Furth löste durch seine Entdeckungen 1937 ein Umdenken aus. Zu dieser Zeit ging man davon aus, dass mehrere Hunderttausend Leukämiezellen notwendig seien, um die maligne Erkrankung von einer Maus auf die nächste zu übertragen. Furth *et al.* gelang dies mit nur 100 Zellen. Darüber hinaus deuteten ihre Daten darauf hin, dass nur ein kleiner Teil der Tumorzellen überhaupt zur Tumorgenese in der Lage sei (119). Aus diesen Beobachtungen entwickelten sich die beiden heute vorherrschenden Theorien, die die Tumorentstehung aus einer einzigen Ursprungszelle postulieren. Das von Nowell im Jahre 1976

etablierte Modell der *Klonalen Evolution* besagt, dass alle Tumoren aus einer einzigen Zelle entstehen und dass die Erhaltung und das Fortschreiten des Tumors aus der erworbenen genetischen Variabilität innerhalb des ursprünglichen Klons resultiert, was eine progressive Auswahl aggressiverer Zelllinien ermöglicht (120). Die früher von Knudson aufgestellte und immer noch an Universitäten gelehrt *Two-Hit*-Hypothese, die die Mutation eines Tumorsuppressorgens oder Protoonkogens auf beiden Chromosomen und den damit einhergehenden „Verlust der Heterozygotie“ in einer Zelle als initialen Schritt in der Tumorgenese definiert, ist diesem Modell zuzuordnen (121). Es ist angelehnt an die Darwinische Vorstellung von dem Überleben des Stärkeren, demzufolge Mutationen mit einer besseren Anpassung an die Umwelt und damit einem Selektionsvorteil einhergehen (122).

Im Jahr 1963 konnten Bruce und van der Gaag beobachten, dass nur 1 - 4% der in Mäuse injizierten Lymphomzellen die Ausbildung einer Tumorkolonie in der Milz initiieren konnten (123). Es blieben zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1) Alle transferierten Zellen hatten grundsätzlich das Potential, eine Kolonie zu bilden, der Großteil wurde jedoch durch die nachteiligen Umstände daran gehindert. 2) Nur eine kleine Untergruppe der Zellen verfügte über das koloniebildende Potential (124). Die Antwort auf diesen Sachverhalt lieferten John Dick und Kollegen 30 Jahre später. Sie selektierten Leukämiezellen anhand ihrer Oberflächenmarker und konnten nachweisen, dass ausschließlich der Transfer von CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Zellen eine Erkrankung beim Rezipienten hervorrief (125). Aus diesen Erkenntnissen entwickelte sich das Tumorstammzell-Modell, das auch als hierarchisches Modell bezeichnet wird. Hiernach weisen Tumorstammzellen (CSCs) eine einzigartige Fähigkeit zur Selbsterneuerung auf und sind an der Tumorinitiierung, -erhaltung und -metastasierung sowie der Rezidiv-Bildung maßgeblich beteiligt (126).

Das Konzept von Stammzellen findet klinisch insbesondere in der Hämatologie Anwendung. Die zahlreichen Parallelen zwischen hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) im Knochenmark und tumorinduzierenden Zellen führten dazu, dass man sich bei der Definition des Tumorstammzellbegriffs sehr an den HSCs orientierte. Heutzutage bilden die folgenden Prämissen die Grundlage des CSC-Modells: Tumoren verfügen über eine hierarchische Struktur, die über das Vorhandensein seltener, sich selbst erneuernder CSCs aufrechterhalten wird. Diese befinden sich häufig in einem ruhenden Zustand und sind dadurch eher am langfristigen Wachstum des Tumors beteiligt, wohingegen die Masse an nicht-CSCs lediglich zur vorübergehenden und oft überschießenden Proliferation in der Lage ist. Somit sind CSCs oft resistent gegen herkömmliche, an sich schnell teilende Zellgruppen adressierte Chemo- und Strahlentherapieverfahren und damit maßgeblich an der Bildung von Rezidiven beteiligt (127).

Koren und Fuchs vermuteten, dass eine Kombination beider Modelle die Wirklichkeit am besten widerspiegeln (128). Und tatsächlich sind Mutationen für die Tumorinitiierung und die Tumorprogression entscheidend. In differenzierten Tochterzellen wäre jedoch jeder erworbene Vorteil

nur vorübergehend und nach wenigen Zellteilungen verschwunden. Ausschließlich jene Mutationen in Zellen mit der Fähigkeit zur Langzeit-Selbsterneuerung haben Bestand (129).

#### I.4.1 Tumorstammzellen und ihre Eigenschaften

Ein Expertenkollektiv einigte sich im Jahre 2006 auf eine Definition von Tumorstammzellen, die deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Tumorigenese voraussetzte (130). Von Selbsterneuerung ist die Rede, wenn eine (asymmetrische Teilung) oder beide (symmetrische Teilung) der aus der Zellteilung hervorgehenden Tochterzellen über die gleichen proliferativen Fähigkeiten verfügen wie die Ausgangszelle (130,131). Sie ist entscheidend für den Fortbestand der Stammzellen und damit für das langfristige Wachstum des Tumors (124). Neue Erkenntnisse zeigen, dass Tumorstammzellen – abhängig von ihrer Umgebungssituation – zu beiden Formen der Zellteilung (symmetrisch und asymmetrisch) fähig sind (127).

Die Entstehung von Tumorstammzellen als initiales Ereignis für die Tumorigenese ist noch nicht abschließend geklärt. Beobachtungen von Bonnet und Dick, dass alle AML-induzierenden Zellen ebenfalls den für reguläre hämatologische Stammzellen typischen CD34<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup>-Phänotyp aufweisen, lässt vermuten, dass HSCs auch Ziel erster onkogener Mutationen sind (132). Im Einklang mit den zahlreichen Forschungsergebnissen, die die tumorinduzierende Rolle von Tumorstammzellen belegen konnten, werden CSCs für die Metastasenbildung verantwortlich gemacht. Dazu passen die Beobachtungen die enge Verknüpfung zwischen dem bereits angesprochenen Prozess der EMT und dem Vorliegen stammzellähnlicher Eigenschaften betreffend (122).

##### I.4.1.1 Plastizität der Tumorstammzellen

Die Angaben über den Anteil von CSCs an einem malignen Zellkollektiv variieren zwischen 0,04% (Pankreas-, Lungen- und Kopf-Halskarzinomen) (133) und 25% (Melanome) (134). Auf Grundlage neuester Erkenntnisse wurde Abstand genommen von der Vorstellung einer fest etablierten Tumorstammzellpopulation, die, klar getrennt von der restlichen Tumormasse, die Tumorprogression und Metastasenbildung steuert. Die Umgebungsbedingungen der Tumorzellen haben großen Einfluss auf den Erwerb und Erhalt ihrer Stammzelleigenschaften. Tumorzellen sind plastisch, können also zwischen einem Stammzell- und einem Nicht-Stammzellstatus hin und her wechseln (127). Dieses Phänomen wurde ausführlich an nicht-neoplastisch veränderten intestinalen Stammzellen erforscht. Sie sind der Ausgangspunkt für die intestinale Kryptenbildung und lassen sich über den Oberflächenmarker Lgr5 sicher identifizieren (135). Sato *et al.* konnten beobachten, dass diese Lgr5-positiven Zellen nur in Anwesenheit von Paneth-Zellen suffizient proliferativ aktiv waren. Dieser Umstand wurde auf die Produktion von Wnt3, NOTCH, TGF- $\alpha$  und EGF seitens der Paneth-Zellen zurückgeführt. Unter dem Einfluss dieser Faktoren konnte sogar eine Umwandlung differenzierter Tochterzellen in Lgr5-positive Stammzellen beobachtet werden. Das Entfernen der Paneth-Zellen führte wiederum zum Rückgang der Stammzellpopulation (136). Tumorigenese Zellen kolorektaler Karzinome lassen sich ebenfalls über

Lgr5 identifizieren und verfügen über Stammzell-ähnliche Eigenschaften. Sie allein sind zur Ausbildung von Metastasen fähig. Interessanterweise führte ihre gezielte Ablation zu keiner Tumorregression. Lgr5-negative Zellen hielten durch ihre Proliferation das Tumorwachstum aufrecht. Nach Beendigung einer gegen Lgr5 gerichteten Therapie entwickelte sich aus ihrem Zellkollektiv erneut eine Lgr5<sup>+</sup>-Subpopulation (137). Schwitalle und Kollegen konnten durch ihre Untersuchungen die besondere Stellung des Wnt-Signalweges nachweisen, der, moduliert durch NF-κB, über β-Catenin, die Ausbildung des Stammzell-Charakters begünstigt (138). Voll differenzierte Glioblastom-Zellen konnten unter dem Einfluss der Transkriptionsfaktoren SOX-2, OLIG2, POU3F2 und SALL2 in CSCs zurück gewandelt werden (139).

#### I.4.1.2 Die Bedeutung der EMT für Tumorstammzellen

Der bereits besprochene Prozess der Metastasierung verlangt den Tumorzellen ähnliche Anpassungsfähigkeiten ab. So müssen epitheliale Tumorzellen in den meisten Fällen einen mesenchymalen Charakter annehmen, um erfolgreich in andere Organe streuen zu können. Dies geschieht über das reversible Phänomen der EMT, das die Zelle mit einer gesteigerten Mobilität und einem erhöhten invasiven Potential versieht. Mani *et al.* wiesen eine direkte Verbindung zwischen der EMT und dem Erwerb epithelialer Stammzeleigenschaften nach. Durch die Stimulation humaner Mamma-Epithelzellen mit den bereits genannten EMT-TFs Twist and Snail konnten diese in den mesenchymalen Zustand überführt werden. Dies zeigte sich in einer Reduktion von E-Cadherin und einer gesteigerten Bildung von N-Cadherin (*Cadherin-switch*). Des Weiteren exprimierten sie auf ihrer Oberfläche das typische CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>-Muster, das charakteristisch für neoplastische Mamma-Stammzellen ist. Außerdem wiesen sie nach der Injektion in Mäuse ein deutlich erhöhtes Potential zur Koloniebildung auf. Die Autoren argumentierten über die Sinnhaftigkeit dieser engen Verknüpfung zwischen der EMT als Voraussetzung für die Metastasierung und dem Erwerb Stammzell-ähnlicher Eigenschaften wie folgt: Würden reguläre Tumorzellen, durch die EMT zur Metastasenbildung befähigt, ohne die Fähigkeit zur Selbsterneuerung in andere Körperregionen streuen, wären sie nicht in der Lage, langlebige Kolonien auszubilden (140).

Die Literatur liefert viele weitere Nachweise für die Beteiligung von EMT-TFs an der Entstehung Stammzell-ähnlicher Tumorzellen, von denen im Folgenden nur einige beispielhaft genannt werden sollen. So konnte gezeigt werden, dass der EMT-TF Slug, der zur gleichen Familie gehört wie Snail, in Zusammenarbeit mit SOX-9 Brustkrebszellen in den Tumor-induzierenden Status transferieren kann (141). Wie bereits erwähnt, konnten Tsai *et al.* nachweisen, dass der EMT-TF Twist-1 im Mausmodell die EMT bei Hauttumoren einleiten kann (68). Untersuchungen von Beck und Kollegen an Hauttumorzellen zeigten daraufhin, dass Twist-1 einen fördernden Einfluss auf die Tumorentstehung, die -progression und die Ausbildung Stammzell-ähnlicher Eigenschaften hat (142). Auch in der *metastatischen Nische*, die sich als Zusammenspiel Wachstums-begünstigender Bedingungen für den

Sekundärtumor definiert, ist die Bildung Stammzell-unterstützender Faktoren entscheidend. Hierzu zählen Notch, Wnt, SOX2 und NANOG (143).

#### I.4.2 Therapieresistenz der Tumorstammzellen

In Anbetracht der bereits beschriebenen intratumoralen Heterogenität überrascht es nicht, dass die verschiedenen Zellgruppen eines Tumors unterschiedlich auf Krebstherapeutika reagieren. So konnte bereits bei vielen Gelegenheiten gezeigt werden, dass CSCs im Vergleich zu Nicht-Stammzellen eine gesteigerte Resistenz gegenüber diesen aufweisen (128).

Chen *et al.* untersuchten das Ansprechen von Glioblastomzellen auf das Zytostatikum Temozolomid *in vivo*. Hierbei konnten sie durch den Einsatz des Markers Nestin CSCs gezielt nachverfolgen. Diese Subpopulation an Stammzellen war in Lage, das erneute Wachstum des Tumors zu initiieren und damit ein vollständiges Rezidiv zu verursachen (144). Passend zur engen Vergesellschaftung zwischen der EMT und den Stammzell-Eigenschaften wurde der Einfluss des EMT-TFs Snail auf die Resistenz von A549-Zellen gegenüber Cisplatin nachgewiesen (145). Creighton und Kollegen untersuchten verbleibende Brustkrebszellen nach erfolgter endokriner Behandlung und Chemotherapie. Der Anteil jener Zellen mit einem CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-low</sup>-Oberflächenprofil und der Fähigkeit zur Ausbildung von *Mammospheres* war erhöht. Beide Parameter gelten als Identifikationsmarker für Tumorstammzellen. Des Weiteren wiesen sie eine erhöhte Expression der mesenchymalen Marker Vimentin und MMP-2 auf, was den Hinweis auf eine zurückliegende EMT lieferte (146).

Die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen sind vielseitig. Der bereits angesprochene Umstand, dass herkömmliche Chemotherapeutika gezielt die schnell proliferierenden Zellgruppen attackieren, resultiert in einer natürlichen Resistenz vieler Tumorstammzellen. Diese sind häufig auf langfristiges Wachstum ausgelegt und teilen sich selten. Außerdem sind sie in der Lage, einen ruhenden Zustand anzunehmen, in welchem sie Therapiezyklen unbeschadet überstehen können. So induziert TGF- $\beta$  bei Krebszellen eine EMT, die sowohl mit einem gesteigerten invasiven Potential als aber auch mit einer erniedrigten Proliferationsaktivität einhergeht. Oshimori *et al.* führten die damit einhergehende Resistenz gegen Cisplatin jedoch nicht allein auf diesen Umstand zurück: Durch die Stabilisierung des Transkriptionsfaktors NRF2 kommt es außerdem zu einer gesteigerten Produktion von Antioxidantien (147). In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche weitere Resistenzmechanismen der CSCs identifiziert. Eine besondere Bedeutung wird den ATP-abhängigen Efflux-Pumpen zugeschrieben. Sie gehören zu einer Familie ATP-bindender Kasette (ABC)-Transportern und werden in sieben Gruppen (ABC<sub>A</sub> – ABC<sub>G</sub>) eingeteilt. Der durch ihre Aktivität gesteigerte Efflux kann die intrazelluläre Konzentration von Chemotherapeutika selektiv senken (148). Bram und Kollegen konnten eine ABC<sub>G2</sub>-Gen-Amplifikation bei A549-Zellen nachweisen, die mit einer gesteigerten Expression des Transmembranproteins und damit einer Resistenz gegen verschiedene Therapeutika einherging (149).

### I.4.3 Identifizierung und Isolation von CSCs

Allen Tumorstammzellen ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausbildung differenzierter Tochterzellen gemeinsam. Nichtsdestotrotz ist es aufgrund der intertumoralen Heterogenität nahezu unmöglich, ein allgemeingültiges Isolationsverfahren für Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften zu etablieren. Lediglich die *in vivo*-Xenotransplantation ist geeignet, CSCs jeden Ursprungs anhand ihrer Selbsterneuerungsfähigkeit zu identifizieren (130). Diese Transplantation ist jedoch mit einem hohen Zeit- und Materialaufwand verbunden und dementsprechend wenig praktikabel. In der Forschung werden heute primär drei Selektionsverfahren angewendet, die sich funktionale Eigenschaften der CSCs zu Nutze machen. Diese sollen im Folgenden besprochen werden:

Bei der **Seitpopulations-Methode** macht man sich die bei CSCs gesteigerte Expression von Efflux-Pumpen zunutze. Durch den Einsatz von Farbstoffen wie Hoechst 33342 können Zellkollektive angefärbt werden. Es wird eine Seitpopulation (SP) erkennbar, die aufgrund direkter Ausschleusung keinen Farbstoff anreichert. Zellen dieser SPs zeigen viele für CSCs charakteristische Eigenschaften, wie die Fähigkeit zur Tumorigenität und Resistenz gegen Chemotherapeutika (150,151).

Des Weiteren werden **spezifische Zellmarker** zur Isolation von CSCs herangezogen. CD44 und CD133 sind übliche Oberflächenmarker, die von zahlreichen CSCs verschiedenen Ursprungs gebildet werden. Viele CSCs exprimieren außerdem intrazellulär die Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1). Andere Oberflächenmarker sind zumeist organspezifisch (152), so beispielsweise CD166 für CSCs der Lunge (153).

Das **Sphere-formation Assay** macht sich die Fähigkeit der CSCs zunutze, unter nicht-adhäsiven Bedingungen kugelige Zellagglomerate, sogenannte Sphäroide, auszubilden. Nicht-Stammzellen fehlt diese Eigenschaft, was dazu führt, dass sie im Prozess der *Anoikis* (siehe oben) zugrunde gehen (154). Die Methode geht auf Beobachtungen von Reynolds und Weiss zurück, die Zellen mit Stammzeileigenschaften als frei schwimmende Sphäroide kultivieren konnten (155). Singh *et al.* wiesen die enge Korrelation zwischen CD133-positiven Stammzellen und Sphäroid-bildenden Zellen und damit die Validität des Verfahrens nach (156).



## I.5 Fragestellung, Arbeitshypothese und Ziel der Untersuchung

In Anbetracht der beträchtlichen Bedeutung von Krebserkrankungen für unsere Gesellschaft werden neue, antineoplastische Therapiekonzepte dringend gesucht. Dabei spielen Thrombozyten eine entscheidende Rolle für das Tumorwachstum, die Metastasenhäufigkeit und damit die Prognose jedes Krebspatienten (9). Es ist folglich von zentraler klinischer Bedeutung, die Interaktionsmuster zwischen Tumorzellen und den Blutplättchen besser verstehen zu lernen. Erste Therapieversuche, die die Wirkung von Thrombozyten gezielt adressierten, hatten einen Rückgang der Metastasenhäufigkeit zur Folge (157). Somit ist zu hoffen, dass die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse zur Etablierung neuer Therapieansätze beitragen und damit das Leben zahlreicher Menschen positiv beeinflussen wird.

Martins Castanheira *et al.* gelang es neben der in der Literatur vielfach postulierten Bildung eines *protektiven Mantels* (9) ein weiteres Interaktionsmuster nachzuweisen. So lagerten sich Thrombozyten nicht nur äußerlich an die CTCs an, sie wurden von diesen auch teilweise gänzlich internalisiert (158). Diese Beobachtungen wurden bei Versuchen unter statischen und dynamischen Bedingungen auf dem Schwenktisch gemacht. Ziel dieser Arbeit war es, die Gültigkeit der Erkenntnisse von Martins Castanheira und Kollegen für die im Blutsystem vorherrschenden Bedingungen zu überprüfen. Hierbei sollte die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen sowohl quantitativ als auch qualitativ untersucht werden. Es war zu klären, inwiefern sich die wahrscheinlich nur kurzen Kontaktzeiten zwischen den Zellen und die herrschenden Scherkräfte auf die Interaktionsmuster auswirken.

Hierzu sollte zunächst ein Fließinkubationssystem etabliert werden, das die im menschlichen Blutkreislauf herrschenden Bedingungen adäquat nachstellt. Durch den Einsatz von Silikonschläuchen verschiedener Länge konnte eine Zeitreihe und damit ein Interaktionsprofil der zu untersuchenden Zellgruppen bei konstantem Fluss erstellt werden. Durch die Färbung der Thrombozyten mit dem Fluoreszenz-Farbstoff PKH-67 konnte ihr Kontakt zu Tumorzellen anhand des Fluoreszenzzuwachses im Durchflusszytometer und im Konfokalmikroskop nachgewiesen werden. Dabei wurde angenommen, dass auch unter Fließbedingungen die Wechselwirkung zwischen diesen beiden Zellgruppen möglich ist.

Vor dem Hintergrund der besonderen Bedeutung von Tumorstammzellen beim Prozess der Metastasierung (122) sollten solche analog zu differenzierten A549-Tumorzellen untersucht werden. Mit Hilfe des *Sphere-formation Assays* konnten Tumorzellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften selektiert und anschließend gemeinsam mit Thrombozyten im Fließinkubationssystem analysiert werden. So sollte ein direkter Vergleich dieser beiden Zellentitäten in Hinblick auf ihr Wechselwirkungsprofil mit Thrombozyten erfolgen. Dabei war denkbar, dass CSCs sich in ihrem Interaktionsverhalten gegenüber Thrombozyten aggressiver zeigen und diese schneller und zahlreicher an sich binden beziehungsweise aufnehmen können.

Die aktuelle Forschung deutet darauf hin, dass P-Selektin eine entscheidende Rolle in der Interaktion der beiden Zellarten spielt (72–75). Durch die Hemmung dieses Oberflächenproteins mittels Heparin lässt sich die Adhäsion an Tumorzellen signifikant reduzieren (78). Für die bereits bei Krebspatienten in den Leitlinien empfohlenen niedermolekularen Heparine, wie beispielsweise Tinzaparin-Natrium (Innohep), konnte neben seiner anti-koagulatorischen Wirkung über die Antithrombin-vermittelte Hemmung der Gerinnungsfaktoren Xa und IIa (159) auch ein hemmender Effekt auf P-Selektin nachgewiesen werden (76,160). Durch die Inkubation von Thrombozyten mit Tinzaparin vor Versuchsbeginn sollte die Rolle von P-Selektin bei der Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen weiter beleuchtet werden. Die bisherigen Studien von Martins Castanheira *et al.* fanden zum großen Teil unter statischen Bedingungen statt. Varki und Kollegen betonen jedoch, dass sich das Verhalten von Selektinen im Strom ändert (161). Es war denkbar, dass die Durchführung der bereits beschriebenen Versuchsreihen unter dem Einfluss von Tinzaparin mit einer sichtbaren quantitativen Inhibierung einhergeht.

## II Material und Methoden

### II.1 Materialien

#### II.1.1 Geräte

Name	Hersteller
Heraeus Multifuge S1	Thermo Scientific, Waltham, USA
Heraeus Megafuge 8	Thermo Scientific, Waltham, USA
Leica TCS SP8 Konfokalmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator CB 53	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Biowizard Golden Line Sterilbank	Kojair, Vilppula, Finnland
Perfusor Space	B.Braun, Melsungen, Schweiz
Wasserbad	Julabo, Seelbach, Deutschland
GUAVA easyCyte	Merck Millipore, Burlington, USA

Tabelle 1: Verwendete Geräte

#### II.1.2 Software

Name	Hersteller
FlowJo v10	FlowJo, LLC, Ashland, USA
SPSS 25	IBM, Armonk, USA
GuavaSoft InCyte	Merck Millipore, Burlington, USA

Tabelle 2: Verwendete Software

#### II.1.3 Laborutensilien

Name	Hersteller
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH und Co, Wertheim, Deutschland
Transferpipette 3,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Millex-GV Filter Unit 0,22µm	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Ireland
Falcon Röhrchen, konisches Röhrchen, 15 ml	Corning, New York, USA
Silberbrand Eterna, Glaspipetten	Brand GmbH und Co, Wertheim, Deutschland
Vacusaft, Absaugsystem mit Vakuumpumpe	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Vacuboy	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipetboy 2	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Ep T.I.P.S. Standard 50-1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ep T.I.P.S. Standard 2-200 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Ep T.I.P.S Standard/Bulk 0,1-5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
50 ml Zellkulturflasche, 25cm <sup>2</sup>	Falcon A Corning Brand, Tewksbury, USA
Discofix-3, 3-Wege-Hahn	B.Braun, Melsungen, Schweiz
Schott Duran, Laborglas	DWK Life Science, Wertheim, Deutschland
Silikonschlauch medizinischer Qualität; Innendurchmesser: 2,5 mm; Wanddicke: 1 mm	J. Lindemann GmbH, Helmstedt, Deutschland
Luer Adapter	Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Deutschland
Helizyme, Enzymatischer Reiniger	B.Braun, Melsungen, Schweiz
250 ml Zellkulturflasche, 75 cm <sup>2</sup>	Falcon A Corning Brand, Tewksbury, USA
Eppendorf Reaktionsgefäß, 5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
BD Discardit II, 5 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
S-Monovette, 5ml 9NC	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Stauschlauch	
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
C-Chip, Neubauer Improved, Einwegzählkammer	NanoEntek, Südkorea
FluoroDish FD35-100	World Precision Instruments. Inc., Sarasota, USA
Culture-Insert 2 Well in $\mu$ -Dish 35 mm (Spacer)	ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimberly Clark Professional, Irving USA

Tabelle 3: Verwendete Laborutensilien

#### II.1.4 Chemikalien und Lösungen

Name	Hersteller
Agarose SERVA for DNA Electrophoresis	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (100x)	Merck/Biochrom, Berlin, Deutschland
FCS Superior (Fetales Kälberserum)	Merck/Biochrom, Berlin, Deutschland
PBS <sup>+/+</sup> (mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> )	Sigma, Steinheim, Deutschland
PBS Dulbecco, w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Dulbecco`s PBS ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Sigma, Steinheim, Deutschland
Citrate-dextrose solution (ACD)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Diluent C for General Membrane Labeling	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Kodan Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland

Steriles Wasser (Ampuwa)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
HEPES $\geq$ 99,5% (titration)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco's PBS mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	Sigma, Steinheim, Deutschland
Poly-L-Ornithine solution (0,01%)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA

Tabelle 4: Verwendete Zutaten und Chemikalien

Name	Hersteller
Recombinant Human IGF-I	Peptotech GmbH, Hamburg, Deutschland
Recombinant Human FGF-basic (154 a.a.)	Peptotech GmbH, Hamburg, Deutschland
Animal Free Recombinant Human EGF	Peptotech GmbH, Hamburg, Deutschland

Tabelle 5: Eingesetzte Wachstumsfaktoren

Name	Hersteller
5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat <i>Wheat Germ Agglutinin</i> (TRITC-WGA)	Invitrogen, Eugene, Oregon, USA
4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)	Molekular probes by life technologies, Eugene, Oregon, USA
PKH-67 Green Fluorescent Cell Linker	SIGMA-ALDRICH, distributed by Phanos Technologies

Tabelle 6: Eingesetzte Farbstoffe

### II.1.5 Medien und Puffer

Name	Inhalt	Hersteller
Dulbecco's MEM	3.7 g/L $\text{NaHCO}_3$ 4.5 g/L D- Glucose Stable glutamine w/o Na-Pyruvate low endotoxine	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
EDTA-Puffer	Titriplex III 0,02%(EDTA) NaCl (8%) KCl (0,2%) $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (1,15%) $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0,2%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

HEPES-Puffer (10 mM)	HEPES $\geq$ 99,5% (titration) Steriles Wasser (Ampuwa)	SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Innohep	Tinzaparin-Natrium 20.000 Anti-Xa I.E./ml	LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Thrombozyten-Puffer ohne Calcium	HEPES Puffer 5 mM D-Glucose Monohydrat NaCL 140 mM KCl 4mM MgCl <sub>2</sub> 1mM Pen/Strep NaOH Bovines Serum Albumin 3,5g/L Ampuwa	Sigma, Steinheim, Deutschland  Merck/Biochrom, Berlin, Deutschland
TrypLE™ Express	Trypsin (-) Phenol Red	gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Paraformaldehyd 10%	Paraformaldehyd Dulbecco`s PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	Roth, Karlsruhe, Deutschland Sigma, Steinheim, Deutschland
FACS-Puffer	Dulbecco`s PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup> FBS Superior (Fetal Bovine Serum) 5%	Sigma, Steinheim, Deutschland Merck/Biochrom, Berlin, Deutschland

Tabelle 7: Eingesetzte Medien und Puffer

### II.1.6 Verwendete Zelllinie

Bei allen im Folgenden beschriebenen Experimenten wurden nicht-kleinzellige Bronchialkarzinomzellen A549 (RRID:CVCL\_0023) (s. Abbildung 2) oder die von ihnen ausgehenden Stammzellen verwendet. Diese humane Zelllinie wurde 1972 am Massachusetts Institute of Technology von einem 58 Jahre alten Patienten gewonnen. Im Frühjahr 2017 wurde sie durch das Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) für authentisch befunden. Mittels Nonaplex PCR-Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass es sich um rein humane Zellen handelt. Die Untersuchung von polymorphen Short Tandem Repeat Sequenzen zeigte eine signifikante Übereinstimmung mit der parentalen Zelllinie.

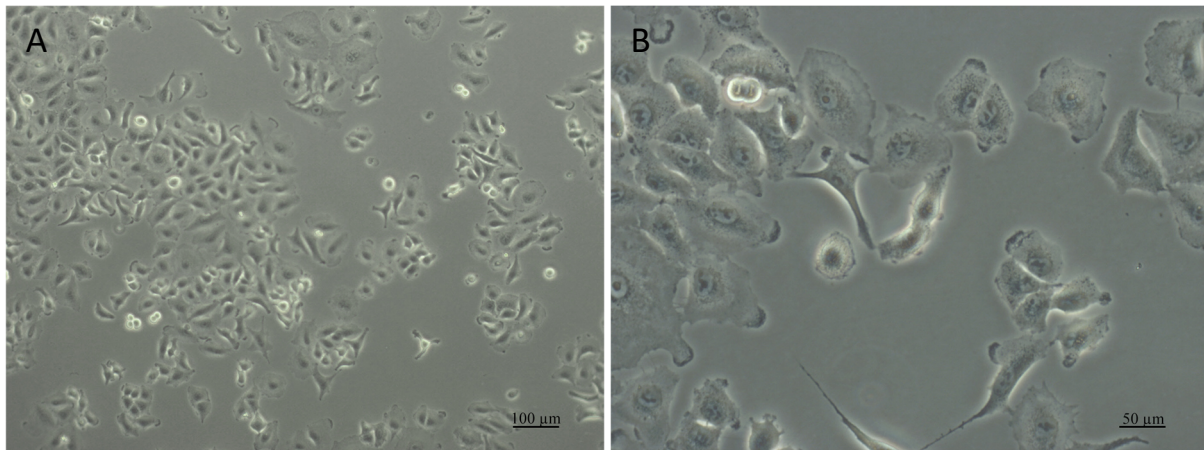


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von adhären-wachsenden Tumorzellen der Linie A549 mit einem 5x (A) und 10x (B) Objektiv.

## II.2 Methoden

### II.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten in Verbindung mit der Zellkultur wurden, um Kontaminationen zu verhindern, unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Sofern nicht anders bezeichnet, wird die Zusammensetzung der im Folgenden beschriebenen Medien und Puffer in Volumenprozent angegeben.

Die A549-Tumorzellen wurden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100%iger Wasserdampfsättigung in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Über einen leicht geöffneten Deckel konnte der Gasaustausch mit dem Puffermedium gewährleistet werden.

Handelsname	Menge
Dulbecco's MEM	90%
Penicillin-Streptomycin	1%
FCS Superior	9%

Tabelle 8: Zusammensetzung des Kulturmediums

Zur Herstellung des verwendeten Kulturmediums (vgl. Tabelle 8) wurden FCS Superior und Penicillin-Streptomycin mit Hilfe des Millex-GV Filters steril filtriert.

Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch kontrolliert. Bei einer 100%igen Konfluenz wurden die Zellen passagiert. So konnte ihr Übereinanderwachsen verhindert werden. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die adhären Zellen wurden mit 7 ml PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Anschließend wurden sie mit 7 ml EDTA für ca. 20 min bei 37°C inkubiert und so vom Flaschenboden abgelöst. Durch leichtes Beklopfen der Kulturflasche und die dadurch hervorgerufenen Erschütterungen ließ sich dieser Prozess beschleunigen.

Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und für 5 min bei 140 g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 3 ml Kulturmedium mit

Hilfe einer Glaspipette bis zu 20 Mal resuspendiert. Dies diente der Lösung von Zellagglomeraten. Die vereinzelt Zellen konnten nun im gewünschten Verhältnis (beispielsweise 1:30) in mit 7 ml Kulturmedium befüllte Kulturflaschen überführt werden.

Die Zellen wurden maximal bis zur 30. Passage für Experimente verwendet.

#### II.2.1.1 Vereinzeltung der A549 Zellen

Die ersten Schritte zur Vereinzeltung der A549-Tumorzellen entsprachen jenen der Passagierung im Rahmen der Zellkultur. So wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Kulturflasche mit 7 ml PBS<sup>-/-</sup> gespült. Um eine bessere Vergleichbarkeit zu den Versuchsreihen mit Tumorstammzellen zu gewährleisten, erfolgte die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden mit Hilfe von 7 ml TrypLE Express. Während der Inkubation bei 37°C über 8 Minuten wurden die Oberflächenproteine der Tumorzellen in der Art gespalten, dass die Zellen ihre Kontakte untereinander und zum Boden der Kulturflasche lösten. Anschließend wurde durch die Zugabe von 5 ml Kulturmedium die weitere Aktivität des Trypsins geblockt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon Röhrchen überführt und bei 140 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das entstandene Zellpellet mit Hilfe einer 5 ml Glaspipette in 3 ml Kulturmedium resuspendiert.

#### II.2.1.2 Selektion der Zellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften

Zur Isolierung jener A549-Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften wurde das gut etablierte *Sphere-formation Assay* angewendet. Diese Methode beruht auf dem Phänomen der *Anoikis*, dem Apoptose-ähnlichen Zugrundegehen epithelialer Zellen nach ihrer Loslösung aus dem Zellkollektiv (65). CSCs verfügen hingegen über einen mesenchymalen Charakter, der ihnen das Wachstum unter nicht-adhäsiven Bedingungen gestattet. Sie bilden dabei kugelige Agglomerate, die man als Sphäroide (engl. *spheres*) bezeichnet.

#### II.2.1.3 Sphere-Formation Assay

Die Kultivierung der CSCs erfolgte in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100%iger Wasserdampfsättigung. Für die Beschichtung des Flaschenbodens wurden 1,2 g Agarose Pulver in 100 ml Dulbecco's MEM gelöst. Das Gemisch wurde dabei unterstützend in der Mikrowelle erhitzt. Jeweils 8,4 ml der noch flüssigen Agarose konnten nun mit Hilfe einer 5000 µl Pipette in die Kulturflaschen überführt werden, sodass der Boden der Flasche gleichmäßig bedeckt war. Nach ungefähr 15-minütiger Abkühlzeit bildete die Agarose eine feste Schicht. Nun wurden 15 ml eines vorgewärmten CSC-Kulturmediums zugefügt. Dieses enthielt – anders als das Kulturmedium für A549-Tumorzellen – kein fetales Kälber-Serum (vgl. Tabelle 9), da die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren eine ungewollte Differenzierung der Tumorzellen zur Folge gehabt hätten.



Handelsname	Menge
Dulbecco's MEM	99%
Penicillin-Streptomycin	1%

Tabelle 9: Zusammensetzung des im Rahmen des Sphere-formation-Assays eingesetzten Kulturmediums

Zeitgleich erfolgte die Vereinzelung konfluierend gewachsener A549-Tumorzellen. Dies geschah analog zu ihrer Subkultivierung mit Hilfe von PBS<sup>-/-</sup> und EDTA (s. oben). Nach ihrer Zentrifugation bei 140 g für 5 Minuten und der Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 3 ml Kulturmedium für CSCs (s. Tabelle 9). Anschließend wurden 750 µl der Zellsuspension in die mit Agarose beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen gegeben. Verglichen mit der Zelldichte in den konfluierend bewachsenen 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen entsprach dies einem Verhältnis von 1:12.

Zur Unterstützung des Sphäroid-Wachstums erfolgte die tägliche Zugabe von Insulin-like Growth Factor-I (IGF), Fibroblast Growth Factor-basic (FGF) und Epidermal Growth Factor (EGF). Diese wurden zuvor in sterilem Wasser und PBS<sup>-/-</sup> + 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) auf eine Konzentration von 2 µg/ml verdünnt und anschließend bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden jeweils 150 µl der Lösungen den 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen beigefügt, wodurch ihre finale Konzentration von 0,02 µg/ml erreicht werden konnte.

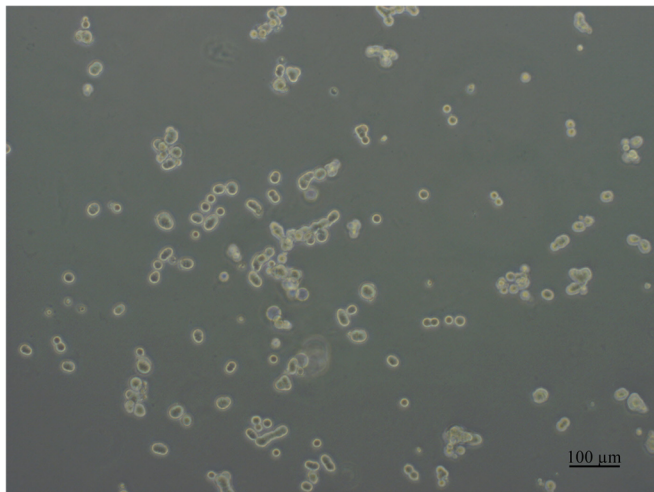


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme nicht-adhäsiv wachsender und Sphäroid-bildender A549-Stammzellen mit einem 5x Objektiv.

#### II.2.1.4 Vereinzelung der CSCs

Im Rahmen des *Sphere-formation Assays* bilden Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften Sphäroide und liegen als Suspension im Kulturmedium vor (vgl. Abbildung 3). Die mit Agarose beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen enthielten ungefähr 15 ml Medium. Dieses wurde vor Versuchsbeginn gleichmäßig auf zwei Falcon Röhren verteilt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 140 g für 5 Minuten. Da sich die Sphäroide in ihrer Größe und Masse stark unterschieden, befanden sich nachher nie alle Zellen im entstandenen Zellpellet. Um Zellverluste zu vermeiden, wurde der Überstand hier nicht vollständig abgesaugt. So wurden ungefähr 2 ml Medium im Röhren belassen, in denen die

an Boden und Wand gedrückten Zellen resuspendiert werden konnten. Anschließend wurde der Inhalt der Falcon Röhren zusammengeführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 140 g über 5 Minuten. Der Überstand wurde dieses Mal vollständig abgesaugt, das entstandene Zellpellet in 200 µl TrypLE Express resuspendiert und für 8 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 5 ml Kulturmedium geblockt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 140 g und 5 Minuten. Das nun entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Kulturmedium für CSCs resuspendiert.

### II.2.1.5 Zellzählung

Sowohl die A549-Tumorzellen als auch die von ihnen ausgehenden CSCs wurden vor jedem Versuchsdurchlauf gezählt. Aus der erhaltenen Zellsuspension wurden 10 µl in eine standardisierte Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop zeigten sich die Zellen gleichmäßig auf vier Quadrate verteilt. Nach der Auszählung jedes dieser Quadrate ergab sich die Zelldichte in der Suspension anhand folgender Formel:

$$\frac{\sum_{x=1}^{x=4} \text{Anzahl der Zellen in Quadrat}(x)}{4} \times 10.000 = \text{Zelldichte [Zellen/ml]}$$

Aus diesem Wert ließ sich das Volumen berechnen, das erforderlich war, um 100.000 Zellen in den Inkubationsansatz zu geben.

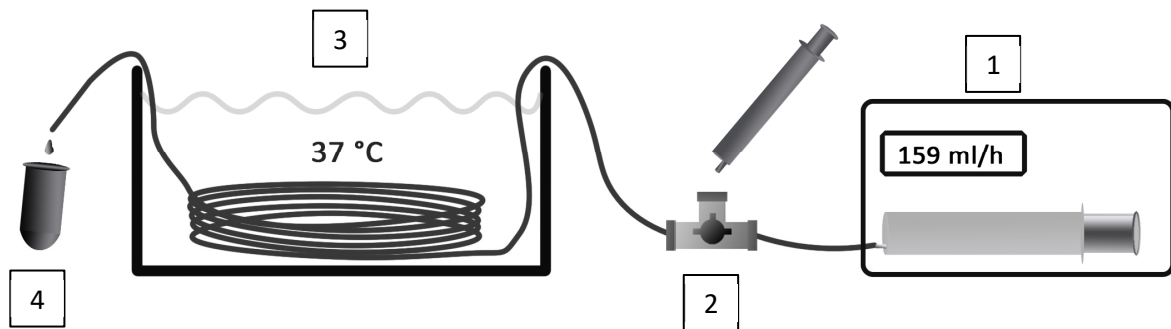
## II.2.2 Untersuchung der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion unter Fließbedingungen

Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkungen von Thrombozyten und Tumorzellen der Linie A549 unter Fließbedingungen qualitativ und quantitativ zu untersuchen. Hierfür wurden PKH-67-gefärbte Thrombozyten mit den Tumorzellen zusammengeführt und bei konstantem Fluss in einem Schlauch bei 37°C inkubiert. Die Wechselwirkung der beiden Zelltypen wurde mittels Durchflusszytometer quantifiziert. Für die qualitative Analyse der Interaktion wurden die Proben mit dem Konfokalmikroskop untersucht.

Von besonderem Interesse war hierbei der Vergleich von differenzierten A549-Tumorzellen und den selektierten CSCs. Zudem sollte der Einfluss von Tinzaparin, einem niedermolekularen Heparin, auf diesen Prozess beleuchtet werden.

### II.2.2.1 Versuchsaufbau

Grundlage aller in dieser Arbeit durchgeführten Experimente war der in Abbildung 4 dargestellte Versuchsaufbau. Dabei wurden die Versuchszellen mit einem durch einen Perfusor erzeugten konstanten Fluss durch ein Schlauchsystem getrieben, um dann am anderen Ende aufgefangen zu werden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.** Der Inkubationsansatz wurde über den Drei-Wege-Hahn (2) in das Schlauchsystem appliziert. Durch den vom Perfusor (1) erzeugten Vorschub von 159 ml/h wurde sie durch den im Wasserbad befindlichen Schlauch (3) bewegt. Anschließend konnten die Zellen nach erfolgter Schlauchpassage aufgefangen und fixiert werden (4).

Es konnte gezeigt werden, dass sich der Prozess der Metastasierung vor allem in den kleinen Arterien, Arteriolen und Kapillaren des menschlichen Blutsystems abspielt (162). Aus Tabelle 10 wird ersichtlich, dass diese Gefäße physiologischerweise einen inneren Durchmesser von wenigen Millimetern aufweisen. Die in der Versuchsreihe verwendeten Schläuche wurden dazu passend gewählt. Sie wiesen einen Innendurchmesser von 2,5 mm auf. Zur Minimierung unerwünschter Wechselwirkungen zwischen den Versuchszellen und der Schlauchwand wurden Schläuche aus Silikon medizinischer Qualität (Wanddicke 1 mm) verwendet.

Gefäß	Durchmesser in mm	Anzahl	Blutmenge in %	Druck in mmHg	Geschwindigkeit in m/s
Aorta	20	1	2	100	0.2
Arterien	5 - 1	1'000	8	90 - 80	0.05
Arteriolen	0.1 - 0.02	10'000'000	1	80 - 30	0.001
Kapillaren	0.01	1000'000'000	6	30 - 15	0.0003
Venolen	0.02 - 0.1	100'000'000	2	20 - 10	0.001
Venen	0.1 - 6	1000	30	10 - 5	0.05
Hohlvenen	20 - 30	2	25	5	0.15

*Tabelle 10: Auflistung der Daten zu den verschiedenen Abschnitten des peripheren Gefäßsystems (163).*

Um insbesondere während langer Inkubationszeiten für die Versuchszellen konstante Bedingungen zu schaffen, wurde der Schlauch während jeder Versuchsreihe in ein Wasserbad bei 37°C gelegt. Dieses verfügte über einen Deckel, der während des Versuchsdurchlaufs zum Lichtausschluss und damit zum Erhalt der Leuchtkraft der eingesetzten Farbstoffe geschlossen blieb. Das eine Ende des Schlauches war mit einem handelsüblichen Perfusor verbunden, der den Inkubationsansatz mit einem konstanten Fluss vorantrieb. Ein zwischengeschalteter Drei-Wege-Hahn gestattete die Zuführung des Inkubationsansatzes am Schlauchanfang. Das andere Ende war frei. Die Versuchszellen konnten hier nach ihrer Schlauchpassage aufgefangen werden.

### II.2.2.2 Bestimmung einer praktikablen Flussgeschwindigkeit

In den für die Metastasierung relevanten Gefäßen, den Arteriolen und kleinen Arterien, herrschen laminare Strömungsverhältnisse mit Fließgeschwindigkeiten zwischen 1 und 50 mm/s (Tabelle 10). Bei

Voruntersuchungen wurden passagierte Tumorzellen probatorisch mit unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten von 1, 3, 5 und 9 mm/s durch das Schlauchsystem bewegt. Hierbei erwies sich eine Fließgeschwindigkeit von 9 mm/s als praktikabel und repräsentativ für die physiologischen Verhältnisse.

Zur Erzeugung dieser Fließgeschwindigkeit musste der Volumenstrom, also das Volumen pro Zeit, für die Programmierung des Perfusors bestimmt werden. Dieser ergab sich aus dem Innendurchmesser des verwendeten Silikonschlauches und der angestrebten Geschwindigkeit. Zunächst musste hierfür, ausgehend von dem Innendurchmesser des Schlauches von 2,5 mm, die Querschnittsfläche desselbigen berechnet werden.

$$\text{Querschnittsfläche (A)} = r^2 \times \pi$$

$$r = 1,25\text{mm}$$

$$A = 4,908\text{ mm}^2$$

Aus der angestrebten Fließgeschwindigkeit  $v$  von 9 mm/s ergibt sich ein Volumenstrom  $I$  von:

$$I = A \times v$$

$$I = 4,908\text{ mm}^2 \times 9 \frac{\text{mm}}{\text{s}}$$

$$I = 44,178 \frac{\text{mm}^3}{\text{s}}$$

$$I = 159,0408 \frac{\text{ml}}{\text{h}}$$

Damit musste der Perfusor auf einen Volumenstrom von 159 ml/h eingestellt werden, um die gewünschte Fließgeschwindigkeit von 9 mm/s zu generieren.

### II.2.2.3 Anpassung der Schlauchlänge

In den im Folgenden beschriebenen Experimenten sollte das Ausmaß der Wechselwirkung von Tumorzellen und Thrombozyten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht werden. Zur Erstellung einer solchen Zeitreihe bei gleichen Fließbedingungen waren Schlauchabschnitte unterschiedlicher Länge erforderlich. Die Längen dieser Abschnitte (vgl. Tabelle 11) ergaben sich aus der folgenden Formel:

$$\text{Schlauchlänge [mm]} = \text{Fließgeschwindigkeit} \left[ \frac{\text{mm}}{\text{s}} \right] \times \text{Inkubationszeit [s]}$$

Hieraus resultierten für die angestrebten Inkubationszeiten folgende Schlauchlängen:

Inkubationszeit	Schlauchlänge
1 min	0,54 m
2,5 min	1,35 m
5 min	2,70 m
15 min	8,10 m
30 min	16,2 m
45 min	24,3 m

Tabelle 11: Benötigte Schlauchlängen im Bezug zur angestrebten Inkubationszeit

#### II.2.2.4 Pflege der Schläuche

Um den Einfluss potenziell verbliebener Zellreste auszuschließen, wurden die Schlauchabschnitte vor jedem Versuchsdurchlauf mit Helizyme gereinigt. Hierfür wurde das Detergens im Verhältnis 1:100 mit sterilem Wasser verdünnt. Um eine optimale Reinigung zu erzielen, wurden die Silikonschläuche mit dieser Lösung befüllt, an den Enden verschlossen und für 5 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Schläuche mit PBS<sup>-/-</sup> gründlich gespült.

#### II.2.3 Thrombozytenvorbereitung

Die Thrombozyten wurden vor jedem Versuchsdurchlauf frisch von Mitarbeitern des Instituts nach informierter Einwilligung gemäß der WMA Deklaration von Helsinki gewonnen (164). Relevante Grunderkrankungen und die bis zu zehn Tagen zurückliegende Einnahme von antikoagulatorisch wirksamen und Thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten wurden erfragt und ausgeschlossen. Das Vorgehen bei der Blutentnahme entsprach den aktuellen Krankenhausstandards.

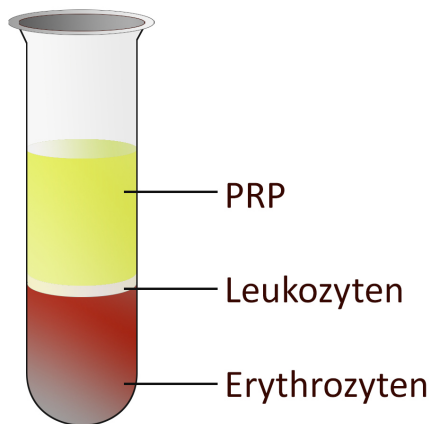
##### II.2.3.1 Blutentnahme

Durch einen Stauschlauch wurde der venöse Blutfluss oberhalb des Ellenbogens unterbunden. Die Haut über der zu punktierenden Vene wurde mehrmals unter Einhaltung vorgegebener Einwirkzeiten desinfiziert. Nach Punktion des Gefäßes konnte die benötigte Menge an Blut entnommen werden. Das in den verwendeten S-Monovetten enthaltene Citrat verhinderte die vorzeitige Aktivierung der Thrombozyten.

##### II.2.3.2 Färbung der Thrombozyten mit PKH-67

Zur weiteren Hemmung der Thrombozyten wurden 10% (v/v) ACD-Puffer (in diesem Falle 500 µl) in die S-Monovette gegeben. Anschließend wurden die Röhrchen für 20 min bei 270 g zentrifugiert. So konnte eine Auftrennung der Blutbestandteile erreicht werden. Ihrer geringen Masse entsprechend wurden die Thrombozyten in der obersten Schicht, dem sogenannten *platelet-rich-plasma* (PRP), aufkonzentriert (Abbildung 5). Das PRP wurde für die weiteren Arbeitsschritte in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Durch den Einsatz einer Transferpipette mit weiter Öffnung sollten die dabei

entstehenden Scherkräfte minimiert werden. Dabei wurde stets ein Sicherheitsabstand von ungefähr 1 cm zur nächsten Zellschicht eingehalten, um die Mitnahme weißer Blutzellen zu verhindern.



*Abbildung 5: Darstellung einer Blutprobe nach erfolgter Zentrifugation. Entsprechend der zellulären Masse und ihrer Konzentration bilden sich drei Schichten aus. Hierbei finden sich die Erythrozyten unten im Röhrchen. Durch eine schmale Schicht aus Leukozyten getrennt zeigt sich oben im Röhrchen das Thrombozytenreiche Plasma (PRP).*

Zum PRP wurde nun das gleiche Volumen Thrombozyten-Puffer (zumeist 2 ml) und erneut 10% (v/v) ACD-Puffer hinzugegeben. Eine Durchmischung erfolgte über vorsichtiges, zweimaliges Invertieren. Anschließend wurde die Lösung bei 500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Diluent C resuspendiert. Zeitgleich wurden in einem separaten Eppendorf Reaktionsgefäß 4 µl des Membran-Farbstoffs PKH-67 mit 1 ml Diluent C verdünnt. Die beiden Lösungen wurden zusammengeführt und durch zweimaliges Resuspendieren vorsichtig vermischt.

Alle nun folgenden Schritte fanden unter strengem Lichtausschluss statt, um ein Ausbleichen des Farbstoffs zu verhindern.

Die Thrombozyten wurden für 5 min bei Raumtemperatur mit dem Farbstoff inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Färbung durch Zugabe von 10 ml Thrombozyten Puffer (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ) und 10% (v/v) ACD-Puffer geblockt. Dabei wurde der verbleibende Farbstoff an die im Puffer befindlichen Proteine gebunden. Nach einer Wartezeit von einer Minute erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 500 g für 10 Minuten. Das dabei entstandene Zellpellet wurde zuletzt in 4 ml Thrombozyten-Puffer (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ) resuspendiert. Die resultierende Thrombozytenkonzentration lag, ausgehend von den durchschnittlichen Werten gesunder Erwachsener, bei schätzungsweise 250.000.000 Zellen/ml.

### II.2.3.3 Erstellung der Kontrolle

Die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und PKH-67-gefärbten Thrombozyten sollte anhand des Fluoreszenzzuwachses der Tumorzellen im Durchflusszytometer bestimmt werden. Als Referenzwert wurde bei jedem Versuchsdurchlauf eine Kontrolle mit ungefärbten Thrombozyten durchgeführt. Die Erstellung der Kontrolllösung erfolgte analog zu den oben beschriebenen Schritten, unter Aussparung der Zugabe des PKH-67-Farbstoffs.

## II.2.4 Die Anwendung von Tinzaparin

Neben der Zugabe von Tinzaparin in den Inkubationsansatz wurden bei den entsprechenden Versuchsreihen die Thrombozyten bereits bei ihrer Vorbereitung mit Tinzaparin inkubiert. So sollten die *in vivo*-Bedingungen in heparinisierten Patienten dargestellt werden, wonach CTCs im Blut auf bereits inhibierte Thrombozyten treffen.

Der Wirkstoff Tinzaparin wurde in einer 0,5 ml Spritze mit einer Konzentration von 20.000 U/ml geliefert. Die Verdünnung erfolgte in zwei Schritten: Zuerst wurden 20 µl der Tinzaparin-Lösung mit 980 µl PBS<sup>+/+</sup> gemischt. Zu der erhaltenen 2%igen Lösung wurden nun 9 ml PBS<sup>+/+</sup> gegeben. Man erhielt so eine Verdünnung auf 0,2% und damit eine Wirkstoffkonzentration von 40 U/ml.

Bei Tinzaparin-behandelten Patienten wird eine Blutkonzentration des Wirkstoffs von ungefähr 1 U/ml empfohlen (165). Um diese Wirkstoff-Konzentration zu erreichen, wurden der Thrombozyten-Suspension, nach erfolgter Färbung, je Milliliter 25 µl der erstellten Tinzaparin-Lösung beigefügt. Die Zellen wurden anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

## II.2.5 Erstellung des Inkubationsansatzes

Zur Erstellung des Inkubationsansatzes (vgl. Tabelle 12) wurde ein 5 ml Eppendorf Tube mit 1 ml Kulturmedium befüllt. Durch die Zugabe von 20 µl einer HEPES gepufferten Lösung (10 mM in sterilem Wasser) konnte auch während der Schlauchpassage ein konstanter pH-Wert gewährleistet werden. Anschließend wurden 100.000 A549-Tumorzellen beziehungsweise ihre CSCs beigefügt. Die Zugabe von 1 ml der Thrombozyten-Suspension erfolgte erst unmittelbar vor Versuchsbeginn. Eine Verfälschung der Ergebnisse durch vorzeitigen Kontakt der beiden Zellenarten konnte so vermieden werden.

Zur Untersuchung der Wirkung von Tinzaparin wurden die Thrombozyten bereits nach ihrer Färbung mit dem niedermolekularen Heparin für 30 min inkubiert. Die Zugabe von weiteren 25 µl zum Inkubationsansatz sollte einer Verdünnung des Wirkstoffs entgegenwirken. Die Tinzaparin-Konzentration im Inkubationsansatz entsprach demnach 1 U/ml.

Substrat	Menge
Kulturmedium/Sphere-Medium (s.o)	1 ml
HEPES-Puffer	20 µl
A549 Zellen in Kulturmedium/SphereCells in Sphere-Medium	100.000 Zellen
Thrombozyten in Thrombozytenpuffer	1 ml (ca. 250 Mio Thrombozyten)
Ggfalls. Tinzaparin (40 U/ml)	25 µl

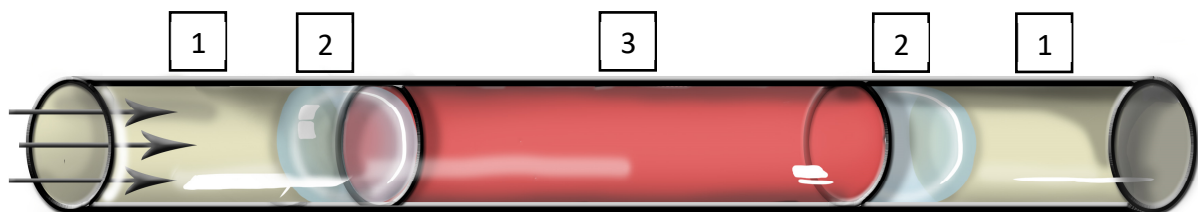
Tabelle 12: Zusammensetzung des Inkubationsansatzes

## II.2.6 Versuchsdurchführung

Der fertige Inkubationsansatz wurde in eine 5 ml Spritze überführt. Zur Vermeidung von Scherkräften wurde hierfür ihr Kolben entfernt, sodass der Inkubationsansatz von hinten in die Spritze vorsichtig hineingegossen werden konnte. Der Kolben wurde anschließend wieder in die Spritze eingeführt. Hierbei wurde darauf geachtet, dass stets eine Luftblase mit einem Volumen von mindestens 2 ml in der Spritze verblieb. Der Inhalt der Spritze konnte nun über den in den Versuchsaufbau integrierten Drei-Wege-Hahn in das Schlauchsystem appliziert werden (vgl. Abbildung 4). Der Schlauch war durch die oben beschriebenen Reinigungsschritte bereits mit PBS<sup>-/-</sup> gefüllt.

Um reibungslose Übergänge zu gewährleisten, wurde der Perfusor bereits vor der Fertigstellung des Inkubationsansatzes eingeschaltet. Der Perfusor konnte über die Stopp-Funktion angehalten werden. Die Luer-Slip Düse der Spritze wurde in die freie Öffnung des Drei-Wege-Hahns gesteckt und der Inhalt der Spritze direkt in den Versuchsschlauch gedrückt.

Die Spritze wurde zuerst so gehalten, dass die Düse senkrecht nach oben zeigte. Die in der Spritze enthaltene Luft befand sich zwischen dem Inkubationsansatz und der Düse. Durch langsamen Vorschub des Kolbens konnte so die Hälfte der Luft in das Schlauchsystem appliziert werden. Die dabei entstandene Luftblase diente als Abschirmung zwischen dem Inkubationsansatz und dem davor liegenden PBS<sup>-/-</sup>. Anschließend wurde die Spritze umgedreht und der Inkubationsansatz in den Schlauch gegeben. Mit der noch in der Spritze befindlichen Luft wurde auch hinter dem Inkubationsansatz eine abgrenzende Luftblase erzeugt (vgl. Abbildung 6).



*Abbildung 6: Schematische Darstellung des Inkubationsansatzes im Schlauchsystem. Der Vorschub des Inkubationsansatzes (3) im Schlauch wurde über die Phosphat-gepufferte Salzlösung PBS<sup>+/+</sup> (1) vermittelt. Eine Durchmischung der beiden Flüssigkeiten konnte über die Setzung zweier Luftblasen (2) vor und hinter dem Inkubationsansatz erreicht werden. (Zeichnung von Jana Katharina Schmitz nach Dominik Berger)*

Insbesondere bei längeren Inkubationszeiten wurden mehrere Inkubationsansätze unmittelbar aufeinanderfolgend in denselben Schlauch gegeben. Um eine Stase zu verhindern wurde der Perfusor erst nach Anschluss der Spritze über die Stopp-Funktion angehalten. Der Fluss wurde nun nach Umstellung des Drei-Wege-Hahns durch einen konstanten Druck auf den Kolben der Spritze manuell aufrechterhalten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Fließgeschwindigkeit ungefähr den angestrebten 9 mm/s entsprach. Nach erfolgter Applikation wurde der Drei-Wege-Hahn wieder zurückgestellt und der Perfusor erneut gestartet.



### II.2.7 Fixierung der Zellen

Am anderen Ende des Schlauches wurden die Zellen mit einem 5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß aufgefangen. Für die Auswertung im Durchflusszytometer wurden sie hierbei direkt fixiert. Dafür befanden sich in diesem 250 µl des Fixativs Paraformaldehyd (10%) (PFA). Zusammen mit den 2 ml Inkubationsansatz ergab sich eine PFA-Konzentration von 1%. Für die Fixierung wurde die Probe 30 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss gelagert. Durch diese Schritte wurde jede weitere Interaktion der beiden Zellgruppen nach der Schlauchpassage verhindert.

### II.2.8 Auswertung

Für die Auswertung des oben beschriebenen Experiments wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet: Eine quantitative Analyse erhielt man im Durchflusszytometer. Jede Zelle des Experiments wurde hier einzeln hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Färbung erfasst.

Unter dem Konfokalmikroskop konnten einzelne Zellen gezielt untersucht werden, um die Art und Weise der Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen zu beurteilen. Die hierbei entstandenen Aufnahmen stellten somit auch einen wichtigen Prüfstein für die Validität des Verfahrens dar.

#### II.2.8.1 Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf dem Ansaugen der in der Probe vorhandenen Zellen durch eine Kapillare. Durch ihren geringen Innendurchmesser passieren die zu untersuchenden Zellen diese nur nacheinander. So können sie einzeln durch einen Laser optisch abgetastet werden. Dieser Laser erfasst neben dem Fluoreszenzverhalten der Zellen vor allem zwei Eigenschaften: Der *Forward Scatter* stellt ein Maß für die Größe der Zelle dar. Der *Sideward Scatter* hingegen gibt einen Hinweis auf ihre Granularität.

#### II.2.8.2 Waschschritte vor der Untersuchung im Durchflusszytometer

Auf die Fixierung folgten zwei Waschschritte im sogenannten *FACS*-Puffer. So sollte das PFA aus der Lösung entfernt und die Zellen für die Auswertung im Durchflusszytometer vorbereitet werden.

Die Reaktionsgefäße wurden hierfür 5 Minuten bei 140 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml *FACS*-Puffer resuspendiert und ein weiteres Mal bei 140 g für 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet, dieses Mal in 300 µl *FACS*-Puffer, resuspendiert. Die Probe war nun bereit für die Auswertung im Durchflusszytometer.

Die Proben wurden unmittelbar vor der Datenerfassung im Durchflusszytometer mehrmals mit einer 1 ml Pipette angesaugt und wieder abgelassen. Hierdurch sollten Zellagglomerate gelöst und abgesunkene Zellen vom Boden mobilisiert werden. Verbliebene Zellhaufen und grobe Verschmutzungen wurden durch den Einsatz eines Filterpapiers, Mesh-Einheit 120, bei der Überführung

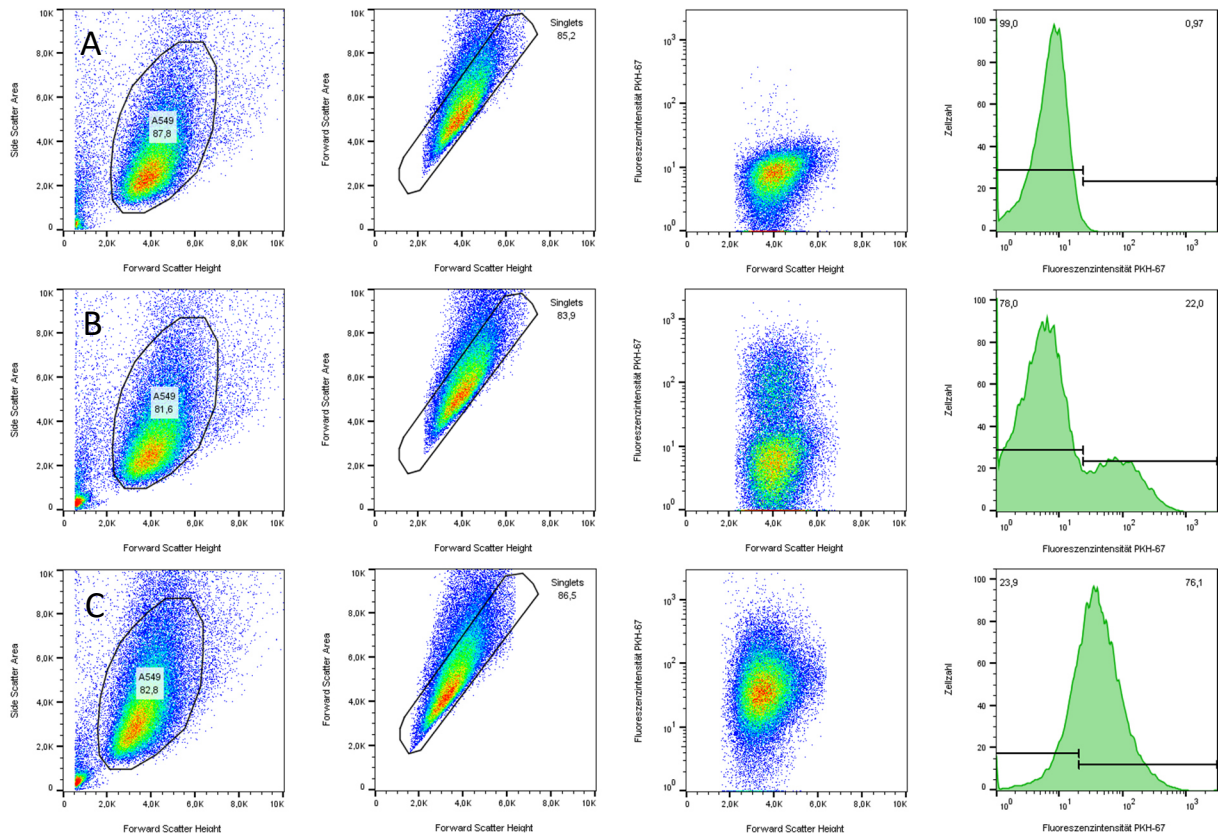
ins *FACS*-Röhrchen beseitigt. Hierdurch sollte vor allem das Verstopfen der Kapillare verhindert werden. Auch bei diesen Schritten wurde stets auf eine adäquate Lichtabschirmung geachtet.

### II.2.8.3 Auswertung im Durchflusszytometer

Für die Auswertung der Versuche wurde ein *GUAVA easyCyte* der Firma Millipore mit einem Exzitationslaser der Wellenlänge 488nm angewendet. Dieser wurde freundlicherweise von Prof. Eble aus dem Institut für Biochemie der Universität Münster zur Verfügung gestellt. Die Datenerfassung erfolgte über die vom Hersteller empfohlene Software *GuavaSoft InCyte*. Die Auswertung und graphische Darstellung der im Durchflusszytometer gesammelten Daten erfolgte mittels *FlowJo v10*.

### II.2.8.4 Gating-Strategie

Die Tumorzellen lassen sich anhand ihrer Größe und Granularität (*Forward-* vs. *Side-Scatter*) klar von den Thrombozyten unterscheiden (erste Säule in Abbildung 7). Durch die Gegenüberstellung des *Forward-Scatters* über die Fläche und die Höhe der Zellen (*Forward-height* vs. *Forward-area-Scatter*) ließen sich Zellagglomerate aussortieren (zweite Säule Abbildung 7), sodass nur noch vereinzelte Tumorzellen, sogenannte *singlets*, berücksichtigt wurden. Für diese Zellen ließ sich ihre individuelle Fluoreszenzintensität bestimmen (dritte Säule Abbildung 7). Bei den Versuchsdurchläufen wurde für jede Inkubationszeit eine Kontrolle (Thrombozyten ohne *PKH-67*-Färbung) erstellt, die Aufschluss über die Eigenfluoreszenz der Versuchszellen gab. Anhand dieser Kontrollen konnte ein Grenzwert festgelegt werden, über dem genau 1% der Kontrollzellen lag. Dieser Grenzwert wurde anschließend auf die Versuchsgruppen übertragen (vierte Säule Abbildung 7). Dabei wurde stets die entsprechende Kontrolle im selben Versuchsdurchlauf mit gleicher Inkubationszeit angewendet. Hierdurch konnte der Anteil der Tumorzellen bestimmt werden, der durch die Wechselwirkung mit *PKH-67*-gefärbten Thrombozyten einen relevanten Fluoreszenz-Zuwachs erfahren hatte und im Folgenden als Anteil *positiver* Zellen bezeichnet wird.



**Abbildung 7: Gating-Strategie zur Identifizierung der A549-Tumorzellen, Beseitigung von Duplets und Bestimmung des Anteils positiver Zellen.** Dargestellt sind exemplarische Proben der Zellreihe A549 nach 5- (B) und 45-minütiger (C) Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen. **A:** Die Kontrolle wurde durch die 5-minütige Schlauchpassage der A549-Zellen mit nicht-gefärbten Thrombozyten gewonnen. **Erste Säule:** Das Gating der A549-Tumorzellen erfolgte anhand ihrer Größe und Granularität (Forward- vs. Side-Scatter). **Zweite Säule:** Zellagglomerate wurden durch die Gegenüberstellung des Forward-Scatters über die Fläche und die Höhe der Zellen (Forward-height vs. Forward-area-Scatter) aussortiert. **Dritte Säule:** Auf diese Weise gelang die Bestimmung der individuellen Fluoreszenzintensität der Zellen. **Vierte Säule:** Der Grenzwert, ab dem Tumorzellen einen relevanten Fluoreszenzzuwachs erfahren hatten und somit als positiv zu werten waren wurde anhand der entsprechenden Kontrolle festgelegt. Somit ist der Grenzwert nach 45 min (C) nicht identisch mit dem nach 5 min (A und B).

### II.2.8.5 Untersuchung mit dem Konfokalmikroskop

Für die Visualisierung der Tumorzellen wurde das Konfokalmikroskop TCS SP8 der Firma Leica mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv verwendet. Nach der Schlauchpassage erfolgte ihre Färbung mit verschiedenen Farbstoffen. Dabei wurden sowohl A549-Zellen als auch CSCs nach 5- und 45-minütiger Inkubationszeit untersucht. Die Thrombozyten wurden bereits im Rahmen der Vorbereitung mit dem Membranfarbstoff PKH-67 gefärbt. Die Untersuchung fand auf einem vorbehandelten Glasbodenschälchen (FluoroDish) statt.

### II.2.8.6 Vorbereitung des FluoroDish

Das FluoroDish wurde vor Gebrauch mit 70%igem Ethanol gesäubert und mit einem fusselfreien Präzisionswischtuch getrocknet. Anschließend wurde ein Spacer mit leichtem Druck am Boden des FluoroDish fixiert. Dieser begrenzt die Fläche, auf der sich die Zellen verteilen können und gestattet somit bessere Übersichtsaufnahmen.

Für die Beschichtung des Dish-Bodens wurden 300 µl Poly-L-Ornithin in den Innenbereich des Spacers gegeben und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Reste des Poly-L-Ornithin abgesaugt und die Beschichtung des FluoroDish mit 300 µl PBS<sup>-/-</sup> gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS<sup>-/-</sup> konnte der Inkubationsansatz auf das FluoroDish gegeben werden. Nach ungefähr 15 Minuten waren die Versuchszellen auf dessen Boden abgesunken und dort durch die Poly-L-Ornithin-Beschichtung immobilisiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem 63x Ölimmersions-Objektiv.

#### II.2.8.7 TRITC-WGA- und DAPI-Färbung

Zur Färbung der Tumorzellen wurden die Farbstoffe 5(6)-Tetramethylrhodaminisothiocyanat-*Wheat Germ Agglutinin* (TRITC-WGA) und 4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) verwendet. DAPI setzt direkt an der DNA an und bewirkt so eine Blaufärbung des Zellkerns. WGA ist ein Lektin, das spezifisch an Kohlenhydratstrukturen der Glykokalyx binden und so zusammen mit TRITC die Zellmembran rot darstellen kann. Die Fixierung einer Zelle mit PFA kann ihre Permeabilisierung zur Folge haben. Die Färbung der Zellmembran mit TRITC-WGA musste also vor dieser erfolgen. Die entsprechenden Reaktionsgefäße wurden vor Versuchsbeginn anstelle von PFA mit 20 µl TRITC-WGA (1:100) befüllt. Der Inkubationsansatz wurde nach der Schlauchpassage hierin aufgefangen. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss wurde die Probe für 5 Minuten mit 140 g zentrifugiert.

Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das entstandene Zellpellet in 1ml PBS<sup>+/+</sup> + 1%igem PFA resuspendiert. Die Fixierung fand – wie oben beschrieben – durch 30-minütige Inkubation auf Eis unter Lichtausschluss statt. Es folgte ein Waschschriff der Zellen mit dem *FACS*-Puffer. Hierfür wurden die Zellen für 5 Minuten bei 140 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 500 µl *FACS*-Puffer resuspendiert. Zur Färbung der Zellkerne wurden der Lösung zuletzt 2 µl des Farbstoffs DAPI zugegeben. Die Probe konnte so auf das vorbereitete FluoroDish gegeben werden.

### II.3 Statistische Analysen

Statistische Tests wurden mit SPSS 25 durchgeführt. Im Folgenden bezeichnet „N“ die Anzahl der biologischen Replikate. Diese zeichnen sich durch denselben Versuchsablauf unter Verwendung von Tumorzellen aus unterschiedlichen Kulturflaschen und Thrombozyten, die zu einem anderen Zeitpunkt oder aus einem anderen Spender beziehungsweise einer anderen Spenderin gewonnen wurden. N ist bei den Versuchen zur Wechselwirkung zwischen Tumorzellen/Tumorstammzellen und Thrombozyten sowie zur Wirkung des niedermolekularen Heparins Tinzaparin stets  $\geq 3$ . Im Rahmen der Methoden-Etablierung wurden Voruntersuchungen mit  $N < 3$  durchgeführt. Darüber hinaus gibt „n“ die Anzahl der technischen Replikate und damit die Anzahl an Versuchsdurchläufen mit Tumorzellen gleicher Passagezahl und aus derselben Blutentnahme eines Spenders gewonnen Thrombozyten an.

Zum Vergleich der verschiedenen Versuchszellgruppen wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) anhand des geometrischen Mittelwertes der absoluten Fluoreszenzintensität aller untersuchten Zellen

herangezogen. Dieser zeigt sich, ähnlich wie der Median, robust gegen die im Durchflusszytometer häufig auftretenden Ausreißer. Für das arithmetische Mittel dieser MFIs einer Versuchskonstellation konnte anhand des Shapiro-Wilk-Tests eine Normalverteilung nachgewiesen werden. Zur Signifikanztestung des Fluoreszenzzuwachses einer Versuchsgruppe im Vergleich zu ihrer Kontrolle wurde ein gepaarter t-Test angewendet. Unterschiede zwischen differenzierten A549-Tumorzellen und CSCs hinsichtlich ihres Anteils an *positiven* Zellen und ihrer MFI wurden mittels ungepaarten t-Tests auf ihre Signifikanz hin untersucht. Auch hier bescheinigte der Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung der Daten. Gleiches gilt für den Vergleich Tinzaparin-behandelter und ungehemmter Proben.

In den Punkt- und Balkendiagrammen umfasst der Fehlerbalken stets eine Standardabweichung. Verbindungslinien wurden hier über Spline-Interpolation erstellt. Zur besseren Übersicht der teilweise stark divergierenden Fluoreszenzintensität der Versuchszellen weist die x-Achse in den Histogrammen eine logarithmische Skalierung auf.

Das Signifikanzniveau beträgt 5%. Eine weitere Spezifizierung der Signifikanzwerte ist in den Legenden mit folgendem Schema angegeben: \*  $\triangleq p < 0,05$ ; \*\*  $\triangleq p < 0,01$ ; \*\*\*  $\triangleq p < 0,001$ .

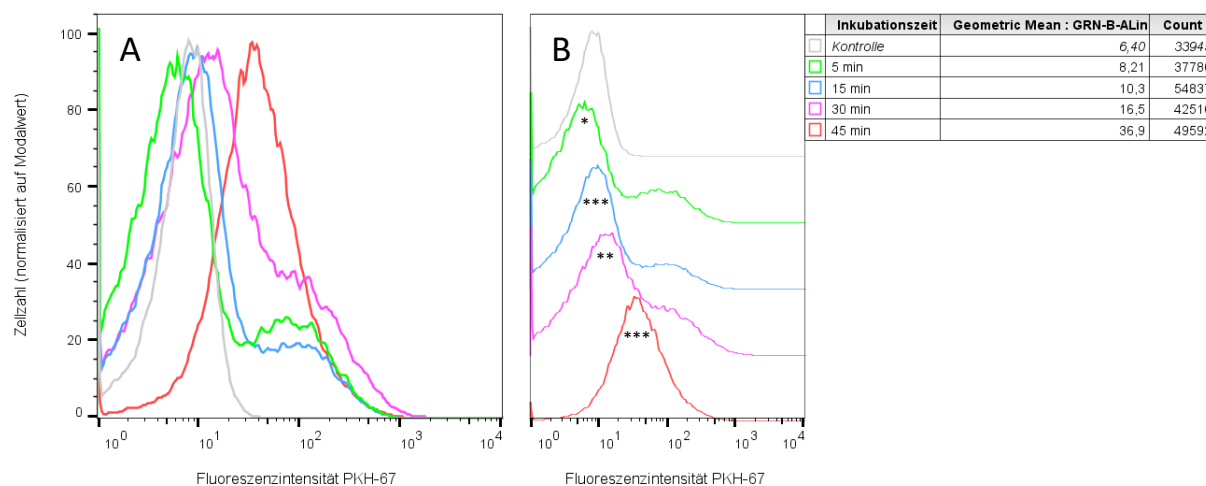
### III Ergebnisse

#### III.1 Die Interaktion differenzierter A549-Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen

Zur Beurteilung der Interaktionsmuster zwischen Tumorzellen der Reihe A549 und Thrombozyten unter physiologischen Bedingungen im Blutkreislauf wurden diese gemeinsam in einem Schlauchsystem inkubiert. Durch die Erzeugung eines laminaren Flusses mit einer Fließgeschwindigkeit von 9 mm/s wurden die Strömungsverhältnisse simuliert, die in den kleinen Arterien und Arteriolen (1 - 50 mm/s) vorherrschen (s. Tabelle 10). Der probatorische Einsatz langsamerer Flussgeschwindigkeiten resultierte in einem starken Rückgang der am anderen Ende des Schlauches nachweisbaren Zellen. So fanden sich bei Geschwindigkeiten von 1 mm/s keine und bei 3 und 5 mm/s nur noch ein Bruchteil der zugeführten Zellen nach erfolgter Schlauchpassage im Inkubationsansatz wieder.

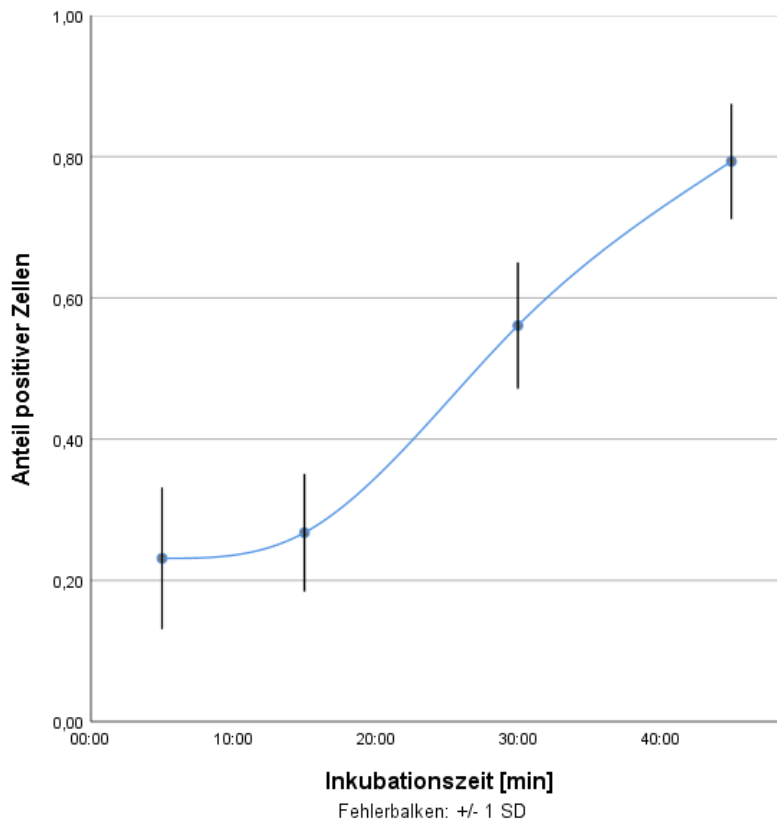
Die Verwendung von Schlauchstücken unterschiedlicher Länge gestattete die Erstellung einer Zeitreihe. Die Versuchszellen wurden nach ihrer Schlauchpassage mit 1%igem PFA fixiert, sodass keine weiteren Wechselwirkungen zwischen ihnen stattfinden konnten. Anschließend erfolgte die Beurteilung der Tumorzellen im Durchflusszytometer. Sie wurden für diese Untersuchung nicht gefärbt und zeigten lediglich eine geringe Eigenfluoreszenz. Diese konnte auch anhand der Kontrollen mit nicht-gefärbten Thrombozyten erfasst werden (graue Kurve, Abbildung 8). Für die Versuchsdurchläufe wurden die Thrombozyten mit dem Membranfarbstoff PKH-67 gefärbt. Eine Steigerung der Fluoreszenzintensität der Tumorzellen erlaubte somit Rückschlüsse auf ihren beständigen Kontakt zu mindestens einem gefärbten Thrombozyten. Diese mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) wurde für die Versuchszellen anhand des geometrischen Mittelwertes ihrer absoluten Werte erfasst.

So zeigten die A549-Tumorzellen bereits nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten in Bezug zur Kontrolle einen signifikanten Zuwachs ihrer MFI. Dieser Effekt nahm im zeitlichen Verlauf weiter zu (Abbildung 8). Hierbei fiel auf, dass zu Beginn der Zeitreihe nicht alle Tumorzellen am Zuwachs der MFI beteiligt zu sein schienen. Lediglich eine kleine Subgruppe offenbarte eine sichtbar gesteigerte Fluoreszenzintensität, was sich im Histogramm durch die Ausbildung einer sogenannten *Schulter* darstellt (Abbildung 8; 5 und 15 min). Erst nach 30-minütiger Inkubationszeit ist eine Verschiebung des Hauptpeaks (sog. *peak shift*) zu beobachten, der auf die Beteiligung aller Tumorzellen schließen lässt.



**Abbildung 8: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von A549-Tumorzellen nach der Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen.** Als Kontrolle ist hier ein Versuchsdurchlauf von 5 min mit nicht-gefärbten Thrombozyten dargestellt (graue Linie). **B** zeigt die Kurven aus **A** in einem versetzten Histogramm. In der Tabelle wird darüber hinaus die Entwicklung des geometrischen Mittelwertes der Fluoreszenzintensität (Geometric Mean: GRN-B-ALin) der jeweiligen Probezellen dargestellt. Der Count gibt die Anzahl der in dieser Kurve dargestellten Zellen an. Nach kurzen Inkubationszeiten von 5 und 15 min wiesen nur wenige Tumorzellen einen durch Schulter-Bildung sichtbaren Fluoreszenzzuwachs auf. Später war ein peak shift und damit die Beteiligung des Großteils der Tumorzellen zu beobachten. Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativ ausgewählten Experiments der Versuchsreihe mit A549-Tumorzellen mit insgesamt  $N = 3$  und  $n = 8$ . Unter Berücksichtigung aller Replikate zeigte sich im gepaarten t-Test, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, ein signifikanter Zuwachs der mittleren Fluoreszenzintensität zu allen gemessenen Zeitpunkten. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle; \*\*  $p < 0,01$  vs. Kontrolle; \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

Bei jedem einzelnen Versuchsdurchlauf wurde zu jeder Inkubationszeit dem Inkubationsansatz eine Kontrolle mit ungefärbten Thrombozyten vorausgeschickt. Diese Kontrolle gestattete die Festlegung eines Fluoreszenz-Grenzwertes, der den Zellen mit höherer Fluoreszenzintensität die Interaktion mit mindestens einem PKH-67-gefärbten Thrombozyten bescheinigte. So konnte für jeden Versuchsdurchlauf der Anteil dieser *positiven* Zellen an der Gesamtpopulation bestimmt werden. Aus der wiederholten Durchführung der Versuchsreihe ergab sich, dass durchschnittlich  $23 \pm 10\%$  der A549-Tumorzellen bereits nach 5 Minuten *positiv* waren. Dieser Anteil stieg im zeitlichen Verlauf in nahezu sigmoidaler Form an, sodass nach 15 Minuten  $27 \pm 8\%$ , nach 30 Minuten  $56 \pm 9\%$  und nach 45 Minuten  $79 \pm 8\%$  der Tumorzellen ein *positives* Ergebnis aufwiesen (Abbildung 9).

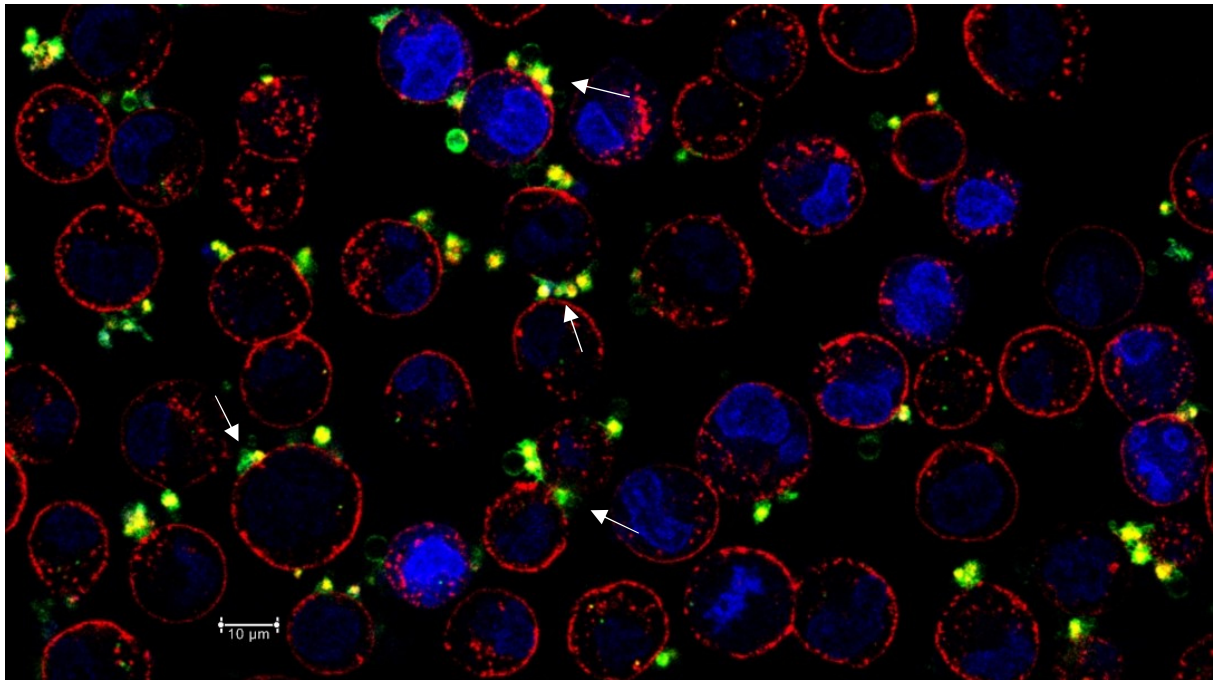


**Abbildung 9: Zeitabhängiger Zuwachs positiver A549-Zellen unter Fließbedingungen.** Dargestellt sind die Mittelwerte aller gemessenen Anteile positiver Zellen nach 5-, 15-, 30- und 45-minütiger Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten im Schlauchsystem. Der Anteil positiver Zellen stieg im zeitlichen Verlauf von  $23 \pm 10\%$  (5 min) auf  $79 \pm 8\%$  (45 min). Die durch Spline-Interpolation erzeugte Kurve zeigt einen nahezu sigmoidalen Verlauf.  $N = 3$ ,  $n = 8$ .

Zur besseren Beurteilung der zugrundeliegenden Interaktionsmuster zwischen Tumorzellen und Thrombozyten wurden Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop bei 63-facher Vergrößerung erstellt. Hier lassen sich durch den Einsatz verschiedener Farbstoffe Zellstrukturen gezielt darstellen. Durch das Erzeugen optischer Schnittbilder ist dabei ihre räumliche Anordnung sicher nachzuvollziehen. Die Tumorzellen wurden dazu nach erfolgter Schlauchpassage noch vor ihrer Fixierung an der Membran mit TRITC-WGA und anschließend am Zellkern mit DAPI angefärbt. Durch verschiedene Waschschrte konnten überschüssige Thrombozyten entfernt und so die Beurteilung der Tumorzellen verbessert werden.

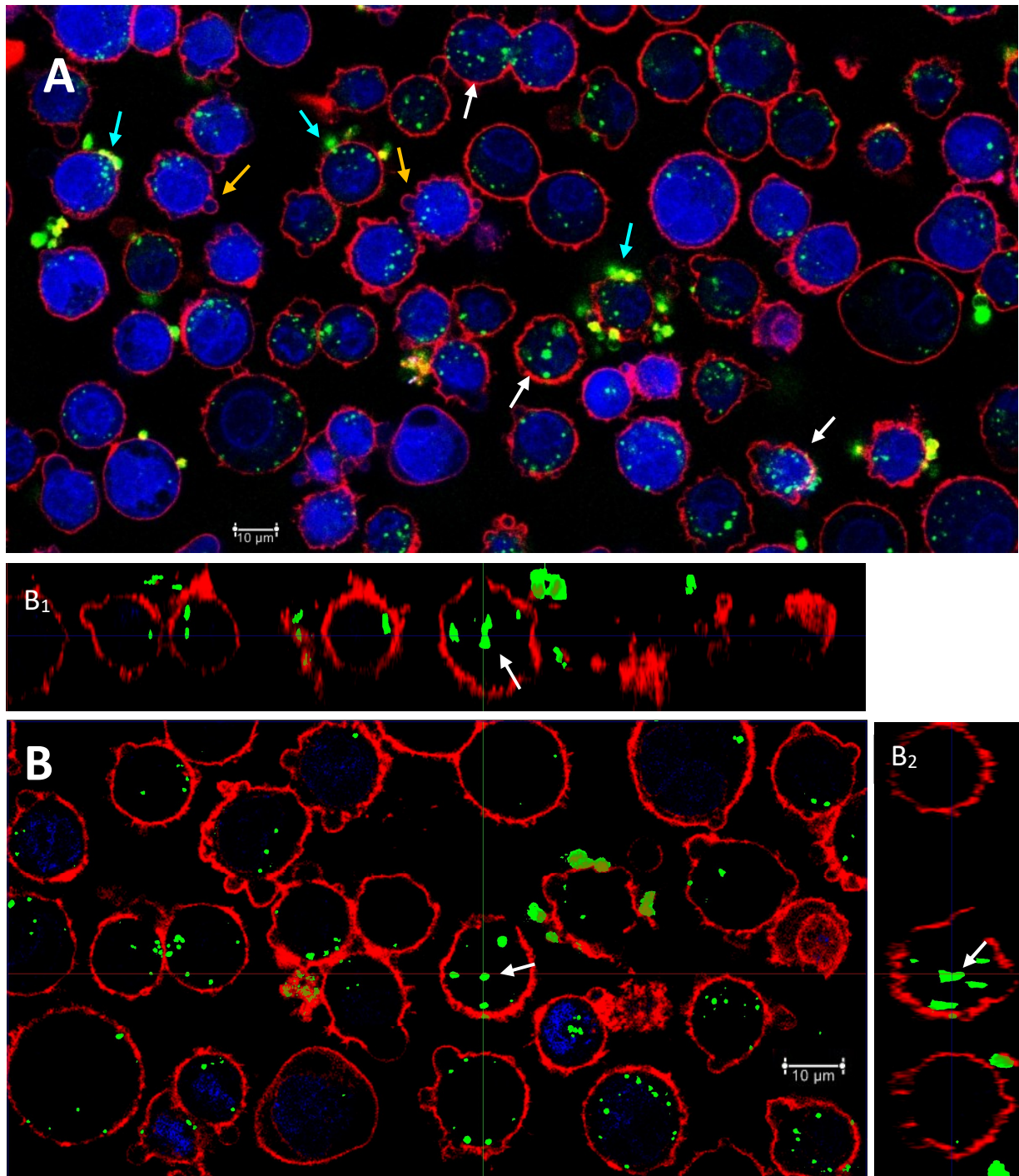
In Abbildung 10 und 11 stellen sich die Tumorzellen rund und damit nicht adhäsiv dar. Ihre Zellmembran (rot) und ihr Zellkern (blau) lassen sich gut voneinander abgrenzen. Die deutlich kleineren Thrombozyten weisen durch PKH-67 eine grüne Färbung auf. Es zeigte sich, dass zahlreiche Thrombozyten nach der kurzen Inkubationszeit von 5 Minuten äußerlich an den Tumorzellen adhärirten. Die damit einhergehenden Überlagerungen der Membran-Farbstoffe stellen sich gelblich dar (Abbildung 10).





*Abbildung 10: Interaktionsmuster zwischen Thrombozyten und A549-Tumorzellen nach 5-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen. Die Zellmembran der Tumorzellen wurde nach der Schlauchpassage mit TRITC-WGA (rot) und ihre Kerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Färbung der Thrombozyten mit PKH-67 (grün) fand bereits vor Versuchsbeginn statt. Die vorliegende Aufnahme erfolgte unter dem Konfokalmikroskop mit einem 63x Ölimmersions-Objektiv in einer X-Y-Schnittebene. Es zeigten sich vereinzelt an Tumorzellen adhärente Thrombozyten (weiße Pfeile).*

Anders waren nach 45-minütiger Inkubation neben den äußerlich adhärenen Thrombozyten bei einem Großteil der Tumorzellen auch grün fluoreszierende Partikel innerhalb des Tumorzell-Zytosols sichtbar (Abbildung 11, A). Die räumliche Position dieser Partikel wurde durch eine 3D-Darstellung mit verschiedenen Schnittebenen sicher im Zytosol identifiziert (Abbildung 11, B). Dabei scheinen einige adhärenente Thrombozyten mit der Tumorzellmembran zu verschmelzen beziehungsweise diese zu durchdringen. Darüber hinaus zeigten einige Tumorzellen Ausbeulungen an ihrer Membran (Abbildung 11, A), die nach 5 Minuten noch nicht zu beobachten waren (vgl. Abbildung 10).

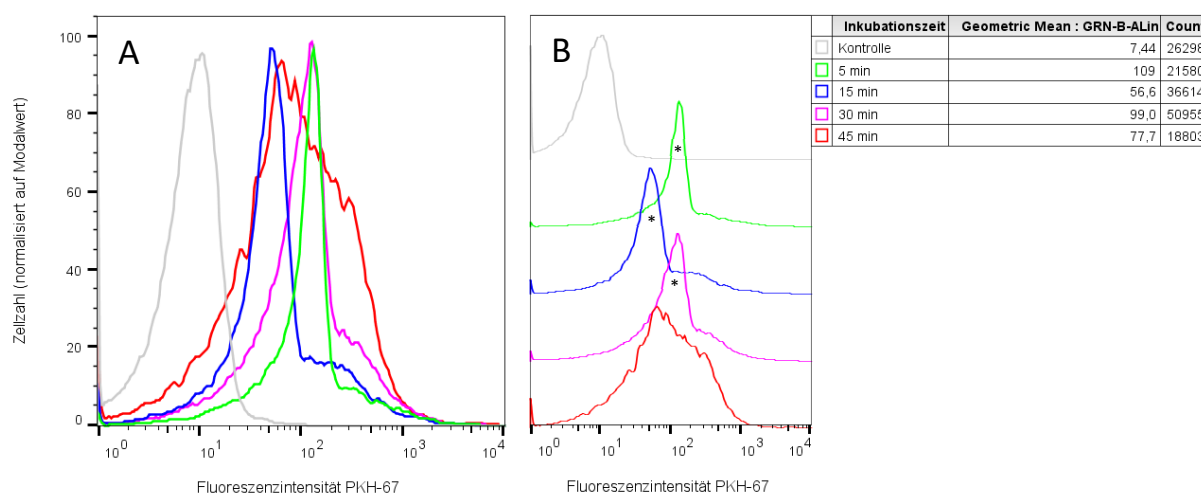


**Abbildung 11: Interaktionsmuster zwischen Thrombozyten und A549-Tumorzellen nach 45-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.** Die Zellmembran der Tumorzellen wurde nach der Schlauchpassage mit TRITC-WGA (rot) und ihre Kerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Färbung der Thrombozyten mit PKH-67 (grün) fand bereits vor Versuchsbeginn statt. Die vorliegende Aufnahme erfolgte unter dem Konfokalmikroskop mit einem 63x Ölimmersions-Objektiv in einer X-Y-Schnittebene (A) und als 3D-Darstellung (B: X-Y-Schnittebene; B<sub>1</sub>: X-Z-Schnittebene; B<sub>2</sub>: Y-Z-Schnittebene). A: Neben den äußerlich adhärenenten Thrombozyten scheinen einige mit der Tumorzellmembran zu verschmelzen oder diese zu durchdringen (aquamarine Pfeile). Dabei sind grün fluoreszierende Partikel im Inneren der Tumorzellen sichtbar (weiße Pfeile). Darüber hinaus zeigen sich Ausbeulungen in der Tumorzellmembran (orangefarbene Pfeile). B: Aus der 3D-Darstellung wird ersichtlich, dass sich die grünen Partikel innerhalb des Tumorzell-Zytosols befanden (weiße Pfeile). Es handelt sich bei dieser Darstellung um einen Ausschnitt aus A. B<sub>1</sub>: Die X-Z-Schnittebene verläuft entlang der roten Linie in B und B<sub>1</sub>. B<sub>2</sub>: Die Y-Z-Schnittebene verläuft entlang der grünen Linie in B und B<sub>1</sub>. Die weißen Pfeile zeigen also auf denselben Partikel aus unterschiedlichen Perspektiven.

### III.2 Die Interaktion von Tumorstammzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Unterschiede zwischen differenzierten Tumorzellen und solchen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Interaktion mit Thrombozyten unter Fließbedingungen zu beleuchten. CSCs konnten aus einer A549-Population mit Hilfe des *Sphere-formation Assays* isoliert werden. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte analog zu der von differenzierten A549-Zellen.

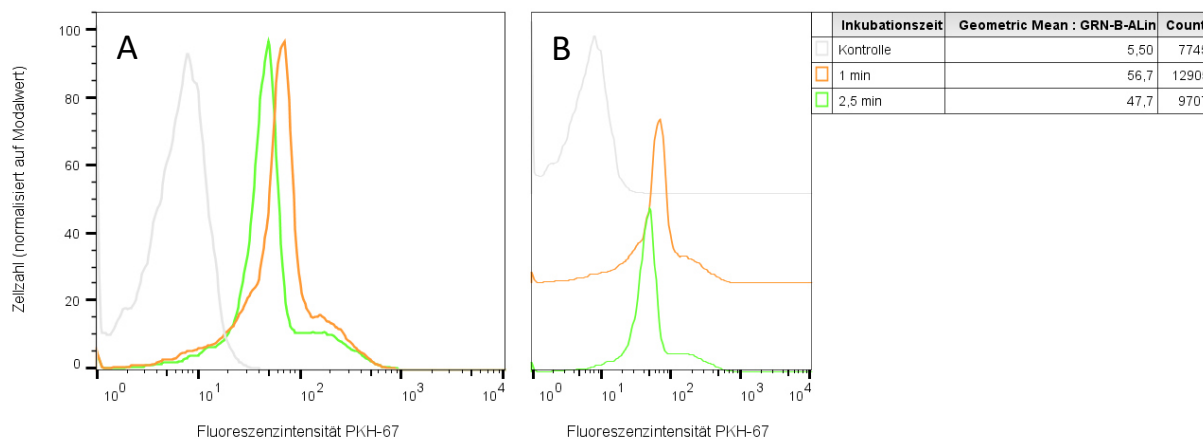
Es konnte beobachtet werden, dass CSCs bereits nach 5-minütiger Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten einen – im Vergleich zur Kontrolle – signifikanten Fluoreszenzzuwachs erfahren hatten. Hierbei war die Beteiligung aller CSCs zu beobachten. Somit zeigt sich in Abbildung 12 bereits nach 5 Minuten Inkubation anstelle einer *Schulter-Bildung* ein deutlicher *peak shift*. Im weiteren zeitlichen Verlauf ist neben erheblichen Schwankungen ein Rückgang der MFI zu beobachten. Dabei fiel auf, dass insbesondere nach 45-minütiger Inkubation die Zellen eine breitere Streuung ihrer Fluoreszenzintensität zeigten. Auch die Anzahl der im Durchflusszytometer erfassten Zellen unterlag starken Schwankungen, sodass nach 45 Minuten nur 18.800 der ursprünglich 100.000 zugeführten Zellen nachweisbar waren.



**Abbildung 12: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von Tumorstammzellen nach der Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen.** Als Kontrolle ist hier ein Versuchsdurchlauf von 5 min mit nicht-gefärbten Thrombozyten dargestellt (graue Linie). **B** zeigt die Kurven aus **A** in einem versetzten Histogramm. In der Tabelle wird darüber hinaus die Entwicklung des geometrischen Mittelwertes der Fluoreszenzintensität (Geometric Mean: GRN-B-ALin) der jeweiligen Probezellen dargestellt. Der Count gibt die Anzahl der in dieser Kurve dargestellten Zellen an. Es zeigte sich bereits nach 5-minütiger Inkubation ein deutlicher Fluoreszenzanstieg bei allen Tumorstammzellen in Form eines *peak shifts*. Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativ ausgewählten Experiments der Versuchsreihe mit CSCs mit insgesamt  $N = 3$  und  $n = 7$ . Unter Berücksichtigung aller Replikate zeigte sich im gepaarten *t*-Test, verglichen mit der jeweiligen Kontrolle, ein signifikanter Zuwachs der mittleren Fluoreszenzintensität nach 5, 15 und 30 min. \*  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

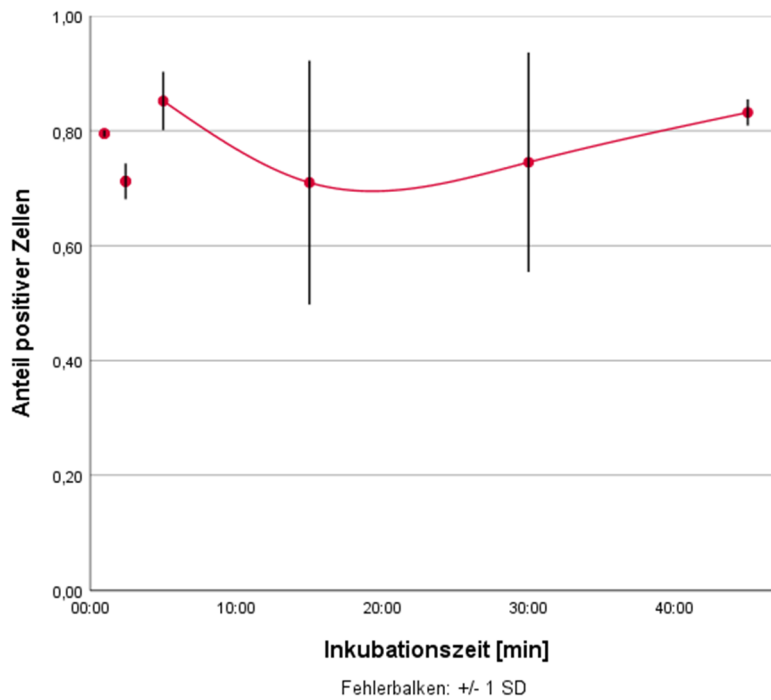
Zur weiteren Eingrenzung der zeitlichen Abfolgen im Interaktionsmuster der CSCs mit Thrombozyten wurde eine Versuchsreihe mit kürzeren Schlauchstücken und demnach kürzeren Inkubationszeiten durchgeführt. Hierbei war zu beobachten, dass auch nach nur 1-minütiger Inkubation bereits ein Großteil der CSCs einen deutlichen Fluoreszenzzuwachs erfahren hatten, was sich in Abbildung 13 als *peak shift* darstellt. Die längere Inkubationszeit von 2,5 Minuten zeigte hingegen einen Rückgang der mittleren

Fluoreszenzintensität und damit auch eine unter Berücksichtigung der logarithmischen Skala deutliche Linksverschiebung des *peaks*. Dabei fällt auf, dass die MFIs nach 1 und 2,5 Minuten deutlich geringer ausfällt als nach 5-minütiger Inkubation (vgl. Tabellen aus Abbildung 12 und 13). Statistische Tests waren an dieser Stelle aufgrund des kleinen n nicht möglich.



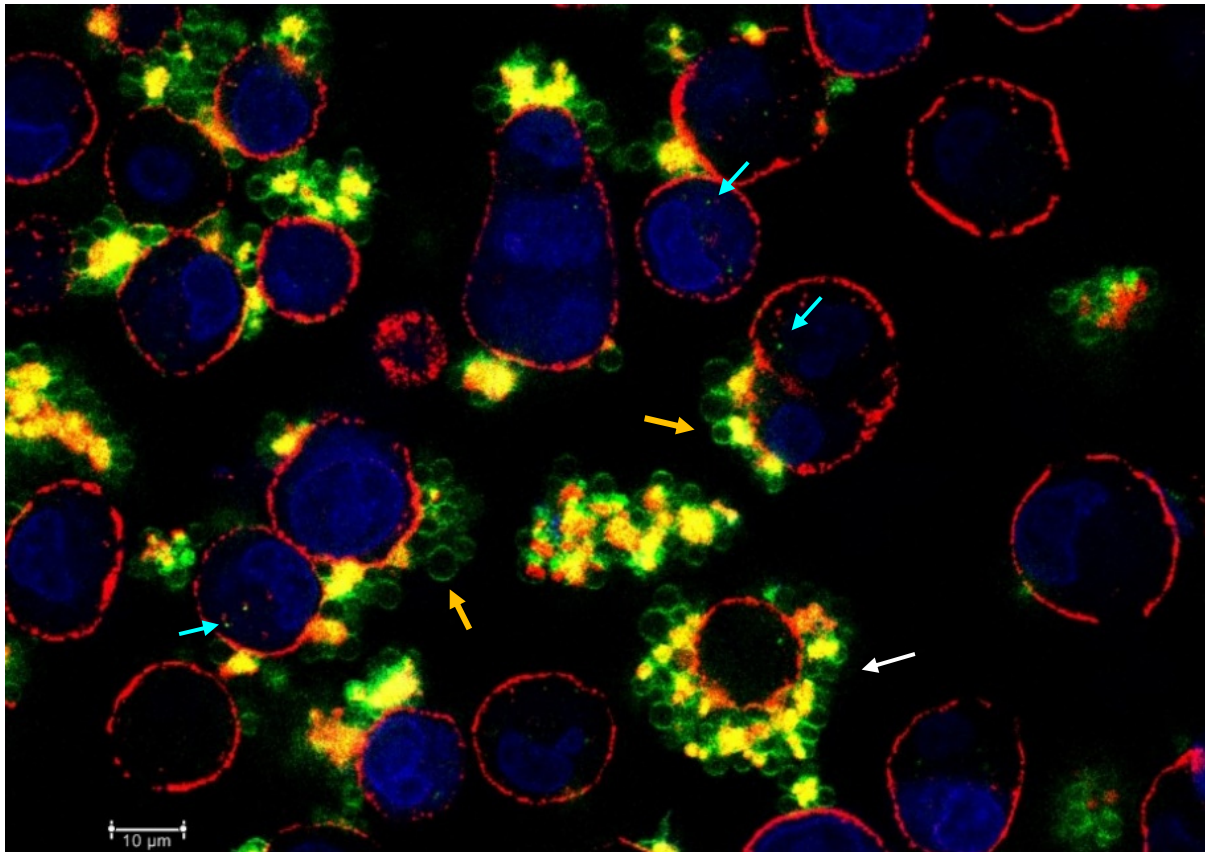
**Abbildung 13: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von Tumorstammzellen nach 1 und 2,5-minütiger Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen.** Als Kontrolle ist hier ein Versuchsdurchlauf von 1 min mit nicht-gefärbten Thrombozyten dargestellt (graue Linie). **B** zeigt die Kurven aus **A** in einem versetzten Histogramm. In der Tabelle wird darüber hinaus die Entwicklung des geometrischen Mittelwertes der Fluoreszenzintensität (Geometric Mean: GRN-B-ALin) der jeweiligen Probezellen dargestellt. Der Count gibt die Anzahl der in dieser Kurve dargestellten Zellen an. Es zeigte sich bereits nach 1-minütiger Inkubation ein deutlicher Fluoreszenzanstieg bei den Tumorstammzellen. Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativ ausgewählten Experiments der Versuchsreihe mit CSCs mit insgesamt  $N = 1$ ,  $n = 2$ .

Nach der Festlegung der aus den entsprechenden Kontrollen hervorgehenden Grenzwerte ergab sich der Anteil *positiver* CSCs über den gesamten zeitlichen Verlauf. So zeigten nach 5-minütiger Inkubation  $85 \pm 5\%$ , nach 15 Minuten  $71 \pm 21\%$ , nach 30 Minuten  $74 \pm 19\%$  und nach 45 Minuten  $83 \pm 2\%$  der CSCs ein *positives* Ergebnis. Insbesondere in den Zwischenmesswerten von 15 und 30 Minuten waren dabei große Schwankungen zu beobachten (Abbildung 14). Die Versuchsdurchführungen mit kürzeren Schlauchstücken zeigten ebenfalls bereits nach 1-minütiger Inkubation einen Anteil *positiver* Zellen von  $80 \pm 1\%$  und nach 2,5 Minuten eine Abnahme auf  $71 \pm 3\%$ .



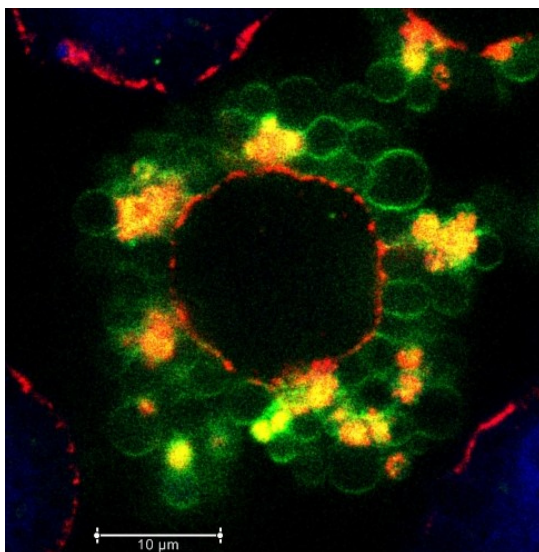
**Abbildung 14: Zeitabhängiger Zuwachs positiver Tumorstammzellen (CSCs) unter Fließbedingungen.** Dargestellt sind die mittleren Anteile positiver Zellen nach entsprechender Inkubationszeit mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten im Schlauchsystem. Die Werte der Zeitreihe von 5 bis 45 min zeigten insbesondere bei 15 und 30 min starke Schwankungen, blieben ansonsten aber auf einem hohen Niveau von  $85 \pm 5\%$  (5 min) und  $83 \pm 2\%$  (45 min).  $N = 3$ ,  $n = 7$ . Die Messwerte nach Inkubationszeiten von 1 und 2,5 min waren vergleichbar hoch.  $N = 1$ ,  $n = 2$ . Die durch Spline-Interpolation erzeugte Kurve berücksichtigt diese letzten Werte aufgrund der starken Schwankungen und des kleinen  $n$  nicht.

Die Färbung der CSCs vor ihrer Untersuchung unter dem Konfokalmikroskop erfolgte analog zu der von differenzierten A549-Zellen mit TRITC-WGA und DAPI. Dabei zeigten auch sie nach 5-minütiger Inkubation im Schlauchsystem nahezu ausschließlich äußerlich anheftende Thrombozyten. Allerdings traten diese nicht vereinzelt, sondern in großen Agglomeraten auf. Dabei fiel auf, dass ebenfalls CSCs durch diese Agglomerate zu Zellhaufen untereinander verbunden wurden. An den Kontaktstellen der beiden Zelltypen ist dabei durch die Farbstoffüberlagerung eine Gelbfärbung zu beobachten. Grün-fluoreszierende Partikel innerhalb der Tumorzellen zeigten sich anders als bei regulären A549-Tumorzellen nach 45-minütiger Schlauchpassage (vgl. Abbildung 11) hier nur andeutungsweise (Abbildung 15).



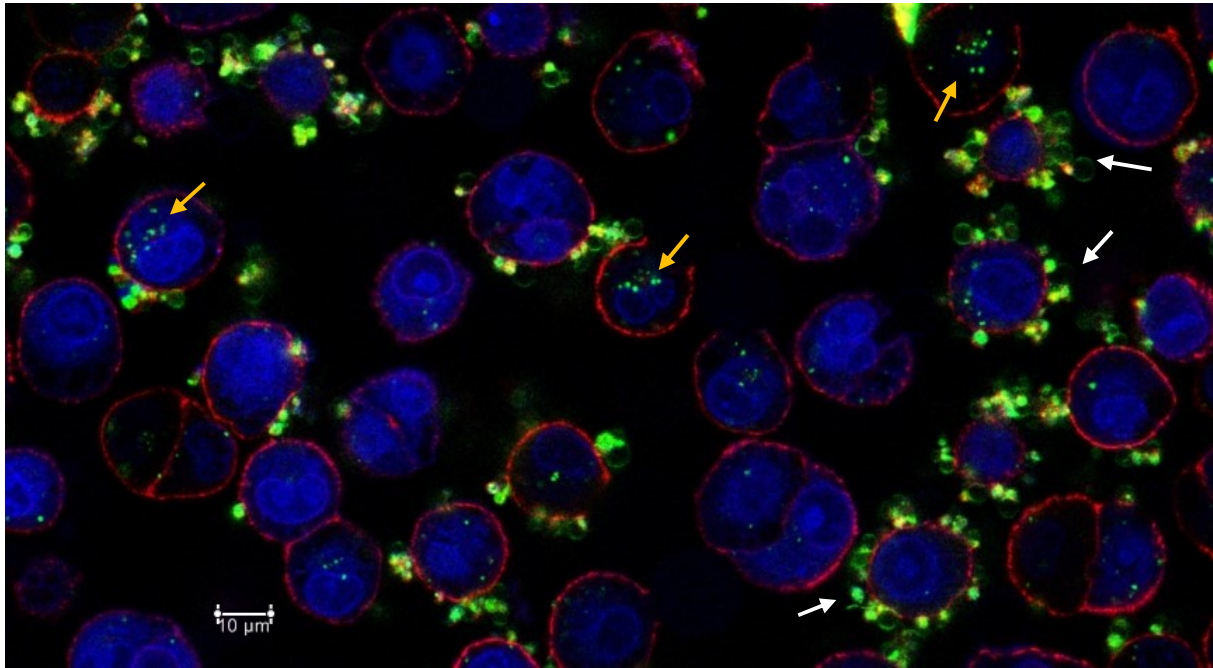
**Abbildung 15: Interaktionsmuster zwischen A549-Tumorstammzellen (CSCs) nach 5-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen.** Die Zellmembran der CSCs wurde nach erfolgter Schlauchpassage mit TRITC-WGA (rot) und ihre Kerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Färbung der Thrombozyten mit PKH-67 (grün) fand bereits vor Versuchsbeginn statt. Die vorliegende Aufnahme erfolgte unter dem Konfokalmikroskop mit einem 63x Ölimmersions-Objektiv in einer X-Y-Schnittebene. Die CSCs zeigten große Thrombozyten-Agglomerate, die sie nahezu vollständig umschlossen (weißer Pfeil). Die Thrombozyten wiesen dabei teilweise ein vesikuläres Aussehen auf (orangene Pfeile). Innerhalb der Agglomerate fallen gelblich und rötlich verfärbte Bereiche auf. Darüber hinaus finden sich im Tumorzell-Zytosol grün-fluoreszierende Partikel (aquamarine Pfeile).

Diese Thrombozyten-Agglomerate erreichten teilweise eine Größe, die es ihnen ermöglichte, die entsprechende CSC vollständig zu ummanteln (Abbildung 16).



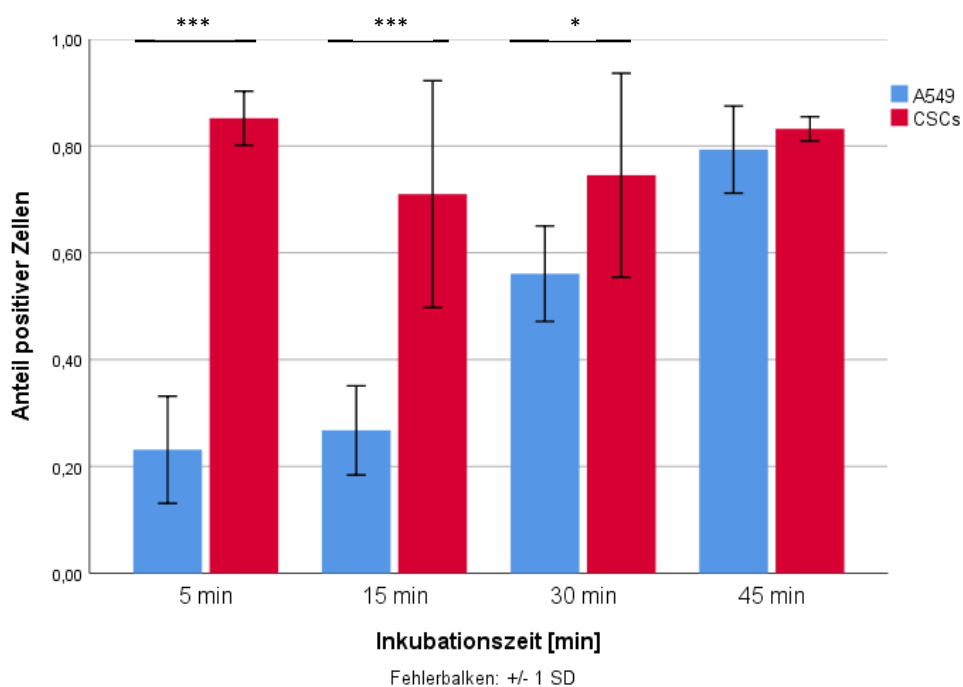
**Abbildung 16: Aufnahme einer vollständig von Thrombozyten umschlossenen Tumorstammzelle (CSC).** Die Versuchszellen wurden nach erfolgter Schlauchpassage mit TRITC-WGA (rot) und DAPI (blau) angefärbt und in einer 1%igen PFA-Lösung fixiert. Die vorliegende Aufnahme erfolgte unter dem Konfokalmikroskop mit einem 63x Ölimmersions-Objektiv in einer X-Y-Schnittebene. Die Abbildung zeigt eine CSC nach 5-minütiger Inkubation mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen. Die CSC weist zahlreiche adhärenente Thrombozyten auf, die ihrerseits ein vesikuläres Aussehen zeigen und die Tumorzelle vollständig umschließen.

Hierbei fiel auf, dass viele der Thrombozyten ein vesikuläres Aussehen offenbarten und damit hohl erschienen (Abbildung 15 und 16). Dieses Phänomen war auch nach 45-minütiger Inkubation der CSCs mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten unter Fließbedingungen teilweise zu beobachten. Hier zeigten sich bei den CSCs sowohl adhärenente Thrombozyten als auch grün-fluoreszierende Partikel in ihrem Zytosol (Abbildung 17). Waren einige CSCs auch nahezu vollständig von Thrombozyten umgeben, konnten doch die großen Thrombozyten-Agglomerate aus Abbildung 15 und 16 hier nicht beobachtet werden.



**Abbildung 17:** Interaktionsmuster zwischen A549-Tumorstammzellen (CSCs) nach 45-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen. Die Zellmembran der CSCs wurde nach erfolgter Schlauchpassage mit TRITC-WGA (rot) und ihre Kerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Färbung der Thrombozyten mit PKH-67 (grün) fand bereits vor Versuchsbeginn statt. Die vorliegende Aufnahme erfolgte unter dem Konfokalmikroskop mit einem 63x Ölimmersions-Objektiv in einer X-Y-Schnittebene. Die CSCs zeigten sowohl an ihrer Zellmembran adhärenente Thrombozyten (weiße Pfeile) als auch grüne Fluoreszenzpartikel in ihrem Zytosol (orangefarbene Pfeile).

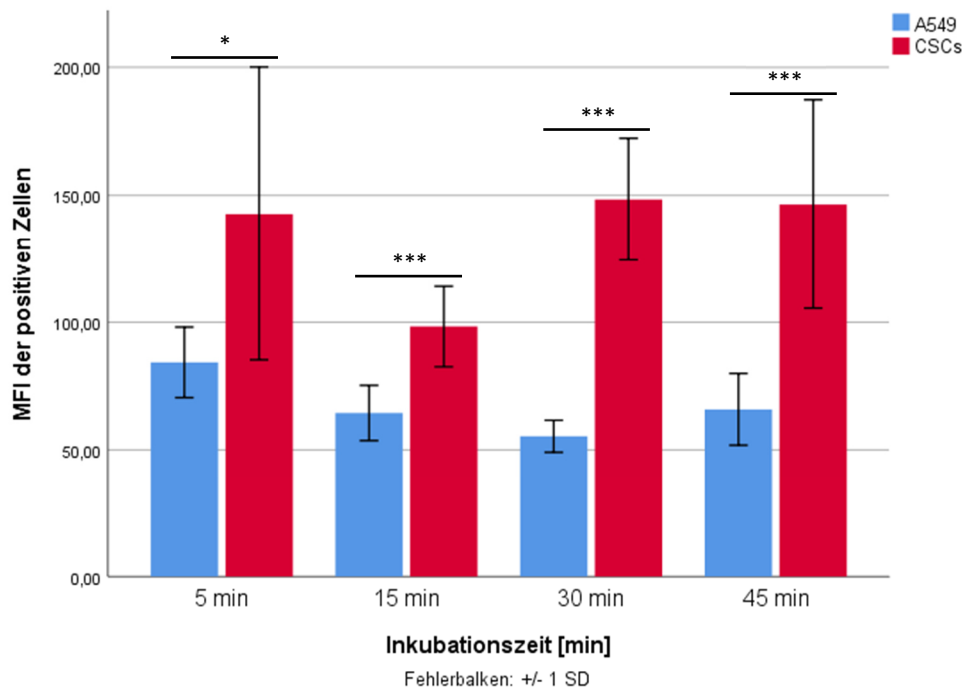
Abbildung 18 bietet einen direkten Vergleich zwischen den im Durchflusszytometer bestimmten Anteilen positiver Zellen bei differenzierten A549-Zellen und CSCs (vgl. Abbildung 9 und 14). Innerhalb kürzerer Inkubationszeiten von 5, 15 und 30 Minuten traten deutlich mehr CSCs in Kontakt mit Thrombozyten als differenzierte A549-Tumorzellen. Somit war hier ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellgruppen zu beobachten. Nach 45-minütiger Inkubation stieg der Anteil positiver A549-Zellen derart an, dass kein signifikanter Unterschied zu den CSCs mehr festzustellen war. So sind nach 45 Minuten ca. 80% sowohl der regulären A549-Tumorzellen als auch der A549-Stammzellen mit mindestens einem Thrombozyten in Wechselwirkung getreten.



*Abbildung 18: Vergleich von A549-Tumorzellen und vorselektierten A549-Tumorstammzellen (CSCs) hinsichtlich ihrer Interaktion mit Thrombozyten nach 5-, 15-, 30- und 45-minütiger Inkubation unter Fließbedingungen. Dieses Säulendiagramm stellt die Zusammenfassung aus den Abbildungen 9 und 14 direkt nebeneinander. Dargestellt sind die Mittelwerte der Anteile der Zellen, die nach ihrer Schlauchpassage mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten einen relevanten Fluoreszenzzuwachs erfahren haben. Dabei waren im ungepaarten t-Test signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellgruppen nach 5, 15, und 30 min nachzuweisen.  $N = 3$ ,  $n = 8$  (A549);  $N = 3$ ,  $n = 7$  (CSCs); \* $p < 0,5$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .*

Zur besseren Zuordnung dieser in Abbildung 18 bestimmten *positiven* Zellen wurde ihre MFI erfasst und in Abbildung 19 vergleichend nebeneinander gestellt. Hierdurch sollten Rückschlüsse auf die Anzahl adhärrierender Thrombozyten beziehungsweise der aufgenommenen fluoreszierenden Partikel gewonnen werden. Dabei zeigte sich, dass die positiven CSCs zu jedem gemessenen Zeitpunkt eine signifikant höhere MFI aufwiesen als die differenzierten A549-Tumorzellen. Nichtsdestotrotz war diese bei den CSCs starken Schwankungen unterworfen. Interessanterweise zeigte die MFI der positiven A549-Tumorzellen weniger starke Schwankungen, sondern vielmehr einen leichten Rückgang im zeitlichen Verlauf.



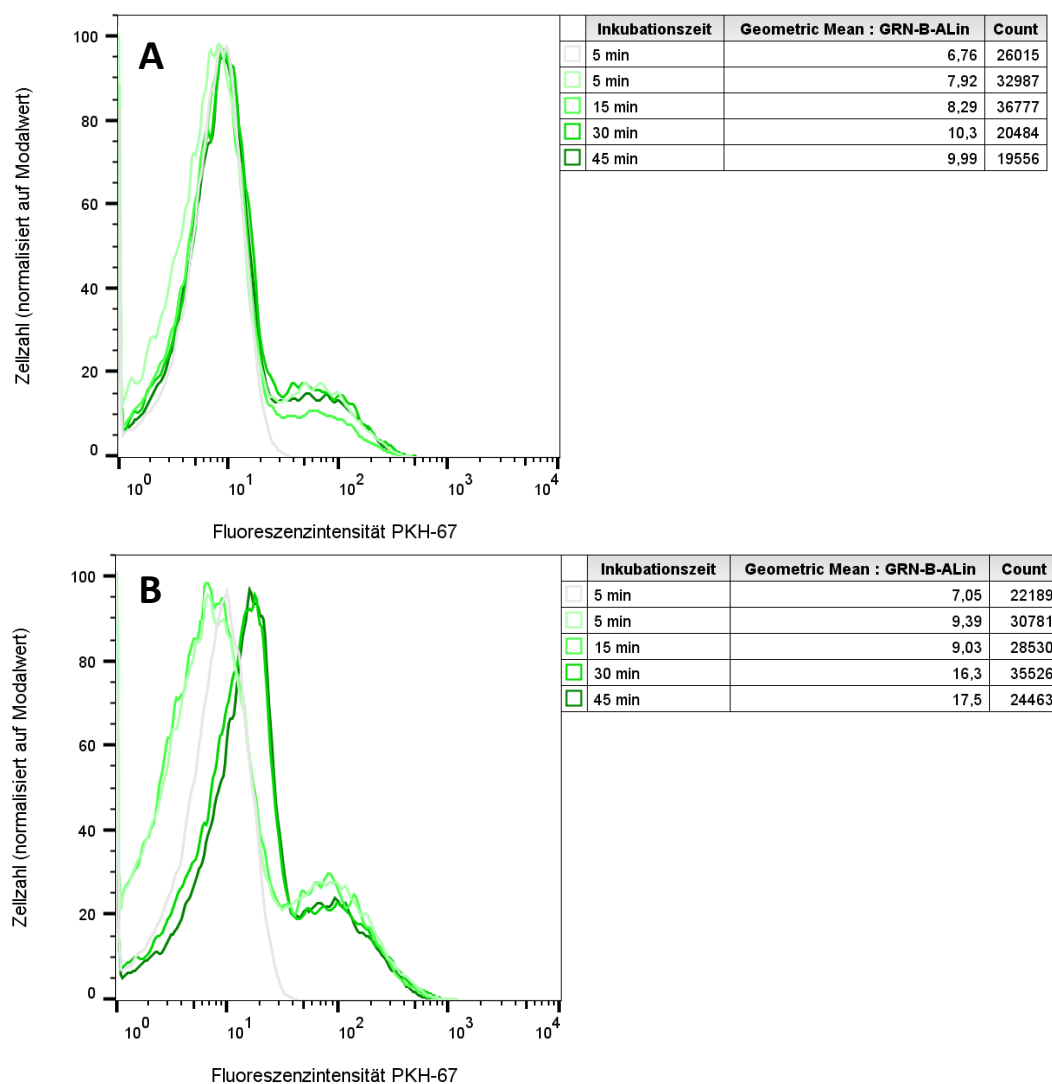


**Abbildung 19:** Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der positiven A549-Tumorzellen und CSCs. Die in dieser Arbeit als positiv bezeichneten Zellen wurden anhand der entsprechenden Kontrolle festgelegt. Für jede Versuchszellgruppe wurde die MFI mit Hilfe des geometrischen Mittelwertes bestimmt. In dieser Abbildung wird dabei das arithmetische Mittel aller biologischen und technischen Replikate dargestellt. Dabei waren im ungepaarten *t*-Test signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellgruppen zu jeder Versuchszeit nachzuweisen.  $N = 3$ ,  $n = 8$  (A549);  $N = 3$ ,  $n = 7$  (CSCs); \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$

### III.3 Der Einfluss von Tinzaparin auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des niedermolekularen Heparins Tinzaparin auf die Interaktion zwischen A549-Tumorzellen beziehungsweise ihrer Stammzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen untersucht. Dazu wurden die Thrombozyten vor Versuchsbeginn 30 Minuten lang mit dem Wirkstoff in der klinisch relevanten Konzentration von 1 U/ml inkubiert (165). Darüber hinaus wurde während der Schlauchpassage dieselbe Wirkstoffkonzentration aufrechterhalten. So durchliefen die Versuchszellen – wie in den bereits beschriebenen Experimenten – ein Schlauchsystem bei konstanter Fließgeschwindigkeit von 9 mm/s für 5, 15, 30 und 45 min. Anschließend wurden sie fixiert und im Durchflusszytometer untersucht. Abbildung 20 stellt die Fluoreszenzintensität von differenzierten A549-Zellen (A) und ihren CSCs (B) nach erfolgter Schlauchpassage mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten in Anwesenheit von Tinzaparin gegenüber. Dabei zeigt die graue Linie die mit 5-minütiger Inkubationszeit und ungefärbten Thrombozyten erstellte Kontrolle und damit die Eigenfluoreszenz der Tumorzellen. Die Entwicklung der Fluoreszenzintensität im Zeitverlauf ist in den Kurven von hell- (5 min) nach dunkelgrün (45 min) wiedergegeben. Der Großteil der A549-Tumorzellen zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Anstieg der eigenen Fluoreszenzintensität und damit, anders als in Abwesenheit von Tinzaparin (vgl. Abbildung 8), auch keinerlei beständigen Kontakt zu PKH-67-gefärbten Thrombozyten. Ein *peak shift* blieb also aus.

Lediglich eine kleine Subpopulation war dazu in der Lage und offenbarte sich durch die Bildung einer *Schulter* (Abbildung 20, A). Auch bei CSCs war ein deutlich reduziertes Interaktionsverhalten mit den Thrombozyten unter Tinzaparin, verglichen mit den Versuchen ohne Tinzaparin (s. Abbildung 12), zu beobachten. Neben der im Vergleich zu den A549-Tumorzellen stärker ausgeprägten *Schulter*-Bildung durch eine kleine Subgruppe war im zeitlichen Verlauf nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität bei der Mehrheit der CSCs in Form eines *peak shifts* zu beobachten (Abbildung 20, B). Im Einklang zu diesen Beobachtungen fällt auch die MFI der hier dargestellten Versuchszellen deutlich geringer aus (Tabellen in Abbildung 20 A und B) als es die Untersuchungen ohne Tinzaparin zeigten (vgl. Abbildung 8 und 12).

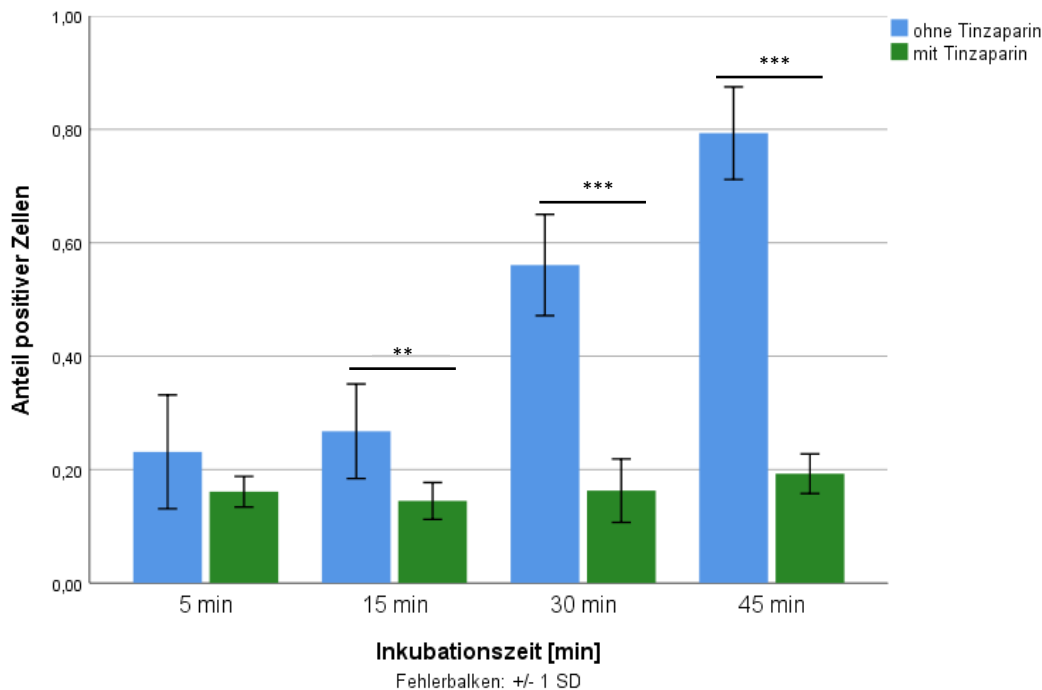


**Abbildung 20: Zeitabhängiger Fluoreszenzzuwachs von A549-Tumorzellen (A) und Tumorstammzellen (B) nach der Fließinkubation mit Thrombozyten unter dem Einfluss von Tinzaparin.** Es wurde eine Zeitreihe von 5, 15, 30 und 45 min (hell- nach dunkelgrün) mit einer repräsentativen Kontrolle nach 5 min (graue Linie) erstellt. In der Tabelle wird darüber hinaus die Entwicklung des geometrischen Mittelwertes der Fluoreszenzintensität (Geometric Mean: GRN-B-ALin) der jeweiligen Probezellen dargestellt. Der Count gibt die Anzahl der in dieser Kurve dargestellten Zellen an. **A:** Der Großteil der A549-Tumorzellen zeigte an keinem Punkt der Zeitreihe einen Fluoreszenzzuwachs. Lediglich eine kleine Untergruppe wies bereits nach 5-minütiger Inkubation eine erhöhte Fluoreszenzintensität auf. **B:** Auch bei den CSCs zeigte sich eine kleine Subgruppe, die bereits nach 5-minütiger Inkubation einen Fluoreszenzzuwachs erfahren hatte. Darüber hinaus war ein leichter peak shift im zeitlichen Verlauf zu beobachten. Diese Abbildung zeigt die Ergebnisse eines jeweils repräsentativ ausgewählten Experiments der Versuchsreihe mit A549-Tumorzellen ( $N = 3$ ,  $n = 7$ ) und CSCs ( $N = 4$ ,  $n = 10$ ) unter dem Einfluss von Tinzaparin.

Abbildung 21 ermöglicht den direkten Vergleich der Wechselwirkung zwischen A549-Tumorzellen und Thrombozyten unter dem Einfluss von Tinzaparin und ohne diesen. Der Anteil *positiver* Tumorzellen und damit derjenigen, die Kontakt zu mindestens einem Thrombozyten hatten, konnte unter Berücksichtigung ihrer Eigenfluoreszenz anhand der jeweiligen Kontrolle bestimmt werden. Ohne den Einfluss von Tinzaparin zeigten  $23 \pm 10\%$  nach 5-minütiger Inkubation im Schlauchsystem ein *positives* Ergebnis. Dieser Anteil stieg im zeitlichen Verlauf bis auf  $79 \pm 8\%$  nach 45 Minuten an (vgl. Abbildung 9). Demgegenüber hatten nach 5 Minuten nur  $16 \pm 2\%$  der Versuchszellen unter dem Einfluss von Tinzaparin mit den PKH-67-gefärbten Thrombozyten interagiert, wobei im Zeitverlauf

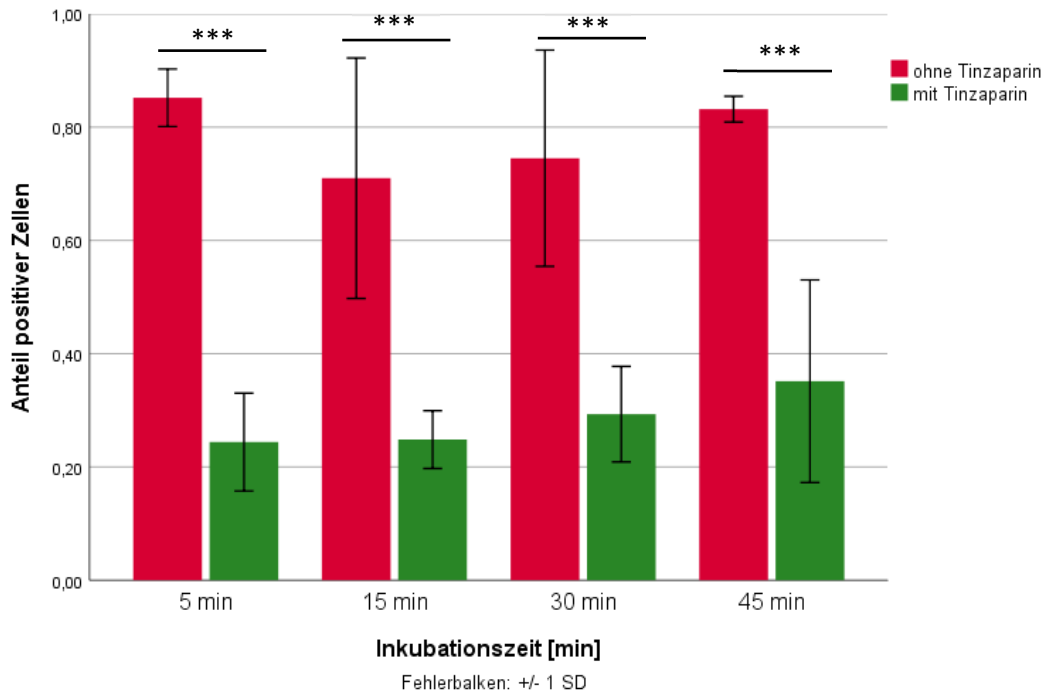
kein signifikanter Zuwachs zu beobachten war. Somit zeigten nach 15 Minuten  $14 \pm 3\%$ , nach 30 Minuten  $16 \pm 6\%$  und nach 45 Minuten  $19 \pm 3\%$  der Zellen ein *positives* Ergebnis (Abbildung 21).

War der Unterschied der beiden Versuchsgruppen nach 5-minütiger Inkubation nur gering, zeigte Tinzaparin ab 15 Minuten einen signifikant hemmenden Effekt auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Einfluss von Tinzaparin auf die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter Fließbedingungen.** Die Säulen geben die arithmetischen Mittelwerte der Anteile positiver Zellen aus allen Versuchsdurchläufen an. Dabei werden die Zellen unter dem Einfluss von Tinzaparin (grün) jenen ohne diesen (blau) im zeitlichen Verlauf gegenübergestellt. Durch Tinzaparin wurde die Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen reduziert, sodass nach 5-minütiger Inkubation  $16 \pm 2\%$  und nach 45 Minuten  $19 \pm 3\%$  ein positives Ergebnis zeigten. Dieser hemmende Effekt war im ungepaarten t-Test ab einer Inkubationszeit von 15 min signifikant. Der Zuwachs positiver Zellen im Zeitverlauf unter dem Einfluss von Tinzaparin war im ungepaarten t-Test hingegen nicht signifikant.  $N = 3$ ,  $n = 8$  (A549 ohne Tinzaparin);  $N = 3$ ,  $n = 7$  (A549 mit Tinzaparin);  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ .

Durch den Einsatz von Tinzaparin konnte ebenfalls die Wechselwirkung zwischen den im *Sphere-formation Assay* gewonnenen CSCs und Thrombozyten unter Fließbedingungen maßgeblich reduziert werden. So hatten nach 5-minütiger Inkubation im Schlauchsystem nur  $24 \pm 8\%$  der CSCs Kontakt zu mindestens einem Thrombozyten aufnehmen können. Dieser Anteil stieg im zeitlichen Verlauf nicht signifikant auf  $35 \pm 17\%$  nach 45 Minuten an. Dazwischen waren nach 15-minütiger Inkubation  $25 \pm 5\%$  und nach 30-minütiger Inkubation  $29 \pm 8\%$  der Zellen *positiv*. Der Unterschied zur Versuchsgruppe ohne Tinzaparin war an jedem Punkt der erstellten Zeitreihe signifikant (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Einfluss von Tinzaparin auf die Wechselwirkung zwischen Tumorstammzellen (CSCs) und Thrombozyten unter Fließbedingungen.** Die Grafik stellt die arithmetischen Mittelwerte der Anteile positiver CSCs im zeitlichen Verlauf unter dem Einfluss von Tinzaparin (grün) und ohne diesen (rot) gegenüber. Bei jeder Versuchszeit bewirkte Tinzaparin im ungepaarten t-Test eine signifikante Hemmung der CSC-Thrombozyten-Interaktion. Lag der Anteil positiver CSCs ohne den Einfluss von Tinzaparin nach 5-minütiger Inkubation durchschnittlich bei  $85 \pm 5\%$ , so wurde er unter diesem auf  $24 \pm 8\%$  reduziert. Nach 45-minütiger Inkubation stieg der Anteil positiver CSCs unter dem Einfluss von Tinzaparin auf  $35 \pm 17\%$  und damit im ungepaarten t-Test nicht signifikant an.  $N = 4$ ,  $n = 8$  (CSCs ohne Tinzaparin);  $N = 4$ ,  $n = 10$  (CSCs mit Tinzaparin);  $***p < 0,001$ .

## IV Diskussion

Krebserkrankungen zählen in westlichen Gesellschaften zu den häufigsten Todesursachen (166). Dabei geht das Vorliegen von Metastasen mit einer massiven Prognoseverschlechterung einher (3). Neben der Erforschung neuer therapeutischer Verfahren steht die Prävention der Metastasenbildung im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Die unterstützende Wirkung von Thrombozyten auf den Metastasierungsprozess konnte bereits im 19. Jahrhundert nachgewiesen und seitdem immer weiter beleuchtet werden. Die Interaktion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen ist vielseitig und bietet zahlreiche Angriffspunkte zur therapeutischen Intervention (9).

Ziel dieser Arbeit war es, die Wechselwirkung zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter physiologischen Fließbedingungen näher zu untersuchen. Des Weiteren sollten diesbezügliche Unterschiede zwischen differenzierten Tumorzellen und solchen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften beleuchtet werden. Letztere gelten als die Hauptakteure im Prozess der Metastasierung (122). Somit war ihr abweichendes Interaktionsprofil mit Thrombozyten denkbar und sollte näher beschrieben werden.

Es wurde ein Versuchsaufbau etabliert, in dem reguläre Tumorzellen oder CSC-Populationen gemeinsam mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten bei konstantem Fluss in einem Silikonschlauch inkubiert wurden. Durch den Einsatz mehrerer Schlauchstücke verschiedener Länge wurde eine Zeitreihe erstellt. Der Kontakt zwischen den beiden Zellgruppen konnte direkt in der Konfokalmikroskopie oder über den Fluoreszenzzuwachs der Tumorzellen im Durchflusszytometer nachgewiesen werden.

Thrombozyten verfügen über zahlreiche Oberflächenproteine, die ihnen die Bindung untereinander und an andere Zellen ermöglichen. Für die Interaktion zwischen Thrombozyten und Tumorzellen konnte bereits mehrfach das P-Selektin als entscheidendes Adhäsions-Protein identifiziert werden (72–75). In dieser Arbeit sollte durch die gezielte Hemmung von P-Selektin seine Rolle für die Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion unter Fließbedingungen untersucht werden. Dafür wurden die Thrombozyten vor Versuchsbeginn mit Tinzaparin, einem niedermolekularen Heparin, inkubiert.

### IV.1 Betrachtung der Methoden

#### IV.1.1 Das Schlauchmodell

Die Grundlage aller in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen bildete das verwendete Schlauchsystem. Zur Minimierung möglicher Wechselwirkungen zwischen den Versuchszellen und der Schlauchwand wurde Silikon in medizinischer Qualität als Schlauchmaterial gewählt. Obwohl in der Medizin häufig angewandt, zeigen Polymer-Verbindungen wie beispielsweise PVC eine erhöhte Tendenz zur Thrombozyten-Aktivierung (167). Silikonschläuche medizinischer Qualität versprechen bessere Resultate.

Es konnte gezeigt werden, dass sich viele der für die Metastasierung relevanten Schritte in den kleinen Arterien, Arteriolen und Kapillaren abspielen (162). Diese haben einen Durchmesser von wenigen Millimetern (vgl. Tabelle 10). Der Innendurchmesser der eingesetzten Silikonschläuche von 2,5 mm wurde entsprechend gewählt.

In den Arteriolen herrschen laminare Strömungsverhältnisse und ein konstanter Fluss (168). Bei der Etablierung dieser Methode wurden verschiedene Antriebssysteme ausprobiert. Die häufig eingesetzten peristaltischen Pumpen erzeugten einen pulsatilen Strom und kamen somit für diesen Versuchsaufbau nicht in Frage. Ein handelsüblicher Perfusor der Firma Braun konnte die Anforderungen am besten erfüllen und wurde bei allen in dieser Arbeit durchgeführten Versuche eingesetzt.

Dabei wurde der Inkubationsansatz durch eine Pufferlösung im Schlauch vorangetrieben. Um eine Durchmischung der beiden Flüssigkeiten zu vermeiden wurden Luftblasen vor und hinter dem Inkubationsansatz appliziert (vgl. Abbildung 6). Es ist nicht auszuschließen, dass es in unmittelbarer Nähe dieser Begrenzungen zu Turbulenzen kam. Nichtsdestotrotz lässt die langstreckige Ausbreitung des Inkubationsansatzes im Schlauch laminare Strömungsverhältnisse für die überwiegende Mehrheit der Versuchszellen annehmen.

Die physiologische Fließgeschwindigkeit im menschlichen Gefäßsystem variiert abschnittsweise zwischen 20 cm/s und 1 mm/s (168). Ein langsamer Fluss von wenigen Millimetern pro Sekunde, wie in den Arteriolen zu beobachten, begünstigt das Überleben und die Extravasation der CTCs (162). Somit sollten im verwendeten Schlauchmodell ähnliche Fließgeschwindigkeiten herrschen. Es zeigte sich jedoch, dass bei Geschwindigkeiten von 1 mm/s keine und bei 3 und 5 mm/s nur noch ein Bruchteil der zugeführten Tumorzellen nach der Schlauchpassage im Inkubationsansatz nachweisbar waren. Mit Hilfe von Fließgeschwindigkeiten  $\geq 9$  mm/s konnte dieses Phänomen beseitigt werden. Es ist denkbar, dass die CTCs unter zu langsamem Fluss dem Gesetz der Trägheit folgend auf den Boden Schlauches absanken und durch die Oberflächenspannung der folgenden Luftblase (vgl. Abbildung 6) zerstört wurden. Somit wurde für alle Versuchsreihen eine Fließgeschwindigkeit von 9 mm/s etabliert. Schnellere Flussraten zeigten keinen Vorteil und waren darüber hinaus wenig praktikabel. Durch den höheren Volumenfluss wäre ein häufiger Wechsel der Perfusor-Spritzen und damit ein als unphysiologisch zu bewertendes Stagnieren des Inkubationsansatzes im Schlauch notwendig gewesen.

Mit jedem Versuchsdurchlauf wurde eine Zeitreihe erstellt. Durch den Einsatz von Schlauchstücken verschiedener Länge konnten Inkubationszeiten von 5, 15, 30 und 45 min untersucht werden. Da ca. 85% der CTCs innerhalb der ersten Minuten im Blutkreislauf voraussichtlich zugrunde gehen (65), waren kurze Inkubationszeiten in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Nichtsdestotrotz konnten CTCs auch über zwei Stunden nach Entfernung des Primarius im Blut nachgewiesen werden (71), was die Relevanz längerer Inkubationszeiten unterstreicht.

## IV.1.2 Der Inkubationsansatz

### IV.1.2.1 Das Tumorzell-/Thrombozyten-Verhältnis

Genauere Angaben über die Anzahl der zeitgleich im Blut zirkulierenden Tumorzellen sind nur schwer zu finden. Butler und Kollegen konnten nachweisen, dass solide Mamma-Adenokarzinome innerhalb von 24h zwischen 3 und 4 Mio. Krebszellen je Gramm Tumormasse ins Blut freisetzen (169). In der Literatur werden geschätzte Werte von einer CTC auf 1 Milliarde normale Blutzellen (170) beziehungsweise 1 - 10 CTCs auf  $10^6$  -  $10^8$  weiße Blutzellen (171) angegeben, was ungefähr  $1 * 10^{-4}$  CTCs/ $\mu$ l entspricht. Basierend auf diesen Zahlen würde sich *in vivo* ein Verhältnis zwischen Tumorzellen und Thrombozyten von  $1:2,5 * 10^9$  ergeben. Da viele Tumorentitäten in der Lage sind, eine Thrombozytose zu induzieren, ist es durchaus denkbar, dass der Anteil an Thrombozyten in Krebspatienten sogar noch höher ausfällt (98,99,103,104). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass der direkte Kontakt dieser beiden Zellgruppen durch die anderen hämatologischen Zellen wie beispielsweise durch Erythrozyten (20 auf einen Thrombozyten) vermutlich eingeschränkt wird. In dieser Arbeit wurde dabei bewusst auf den Zusatz von Erythrozyten und anderen physiologisch vorkommenden Blutzellen verzichtet, da dies unter anderem die Auswertung im Durchflusszytometer durch die hohe Zellzahl und damit auch erhöhte Viskosität erschwert hätte. Auch die Aufnahmen im Konfokalmikroskop erlaubten in Abwesenheit anderer Zellen eine bessere Beurteilung der zu untersuchenden Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen.

Das Volumen des Inkubationsansatzes eines Versuchsdurchlaufes entsprach 2 ml, in die 100.000 Tumorzellen gegeben wurden, was ungefähr 50 Zellen/ $\mu$ l entspricht. Aufgrund der hohen Reagibilität von Thrombozyten war es nicht möglich, diese vor jedem Versuchsdurchlauf zu zählen. Setzt man bei den Spendern und Spenderinnen eine physiologische Blutzusammensetzung voraus, ergab sich durch die Verdünnungsschritte ein Thrombozyten-Anteil im Inkubationsansatz von 125.000.000 Zellen/ml. Dieser Wert liegt leicht unter dem für gesunde Erwachsene angegebene Referenzbereich von 150.000 - 400.000 Plättchen/ $\mu$ l (11). Es wurde somit ein Tumorzell-/Thrombozyten-Verhältnis von ca. 1:2.500 erreicht. Egan und Kollegen verglichen die Interaktion dieser beiden Zellgruppen im Rheometer in verschiedenen Verhältnissen. Sie konnten nachweisen, dass sowohl die Zahl adhärenter Thrombozyten je Tumorzelle als auch der damit einhergehende Schutz vor Scherkräften mit steigendem Thrombozyten-Anteil von 1:50 auf 1:200 zunahm (83). Das für diese Arbeit höher gewählte Verhältnis versprach somit gut sichtbare Ergebnisse und fiel dabei – unter Berücksichtigung der Abwesenheit anderer Blutzellen – zurecht niedriger aus als *in vivo* angenommen.

### IV.1.2.2 Thrombozyten

Die Thrombozyten wurden freiwilligen Spendern und Spenderinnen verschiedenen Alters unmittelbar vor Versuchsbeginn entnommen. Dabei wurden sowohl relevante Vorerkrankungen als auch eine bis zu zwei Wochen zurückliegende Einnahme von antikoagulatorisch wirksamen oder thrombozytenaggregationshemmenden Medikamenten ausgeschlossen.



Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche verschiedene Östrogenrezeptoren und werden in ihrer Aktivität durch das entsprechende Geschlechtshormon beeinflusst (172). Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde auf Unterschiede in der Interaktion von Thrombozyten weiblicher und männlicher Spender mit Tumorzellen geachtet. Berlin und Kollegen konnten eine gesteigerte Aggregationsbereitschaft von Thrombozyten prämenopausaler Spenderinnen im Vergleich zu postmenopausalen Spenderinnen und männlichen Spendern jeden Alters aufzeigen. Sie wiesen jedoch klar darauf hin, dass ihre Ergebnisse von denen anderer Arbeitsgruppen abwichen und andere Einflüsse für geschlechterspezifische Unterschiede verantwortlich gemacht werden könnten (173). Die Analyse der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigte keine klaren Unterschiede weder zwischen den verschiedenen Altersgruppen noch den Geschlechtern.

Des Weiteren blieb die Frage offen, ob die monatlichen Schwankungen des Östrogenspiegels im Rahmen des weiblichen Zyklus oder die Einnahme oraler Kontrazeptiva einen Einfluss auf die Wirkung von Thrombozyten haben könnten. Auch diese Sachverhalte haben Berlin und Kollegen in ihrer Veröffentlichung untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Einnahme oraler Kontrazeptiva zwar mit einer erhöhten Plättchenzahl einherging, die Reagibilität der Thrombozyten jedoch nicht gesteigert wurde. Auch in den verschiedenen Phasen des weiblichen Zyklus zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede (173). Basierend auf diesen und eigenen Erkenntnissen war die Wahl der potenziellen Thrombozyten-Spender und -Spenderinnen keinen Einschränkungen unterworfen.

#### IV.1.2.3 Tumorzellen

Die Wahl der zu untersuchenden Tumorzellklasse fiel auf das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, Zelllinie A549. Laut Angaben des Bundesamtes für Statistik wurden 19% der Todesfälle an Malignomen im Jahre 2018 in Deutschland durch bösartige Neubildungen der Bronchien und der Lunge verursacht (174). Dabei gehören 80% der Lungenkarzinomerkrankungen mit Todesfolge der Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome an (175). Die mit dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse sind somit klinisch von potenziell großer Relevanz. Die verwendeten Zellen wurden im Frühjahr 2017 durch die DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) auf ihre Güte hin kontrolliert. In der Forschung findet diese Zellreihe häufig Anwendung, da sie über einen großen Anteil an CSCs, eine stark ausgeprägte Resistenz gegen Chemotherapeutika und ein hohes metastatisches Potential verfügt (176,177). Somit eignete sich die A549-Zelllinie hervorragend für die hier durchgeführten Untersuchungen.

#### IV.1.2.4 Selektion Stammzell-ähnlicher Tumorzellen (CSCs)

Zur Unterscheidung differenzierter A549-Tumorzellen von solchen mit stammzellähnlichen Eigenschaften wurde das sogenannte *Sphere-formation Assay* angewendet. Diese Methode beruht auf dem bereits besprochenen Phänomen der *Anoikis*, wonach epitheliale Zellen bei ihrer Loslösung aus dem Zellverbund in einem Apoptose-ähnlichen Prozess zugrunde gehen (65). So wurde durch die

Beschichtung der Kulturflaschen mit Agarose die Adhäsion der epithelialen A549-Zellen am Flaschenboden verhindert. Es handelt sich beim *Sphere-formation Assay* um ein gut etabliertes Verfahren, das in der Forschung häufig Anwendung findet. Balla und Kollegen konnten hierbei seine Überlegenheit gegenüber anderen zur Selektion Stammzell-ähnlicher Tumorzellen bei Bronchialkarzinomzellen der Reihe A549 eingesetzten Verfahren zeigen (153). Nichtsdestotrotz existieren daran auch einige Kritikpunkte: So kann der obligate Einsatz zahlreicher Wachstumsfaktoren das Differenzierungspotential der Zellen beeinflussen. Außerdem werden ruhende, proliferativ-inaktive Zellen durch diese Methode nicht erfasst (154). Des Weiteren zeigen nicht alle Sphäroid-bildenden Zellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und damit das Hauptkriterium für Stammzellen (178). So konnten Louis und Kollegen in Rekultivierungsversuchen nachweisen, dass nur 6% der Sphäroid-bildenden Zellen über die Fähigkeit zur Langzeit-Selbsterneuerung verfügten. Folglich sind auch Nicht-Stammzellen zum Überleben des *Sphere-formation Assays* in der Lage (179). Es ist somit anzunehmen, dass nicht alle in dieser Arbeit vorselektierten CSCs tatsächlich Stammzell-Charakter hatten.

#### IV.1.2.5 Tinzaparin

P-Selektin spielt eine entscheidende Rolle beim Kontaktaufbau zwischen Tumorzellen und Thrombozyten und damit dem Prozess der Metastasierung (9). In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen der Hemmung dieses Oberflächenproteins auf die Wechselwirkung der beiden Zellgruppen im Fließinkubationssystem untersucht werden. Tinzaparin zeigte sich in dieser Hinsicht anderen niedermolekularen Heparinen überlegen (76). Bei der angewandten Wirkstoffkonzentration orientierte man sich an den für den Patientengebrauch vom Hersteller angegebenen Empfehlungen von 0,5 – 1,5 U/ml (165).

#### IV.1.3 Mögliche Fehlerquellen der Messverfahren

Alle im Durchflusszytometer gesammelten, quantitativen Erkenntnisse beruhen auf der Annahme, dass Tumorzellen durch ihren Kontakt mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten einen signifikanten Fluoreszenzzuwachs erfahren. Offenbarten Tumorzellen bei Kontrollversuchen mit nicht-gefärbten Thrombozyten bei jeder Inkubationszeit nur ein geringes Eigenfluoreszenzniveau, stieg dieses unter Zugabe gefärbter Thrombozyten im zeitlichen Verlauf an (Abbildung 8 und 12). Es blieb zu klären, ob dieser Fluoreszenzzuwachs tatsächlich durch die Interaktion der beiden Zellgruppen hervorgerufen wurde. Es war denkbar, dass im Rahmen der Thrombozyten-Färbung Restfarbstoff im Inkubationsansatz verblieb, der bei der Schlauchpassage anschließend von Tumorzellen aufgenommen werden konnte. Die Waschschriffe und die damit einhergehende 250-fache Verdünnung der Thrombozyten-Suspension – nach erfolgter PKH-67-Färbung – machten diesen Umstand jedoch unwahrscheinlich. Darüber hinaus offenbarten Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop, im Einklang mit den im Durchflusszytometer gesammelten Daten, den Kontakt der beiden Zellgruppen nach jeder Inkubationszeit (vgl. Abbildung 10 und 11). Um Gewissheit zu erlangen, wurde einmalig eine Kontrolllösung aus einer Suspension mit

PKH-67-gefärbten Thrombozyten erstellt. Hierfür wurden die Thrombozyten durch Zentrifugation und Filtrierung aus der Suspension entfernt, sodass nur ein möglicher Restfarbstoff für eine Zunahme der Fluoreszenzintensität der Tumorzellen nach gemeinsamer Inkubation im Schlauchsystem verantwortlich gemacht werden konnte. Eine derartige Zunahme wurde nicht beobachtet. Somit konnte eine Verfälschung der Messergebnisse durch im Inkubationsansatz verbliebenen Restfarbstoff ausgeschlossen werden.

Die Wirkungsweise von Thrombozyten sieht die Bildung von Agglomeraten bei ihrer Aktivierung vor. Im Rahmen der Hämostase können hierdurch Gefäßwanddefekte geschlossen und Blutungen gestoppt werden (15). Bei der TCIPA agglomerieren die Thrombozyten um die Tumorzelle, woraus vermeintlich die Bildung eines *protektiven Mantels* resultiert (9). Anders als im menschlichen Körper, wo vermutlich nur eine CTC auf  $10^9$  Blutzellen kommt (170), war im Schlauchmodell dieser Arbeit der Kontakt solcher Zellagglomerate untereinander wahrscheinlich. Es bestand die Gefahr, dass diese wiederum zu einem noch größeren Zellhaufen verschmolzen. Da die Funktionsweise eines Durchflusszytometers das Ansaugen und optische Abtasten einzelner Zellen durch eine Kapillare vorsieht, war die Erfassung solcher Zellagglomerate jedoch nicht möglich. So wurden, um das Verstopfen der Kapillare zu verhindern, die Proben vor der Auswertung im Durchflusszytometer filtriert. Die hierdurch beseitigten zusammenhängenden und demnach vermutlich *positiven* Zellen wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt. Die angewendete *Gating*-Strategie stellte die Betrachtung nur einzelner Tumorzellen sicher (Abbildung 7). Somit gingen wahrscheinlich weitere *positive* Zellen in der Auswertung verloren. Dies ist vor allem nach längeren Inkubationszeiten mit höherer Wahrscheinlichkeit der Agglomeratbildung zu befürchten gewesen. Nichtsdestotrotz war diese Form der Selektion notwendig, um die Vergleichbarkeit der Zellen untereinander gewährleisten zu können. Große Zellagglomerate hätten kleinere Agglomerate oder gar vereinzelte Tumorzellen trotz intensiver Wechselwirkung mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten sicherlich überstrahlt und damit zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt.

## IV.2 Betrachtung der Ergebnisse

### IV.2.1 Die Interaktion differenzierter Tumorzellen mit Thrombozyten unter Fließbedingungen

Die im Schlauchmodell gesammelten Ergebnisse zeigen die Interaktion zwischen Bronchialkarzinomzellen der Reihe A549 und Thrombozyten unter Fließbedingungen *in vitro*. Hierbei war eine zeitliche Abhängigkeit zu beobachten. So zeigten nach 5-minütiger Inkubationszeit ca. 20% der Tumorzellen einen signifikanten Fluoreszenzzuwachs. Passend dazu sind auf den Aufnahmen im Konfokalmikroskop nach 5-minütiger Schlauchpassage vereinzelte Tumorzellen mit äußerlich anhaftenden Thrombozyten sichtbar (Abbildung 10). Es ist anzunehmen, dass diese den in der Durchflusszytometrie bestimmten, *positiven* Zellen entsprechen (vgl. Abbildung 9). Nach 45 Minuten betrug der Anteil an *positiven* Zellen über 80%, wobei die Zwischenergebnisse nach 15- und

30-minütiger Inkubation einen sigmoidalen Kurvenverlauf vermuten lassen. Daraus ergibt sich, dass zwischen 5 und 15 Minuten nur wenig neue Tumorzellen mit PKH-67-gefärbten Thrombozyten in Kontakt traten (Abbildung 9). So zeigten nicht alle Tumorzellen einen zeitabhängigen, stetigen Zuwachs ihrer Fluoreszenzintensität, was sich im Histogramm in Form eines *peak shifts* dargestellt hätte. Vielmehr wurde eine Subpopulation an Tumorzellen sichtbar, die durch den schnellen Kontaktaufbau zu Thrombozyten einen relevanten Fluoreszenzzuwachs erfahren hatte. Diese Subpopulation imponierte in der Histogramm-Ansicht durch die Ausbildung einer *Schulter* (Abbildung 8). Sie beinhaltete bei einer Fluoreszenzintensität von  $10^2$  eben diese 20% *positiver* Versuchszellen. Die übrigen Zellen interagierten erst deutlich später mit den Thrombozyten. Auf der Grundlage verschiedener Studien geht man davon aus, dass ca. 80% der CTCs innerhalb der ersten 5 Minuten im Blutsystem zugrunde gehen (8, 65,70). In Anbetracht der vielfach untersuchten schützenden Wirkung von Thrombozyten auf CTCs (9) ist es durchaus denkbar, dass die überlebenden 20% jenen *positiven* Zellen entsprechen, die zur *Schulter*-Bildung in Abbildung 8 führten.

Zwischen 15- und 45-minütiger Inkubation kam es zu einem starken Anstieg des Anteils *positiver* Zellen (Abbildung 9). Im Histogramm zeigte sich der bei Beteiligung nahezu aller malignen Versuchszellen zu erwartende *peak shift* (Abbildung 8). Dazu passend war in der Konfokalmikroskopie bei der Mehrheit der Tumorzellen grüne Fluoreszenzaktivität sichtbar (Abbildung 11). Interessanterweise konnte eine vollständige Umschließung der Tumorzellen durch Thrombozyten und damit die Bildung des in der Literatur häufig postulierten *protektiven Mantels* (9) in dieser Versuchsreihe mit regulären Tumorzellen jedoch zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Die nur vereinzelt adhäsiven Thrombozyten lassen vor dem Hintergrund ihrer schützenden Wirkung die Beschreibung eines *protektiven Helms* für die Tumorzellen passender erscheinen. Neben diesem zeigten sich bei einem Großteil der A549-Zellen fluoreszierende Partikel in ihrem Zytosol (Abbildung 11).

#### IV.2.1.1 Intrazelluläre Fluoreszenz

Die mit Abbildung 11 B erzeugte 3D-Darstellung in verschiedenen Schnittebenen gestattete den sicheren Nachweis über die Lokalisation der fluoreszierenden Partikel innerhalb des Tumorzell-Zytosols. Dabei kann die Aufnahme von Restfarbstoff entsprechend der durchgeführten Kontrollen ausgeschlossen werden. Im Einklang mit den Ergebnissen von Martins Castanheira *et al.* (158) könnte es sich hierbei um internalisierte Thrombozyten beziehungsweise ihre Bestandteile handeln. Die Autoren konnten beobachten, dass Tumorzellen nach 90-minütiger Inkubation mit Thrombozyten das für diese spezifische CD42a in ihrer Zellmembran aufwiesen. Diese Untersuchungen fanden sowohl unter statischen als auch dynamischen Bedingungen auf dem Schwenktisch statt. Wie in der vorliegenden Arbeit zeigten sich ebenfalls PKH-67-gefärbte, thrombozytäre Membranbestandteile nach entsprechender Exposition im Zytosol der Tumorzellen. Es ist somit davon auszugehen, dass es hier zum ersten Mal gelang, eine solche Internalisierung von Thrombozyten durch Tumorzellen unter

Fließbedingungen mit laminarer Strömung darzustellen (Abbildung 11). Dies bedeutet eine wichtige Ergänzung der von Martins Castanheira *et al.* gewonnenen Erkenntnisse.

Dabei ist anzunehmen, dass die Tumorzellen mit internalisierten, PKH-67-gefärbten Thrombozyten-Bestandteilen bei der Untersuchung im Durchflusszytometer ebenfalls als *positiv* eingestuft wurden. Nichtsdestotrotz wurden solche intrazellulären Partikel sicherlich mit einer geringeren Leuchtkraft detektiert als äußerlich adhärente und vollständig erhaltene Thrombozyten. Im Einklang zu diesen Überlegungen zeigte sich trotz der Zunahme des Anteils an *positiven* Zellen im zeitlichen Verlauf (vgl. Abbildung 9) tendenziell eher ein leichter Rückgang ihrer MFI (Abbildung 19). Daraus kann geschlossen werden, dass mit der Zeit mehr CTCs mit Thrombozyten in Interaktion traten und dies zugleich mit einer zunehmenden Aufnahme letzterer einherging.

Der Aufnahme ganzer Thrombozyten beziehungsweise ihrer Bestandteile liegt vermutlich ein Phagozytose-ähnlicher Prozess zugrunde. So ist die Phagozytose von Thrombozyten durch Makrophagen ein physiologischer Prozess zur Erhaltung der Homöostase im menschlichen Körper. Aktivierte Thrombozyten exprimieren Phosphatidylserin auf ihrer Oberfläche (45), was in der Literatur als „Friss mich“-Signal bekannt ist. Makrophagen erkennen daraufhin dieses Signal mittels TIM4 (43). Dieser Rezeptor wird ebenfalls von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zellen – also auch A549-Zellen – exponiert, was mit ihrem gesteigerten Tumorwachstum und einer erniedrigten Überlebenserwartung des Patienten einhergeht (180). Es ist möglich, dass die Aufnahme von Thrombozyten für dieses TIM4-assoziierte, aggressivere Verhalten ausschlaggebend ist. Diese Vermutung erfährt zusätzliche Unterstützung durch die Beobachtungen von Meijing *et al.*, die Gold-Nanopartikel mit einem Mantel aus negativ geladenen Phospholipiden versahen. Diese wurden in einem Zeitraum von 24 bis 72 h vollständig von A549-Tumorzellen aufgenommen. In mikroskopischen Aufnahmen konnten die phagozytierten Nanopartikel später im Bereich ihrer intrazellulären sauren Kompartimente entdeckt werden (181). Es ist anzunehmen, dass sich dieses Modell auf Thrombozyten übertragen lässt. Sie wurden demnach aufgrund ihrer negativ geladenen Phospholipid-Schicht im aktivierten Zustand durch Tumorzellen aufgenommen und abgebaut. Dabei ist der zugrunde liegende Mechanismus noch weitgehend unbekannt. Bei Makrophagen konnte ein Labyrinth-ähnliches Membran-System im Zytosol nachgewiesen werden, das ihnen eine besondere Form der Endozytose gestattet und als *surface connected compartment (SCC)* bezeichnet wird (182). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei A549-Tumorzellen gemacht werden (183). Es besteht die Möglichkeit, dass die Aufnahme ganzer Thrombozyten oder ihrer Bestandteile durch die Tumorzellen über diese SCCs stattfindet.

#### IV.2.1.2 Die Bedeutung internalisierter Thrombozyten für die Physiologie von Tumorzellen

Neben dem bereits mehrfach angesprochenen *protektiven Mantel* sind auch andere Mechanismen beschrieben worden, durch die Thrombozyten das Überleben von Tumorzellen im Blutkreislauf sichern können. So beobachteten Placke und Kollegen den Transfer wirtsspezifischer MHC-I-Komplexe von äußerlich an CTCs heftenden Thrombozyten auf die Tumorzellen. Diese konnten so der zytotoxischen Wirkung von NKs entgehen (82). Darüber hinaus konnten Kirschbaum *et al.* nachweisen, dass nach erfolgter Internalisierung von Thrombozyten durch Hepatozyten ein horizontaler Gentransfer stattfand. Die transferierte Thrombozyten-mRNA wurde von den Hepatozyten exprimiert, woraufhin sich ihre Proliferationsrate erhöhte. Die Autoren sprechen in diesem Zusammenhang von *parasitischer Protein-Synthese* (49). Das Phänomen des thrombozytären horizontalen mRNA-Transfers konnte auch bei monozytischen und endothelialen Zellen beobachtet werden. Auch hier waren die Empfängerzellen dazu in der Lage, das Genmaterial zu exprimieren (184). Es ist somit denkbar, dass Tumorzellen durch die Phagozytose ganzer Thrombozyten und damit die Übernahme von Oberflächenproteinen oder von Genmaterial einen relevanten Überlebensvorteil im Blutkreislauf erfahren.

Die vollständige Phagozytose von Thrombozyten war in dieser Arbeit erst nach 45 Minuten zu beobachten. Dies passt zu Untersuchungen von neutrophilen Granulozyten und Hepatozyten, bei denen dieser Prozess ebenfalls erst nach einer Stunde zu beobachten war (48,49). Es ist davon auszugehen, dass die meisten CTCs nicht so lange ohne adäquaten Schutz im Blut überdauern können (65). Nichtsdestotrotz sind manche CTCs noch Stunden nach vollständiger Tumoresektion im Blut nachweisbar (71). Es ist somit möglich, dass Tumorzellen durch ihren schnellen, äußeren Erstkontakt mit Thrombozyten einen unmittelbaren Schutz erfahren. Ihr Überleben im Blutsystem wäre daraufhin gesichert, bis weitere Effekte durch internalisierte Thrombozyten zum Tragen kommen. Bei den Versuchen dieser Arbeit wirkt darüber hinaus – beispielsweise bedingt durch die Abwesenheit von NKs – ein geringerer Überlebensdruck auf die CTCs, was eine später einsetzende Schutzwirkung durch die Thrombozyten tolerabel macht.

Einige CTCs in Abbildung 11 zeigten Ausbeulungen ihrer Zellmembran. Davon schienen insbesondere jene CTCs mit internalisierten und nicht anheftenden Thrombozyten betroffen zu sein. Dabei erinnern diese Ausbeulungen an das im Rahmen der Apoptose auftretende *membrane blebbing* (185). Es ist also davon auszugehen, dass sich diese Zellen kurz vor ihrem Untergang befanden. Dabei bedingen die im Schlauchsystem herrschenden Scherkräfte einen unmittelbaren Überlebensdruck für die CTCs. Anders als beim *protektiven Mantel* ist bei internalisierten Thrombozyten von keiner Schutzwirkung gegen diese auszugehen.

#### IV.2.1.3 Die Beteiligung von PDMPs am metastatischen Geschehen

Es ist denkbar, dass Teile der fluoreszierenden Partikel im Zytosol der Tumorzellen nicht durch die Aufnahme vollständiger Thrombozyten, sondern der ihnen entspringenden Mikrovesikel, der PDMPs, entstammten.

PDMPs spielen eine herausragende Rolle in der Funktion von Blutplättchen. Diese kleinen, membranumschlossenen Vesikel werden bei der thrombozytären Aktivierung freigesetzt. Sie enthalten über 500 verschiedene Proteine und dienen vor allem der Steuerung von Entzündungsreaktionen (25). Darüber hinaus wurde die Bedeutung der PDMPs für die Tumorprogression und -metastasierung vielfach untersucht (186). Janowska-Wieczorek *et al.* konnten unter anderem bei A549-Zellen nachweisen, dass PDMPs ihr invasives und metastatisches Potential steigerten. Hierfür wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, darunter die Übertragung von Oberflächenproteinen, die Stimulation der MMP-9-Synthese, die gesteigerte Adhäsionsfähigkeit an ECM-Komponenten und die Expression angiogenetischer Faktoren (187). Neben MMP-9 können PDMPs selbst MMP-2 bilden oder dessen Synthese in Tumorzellen stimulieren und dadurch ihr invasives Potential steigern (188). Darüber hinaus konnten Laffont und Kollegen nachweisen, dass über PDMPs miRNA effektiv in Rezipientenzellen transferiert wurde und dort modulierend auf deren Genexpression wirkte (189).

Tumorzellen können die Bildung und Freisetzung von PDMPs auf verschiedene Arten stimulieren (186). Aus den oben genannten Punkten geht eindeutig hervor, dass Tumorzellen dadurch Unterstützung für ihre Progression und Metastasierung erfahren. Es ist somit davon auszugehen, dass auch die Thrombozyten in der vorliegenden Arbeit durch die TCIPA während der Schlauchpassage vermehrt PDMPs sezernierten. Diese konnten daraufhin – neben den Thrombozyten selbst – von den A549-Tumorzellen phagozytiert und später in Form fluoreszierender Partikel innerhalb des Tumorzell-Zytosols mittels Konfokalmikroskopie sichtbar gemacht werden (weiße Pfeile in Abbildung 11 A und B).

#### IV.2.2 Die Interaktion von Tumorstammzellen mit Thrombozyten unter Fließbedingungen

Tumorstammzell-Populationen wurden mit Hilfe des *Sphere-formation Assays* angezüchtet und selektiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche im Schlauchmodell zeigten die Wechselwirkung von CSCs und Thrombozyten unter Fließbedingungen. Hierbei fiel auf, dass bereits nach 5-minütiger Schlauchpassage ca. 80% der CSCs mit Thrombozyten interagiert hatten. Dieser Anteil erfuhr bei längeren Schlauchpassagen keinen weiteren Zuwachs, sondern unterlag vielmehr starken Schwankungen (Abbildung 14). Zur näheren Eingrenzung der zeitlichen Abfolgen wurden zusätzliche Versuchsdurchläufe mit kürzeren Schlauchstücken durchgeführt. So konnten Inkubationszeiten von 1 und 2,5 Minuten untersucht werden. Interessanterweise waren auch hier bereits nach 1 Minute ca. 80% der CSCs *positiv* (Abbildung 14). Dies passt zu den Ergebnissen von Egan *et al.*, die ebenfalls beobachten konnten, dass nach einer Minute die Adhäsion von Thrombozyten an

Tumorzellen abgeschlossen war (83). Wie bei den differenzierten A549-Zellen zeigten die entsprechenden Aufnahmen im Konfokalmikroskop primär von außen an den CSCs haftende Thrombozyten. Waren bei den Nicht-Stammzell-Versuchen nur vereinzelt adhärenzte Thrombozyten sichtbar (vgl. Abbildung 10), bildeten sie nun große Agglomerate um die CSCs (Abbildung 15). Dies ließe sich mit ihrer stärker ausgeprägten Fähigkeit zur TCIPA (116) erklären. So zeigt Abbildung 16 eine CSC, die vollständig von Thrombozyten umschlossen wurde. Dabei hatten die beteiligten Blutplättchen ein vesikuläres Aussehen, das sie hohl erscheinen ließ und an PDMPs erinnerte. Ihre Größe von 4  $\mu\text{m}$  grenzte sie jedoch klar von den zwischen 100 nm und 1  $\mu\text{m}$  messenden Mikropartikeln ab (24). Es handelte sich somit bei dieser Aufnahme vermutlich um die erste Sichtbarmachung des häufig beschriebenen *protektiven Mantels*. Vergleicht man vor diesem Hintergrund die in Abbildung 19 dargestellte MFI der *positiven* Zellen fällt auf, dass die CSCs verglichen mit den regulären A549-Zellen zu jedem Zeitpunkt im Durchschnitt signifikant höher lagen. Dies lässt sich mit der größeren Anzahl adhärenzter, PKH-67-gefärbter Thrombozyten je Tumorstammzelle begründen.

Die weitergehende Untersuchung von CSCs nach 15-, 30- und 45-minütiger Inkubation mit Thrombozyten wurde zur besseren Vergleichbarkeit mit A549-Zellen ohne Stammzell-ähnliche Eigenschaften durchgeführt. Es fiel auf, dass der Anteil *positiver* Stammzellen nach längerer Schlauchpassage im Vergleich zur 5-minütigen Passage konstant blieb oder sogar abnahm. Dies konnte auch bei den Untersuchungen mit kürzeren Inkubationszeiten zwischen 1 und 2,5 Minuten beobachtet werden (Abbildung 14). Dieses Phänomen lässt sich durch die im Schlauchsystem wahrscheinliche Agglomeratbildung und die damit ausbleibende Erfassung im Durchflusszytometer erklären. Dabei hat dieser Umstand bei den Untersuchungen der CSCs, aufgrund ihrer verstärkten Fähigkeit zur TCIPA, höchstwahrscheinlich einen größeren Effekt als bei regulären A549-Tumorzellen. Passend zu dieser Vermutung gingen nicht nur der Anteil *positiver* Zellen, sondern auch die Gesamtzahl der vom Durchflusszytometer erfassten CSCs mit steigender Versuchsdauer zurück (vgl. Tabellen in Abbildung 12 und 13).

Vor diesem Hintergrund fällt auf, dass zu keiner Versuchszeit 100% der durch das *Sphere-formation Assay* vorselektierten A549-Stammzellen eine stattgefundene Interaktion mit Thrombozyten zeigten. Die bisher diskutierten Daten lassen jedoch eine stark ausgeprägte Bereitschaft zur Interaktion mit Thrombozyten als typische Eigenschaft der CSCs vermuten. Es ist somit denkbar, dass es sich bei diesen nicht-*positiven* Zellen nicht um Tumorstammzellen handelte. Die Limitationen des angewendeten Selektionsverfahrens, das in der Regel keine reinen Stammzellpopulationen schaffen kann, stellen eine mögliche Begründung für diesen Umstand dar (154,178,179).

#### IV.2.2.1 Subpopulationen innerhalb eines Tumorzellkollektivs

Die vorgestellten Ergebnisse lassen zwei unterschiedliche Interaktionsmodi zwischen den zuerst besprochenen, differenzierten A549-Bronchialkarzinomzellen und Thrombozyten unter



Fließbedingungen erkennen: Insbesondere nach kurzen Inkubationszeiten konnten an den Tumorzellen vor allem adhärenente Thrombozyten nachgewiesen werden (Abbildung 10). Sowohl die Abschirmung vor NKs und der Schutz vor Scherkräften als auch die unterstützende Wirkung bei der Extravasation sind in diesem Zusammenhang ausführlich besprochen worden. Die Phagozytose ganzer Thrombozyten oder ihrer PDMPs war zwar erst deutlich später zu beobachten, verspricht jedoch ebenfalls positive Effekte auf das Überleben der jeweiligen Tumorzelle.

Basierend auf diesen Erkenntnissen stellt sich die Frage, ob sich diejenigen Tumorzellen innerhalb einer Versuchsgruppe, die durch ihre schnelle Ausbildung äußerer Kontakte zu Thrombozyten auffallen, von den anderen unterscheiden. Der Anteil *positiver* Zellen nach 5-minütiger Schlauchpassage ließ sich beliebig oft reproduzieren. Geht man von gleichen Eigenschaften aller malignen Versuchszellen aus, scheint bei einem Thrombozyten-Überschuss von 1:2.500 ein Anteil *positiver* Tumorzellen von lediglich 20% wenig wahrscheinlich. Die Literatur liefert ähnliche Zahlen im Zusammenhang mit jenen CTCs, die im Blutkreislauf überleben können (65). Die Vermutung, dass es sich hierbei um die gleiche Zellgruppe handeln könnte, wurde bereits in dieser Arbeit formuliert. In den letzten Jahren wurde der Zusammenhang zwischen dem metastatischen Geschehen und Tumorstammzellen immer weiter untersucht. Ihr Anteil am Tumorzell-Kollektiv wird abhängig von der Tumorentität mit durchschnittlich 25% angegeben (176,177,190). Es ist auffällig, dass der Anteil jener CSCs, denen vorrangig die Fähigkeit zur Metastasierung nachgesagt wird (122), dem entspricht, der im vorliegenden Schlauchversuch eine Interaktion mit Thrombozyten nach 5-minütiger Schlauchpassage zeigte. Es ist somit denkbar, dass es sich bei den früh *positiven* Zellen aus Abbildung 8 und 9 um CSCs handelte. Dabei würde die früh einsetzende Schutzwirkung der Thrombozyten den Überlebensvorteil bedingen, der die Metastasierung am Ende möglich macht.

Neben dem hier angewandten *Sphere-formation Assay* existieren auch weitere Verfahren zur Identifikation von solchen Zellen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften. Der Nachweis stammzelltypischer Oberflächenmarker wie beispielsweise CD166 könnte im Nachhinein Aufschluss über den Charakter der in Abbildung 8 an der Bildung der *Schulter* beteiligten und als *positiv* identifizierten Zellen geben (153).

Hieraus ergibt sich die Frage, warum die Zellen reiner CSC-Populationen große Thrombozyten-Agglomerate um sich herum ausbilden konnten, wohingegen die *Schulter*-bildende Subpopulation (vgl. Abbildung 8) – mutmaßlich bestehend aus CSCs – im Kollektiv regulärer A549-Zellen nur vereinzelt anheftende Thrombozyten aufwies (Abbildung 10 und 11). Tumorstammzellen sind durch die vermehrte Freisetzung von beispielsweise TF zur stärkeren TCIPA fähig (116). Es ist denkbar, dass die hohe Konzentration an CSCs im Inkubationsansatz in Summe zur Sekretion großer Mengen dieses Thrombozyten-stimulierenden Mediators führte. Dadurch war die kaskadenartige Aktivierung vieler Blutplättchen möglich und es resultierte die Bildung zahlreicher

Agglomerate (vgl. Abbildung 15). Im Gegensatz dazu fiel dieser Effekt bei den Versuchsdurchläufen mit regulären A549-Tumorzellen und damit einem nur geringen Anteil an CSCs schwächer beziehungsweise langsamer aus.

#### IV.2.2.2 Der Stammzellstatus und die Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion

Die Forschung an CSCs konnte zeigen, dass der Stammzellstatus kein statisches Konstrukt ist und dass Tumorzellen zwischen diesem und dem differenzierten Typ hin und her wechseln können (127). In diesem Zusammenhang wurde die EMT als entscheidender Prozess im Erwerb Stammzell-ähnlicher Eigenschaften identifiziert (191). Darüber hinaus sind Thrombozyten durch die Sekretion verschiedener EMT-induzierender Faktoren wie beispielsweise TGF- $\beta$  maßgeblich an der Auslösung dieses Prozesses beteiligt (58,63). Dabei entsteht der Eindruck, dass die EMT die Voraussetzung für das Verlassen des Zellkollektivs und für die Intravasation von Tumorzellen bildet. Es konnten allerdings CTCs nachgewiesen werden, die noch im Blutkreislauf eine epitheliale Polarisierung aufwiesen (64). Diese epithelialen Tumorzellen waren möglicherweise über kollektive Zell-Migration (192) oder über die im Rahmen der Tumor-Angiogenese gebildeten hyperpermeablen Gefäße ins Blutsystem gelangt (193). Labelle *et al.* erbrachten erste Hinweise dafür, dass epitheliale Tumorzellen unter dem Einfluss von Thrombozyten intravaskulär zur EMT fähig sind (58). Dabei konnten Meng und Kollegen noch Stunden nach Entfernung des Primärtumors zirkulierende Tumorzellen im Blut des Patienten nachweisen (71). Dieser Zeitraum erscheint ausreichend für die intravaskuläre EMT. Es ist möglich, dass sich diese Erkenntnisse auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit anwenden lassen. Demzufolge hätten differenzierte A549-Zellen, induziert durch die sie umgebenden Thrombozyten, den Prozess der EMT während der Schlauchpassage durchlaufen können, um dadurch Stammzell-Eigenschaften anzunehmen. Der zeitliche Versatz, mit dem A549-Tumorzellen im Vergleich zu CSCs mit Thrombozyten in Kontakt traten, lässt sogar die Vermutung zu, dass die EMT und damit die Aneignung Stammzell-ähnlicher Eigenschaften eine Voraussetzung für diese Wechselwirkung darstellen könnte. Unter Berücksichtigung der eindeutigen, in der Konfokalmikroskopie zu beobachtenden Unterschiede zwischen den primär Agglomerat-bildenden CSCs und den Thrombozyten-internalisierenden A549-Zellen (vgl. Abbildung 11 und 17) scheint ein völliges Angleichen dieser beiden Zellgruppen im zeitlichen Verlauf jedoch wenig wahrscheinlich. Auch die in Abbildung 19 dargestellten, signifikanten Unterschiede hinsichtlich der MFI ihrer *positiven* Zellen gestatten eine klare Abgrenzung zwischen den Zellentitäten. Darüber hinaus zeigten zahlreiche A549-Tumorzellen nach 45-minütiger Schlauchinkubation an *membrane blebbing* erinnernde Ausbeulungen (185). Neben den durch Scherkräfte bedingte Schäden kann die hier einsetzende Apoptose der Tumorzellen sicherlich auch auf die unter nicht-adhäsiven Bedingungen stattfindende *Anoikis* (65) zurückgeführt werden. Diese Zellen durchliefen sicherlich keine EMT, da mesenchymale Eigenschaften vor der Apoptose unter diesen Bedingungen schützend wirken (53).

#### IV.2.3 Der Einfluss von Tinzaparin auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten

Die mit Tinzaparin vorbehandelten Thrombozyten zeigten ein deutlich reduziertes Interaktionsverhalten sowohl mit differenzierten als auch Stammzell-ähnlichen A549-Zellen unter Fließbedingungen (Abbildung 21 und 22). So ließ sich nach 5-minütiger Inkubation unter Tinzaparin bei nur ca. 20% der A549-Tumorzellen ein stattgefundenener Kontakt der beiden Zellgruppen nachweisen. Dieser Anteil blieb im zeitlichen Verlauf nahezu unverändert (Abbildung 21). Die Resultate der Versuche mit Tinzaparin und vorselektierten CSCs lagen nach 5 Minuten nur um wenige Prozentpunkte höher. Davon ausgehend stieg ihr Anteil im zeitlichen Verlauf nicht signifikant auf ca. 35% nach 45-minütiger Inkubation an (Abbildung 22).

Bereits seit vielen Jahren gehören gerinnungshemmende Medikamente zur Standardtherapie bei Tumorleiden. Thromboembolische Ereignisse treten, ausgelöst durch die TCIPA, in 20% der Fälle auf (157) und bilden die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten (194). Neben Fondaparinux werden insbesondere niedermolekulare Heparine wie beispielsweise Tinzaparin in den Leitlinien zur Thromboembolie-Prophylaxe bei Tumorpatienten empfohlen (195). Bei Acetylsalicylsäure (Aspirin) zeigte sich ein hemmender Effekt auf die Metastasierungshäufigkeit von Tumorzellen (196). Auch für Heparine konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind zahlreich und beinhalten die Hemmung der Thrombinbildung, der Angiogenese und der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (197). Für das in dieser Arbeit eingesetzte niedermolekulare Heparin Tinzaparin wurden die Hemmung von VLA-4, VCAM-1, CXCR-4, CXCL-12 und die Stimulation der E-Cadherin-Bildung als weitere Wirkmechanismen identifiziert (157). Stevenson *et al.* vermuten jedoch in der Hemmung von P-Selektin den Hauptgrund für den antimetastatischen Effekt von Tinzaparin, was Liebsch und Kollegen bestätigen konnten (75,76). In der Kaskade, die das Überleben von Tumorzellen vor ihrer Extravasation und der Etablierung einer *metastatischen Nische* ermöglicht, ist ihr physischer Kontakt zu Thrombozyten entscheidend. Dieser wird durch den schnellen, P-Selektin-vermittelten Erstkontakt zum großen Teil überhaupt erst möglich gemacht (72–74,77,78). Dieser Umstand wurde bereits konkret für Bronchialkarzinomzellen untersucht (72,75). Eine Konsolidierung dieser Bindung findet später GPIIb/IIIa-vermittelt statt (198). Des Weiteren bilden auch die für die Tumorprogression wichtigen PDMPs P-Selektin auf ihrer Oberfläche aus (24). Zuletzt ist auch davon auszugehen, dass die bereits diskutierte Phagozytose-ähnliche Internalisierung von Thrombozyten durch Tumorzellen eine anfängliche P-Selektin-vermittelte Adhäsion voraussetzt (48).

Somit lässt sich die in den Abbildungen 21 und 22 zu beobachtende Reduktion der Tumorzell-Thrombozyten-Interaktion vermutlich auf den hemmenden Effekt von Tinzaparin auf P-Selektin zurückführen. Insbesondere unter Fließbedingungen, mit nur kurzen Kontaktzeiten der Zellen untereinander, scheint der schnelle Erstkontakt über P-Selektin eine besondere Rolle zu spielen. Wird dieser durch Tinzaparin unterbunden, bleibt die Bindung von Thrombozyten an die Tumorzellen

aus, was das Überleben der CTCs im Blutkreislauf unwahrscheinlicher macht. Die reduzierte Metastasenhäufigkeit bei den mit Tinzaparin behandelten Krebspatienten lässt sich so erklären (157).

Nun stellt sich die Frage, was die *positiven* CTCs und noch deutlicher die *positiven* CSCs in Abbildung 20 dazu befähigt, trotz der Wirkung von Tinzaparin mit Thrombozyten zu interagieren. Es ist denkbar, dass die eingesetzte Tinzaparin-Konzentration nicht zur Hemmung aller Thrombozyten beziehungsweise aller von diesen exprimierten P-Selektinen geführt hat. Sie entsprach mit 1 U/ml ungefähr der für den klinischen Gebrauch empfohlenen Blutkonzentration (165,195). Auf diese Weise wird die koagulatorische Fähigkeit der Patienten nicht vollständig unterdrückt, da ansonsten bereits bei Bagatelltraumata schwere Blutungen drohten. Es ist ebenfalls möglich, dass die Wechselwirkung über andere Oberflächenproteine und damit einen Heparin-insensitiven Mechanismus vermittelt wird. So ist GPIIb/IIIa maßgeblich an der sicheren Bindung der beiden Zellgruppen beteiligt (198). McMarty und Kollegen unterstrichen in ihrer Studie zwar erneut die besondere Bedeutung von P-Selektin beim schnellen Erstkontakt unter Fließbedingungen, konnten aber ebenfalls die direkte Bindung über GPIIb/IIIa beobachten (85). Diese erfolgte dabei unter anderem über vWF und Fibronektin (199). Einige Tumorzellen sind sogar zur *de novo*-Synthese von vWF fähig (86). Im Übrigen wurde der Krebs noch nicht „besiegt“. So kann die Therapie von Krebspatienten mit Tinzaparin die Bildung von Metastasen zwar reduzieren, in vielen Fällen jedoch nicht verhindern (157). Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Interaktion zwischen Tumorzellen und Thrombozyten unter der Wirkung eines niedermolekularen Heparins steht im Einklang mit diesen Überlegungen.

Dabei fällt erneut der 20%ige Anteil *positiver* Zellen in den Versuchen mit differenzierten A549-Zellen auf. Wie für Abbildung 8 bereits diskutiert, könnte es sich bei dieser in Abbildung 20 (A) als *Schulter* sichtbaren Subpopulation um Tumorstammzellen handeln. Es ist nicht auszuschließen, dass CSCs durch verstärkte TCIPA oder andere Mechanismen auch unter der Wirkung von Tinzaparin mit Thrombozyten interagieren können. Tatsächlich zeigten reine CSC-Populationen einen höheren Anteil *positiver* Zellen mit leichter Zunahme im zeitlichen Verlauf (Abbildung 22) als differenzierte A549-Zellen (Abbildung 21). So könnte aus der stärkeren TCIPA-Aktivität der CSCs eine vermehrte Aktivierung des GPIIb/IIIa-Integrins auf der Thrombozyten-Oberfläche resultieren, was die P-Selektin-unabhängige Bindung begünstigen würde. Nichtsdestotrotz war der hemmende Effekt von Tinzaparin auch bei Stammzell-ähnlichen A549-Zellen zu jedem Versuchszeitpunkt signifikant (Abbildung 22). Vor dem Hintergrund, dass vermutlich ausschließlich CSCs zur Metastasierung fähig sind (122) und dass niedermolekulare Heparine eben diese hemmend beeinflussen können (197), erscheint der hier sichtbare Effekt von Tinzaparin auf die Wechselwirkung zwischen Tumorstammzellen und Thrombozyten schlüssig.

### IV.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und Tumorzellen unter Fließbedingungen zeigen. Diesem Umstand wird insbesondere bei der Metastasenbildung eine große Bedeutung zugeschrieben (9). Neue Erkenntnisse der zugrunde liegenden Mechanismen können die Entwicklung zielgerichteter Medikamente vorantreiben. Da die hohe Mortalität von Krebspatienten maßgeblich von der Metastasenbildung abhängt, ließe sich so das Überleben vieler Menschen verlängern und verbessern. Durch die im Blutstrom auf CTCs wirkenden Noxen, scheinen insbesondere die Tumorzellen einen Vorteil zu haben, die Thrombozyten schnell an sich binden können. Eine nähere Untersuchung dieser „schnellen“ Zellen beispielsweise auf Stammzellmarker scheint dabei von besonderer Relevanz.

Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die bereits unter statischen Bedingungen (158) beobachtete Phagozytose von Thrombozyten durch Tumorzellen bei laminarer Strömung nachgewiesen werden. Die Fähigkeit von CTCs, aktivierte Thrombozyten zu internalisieren, ist vermutlich maßgeblich an ihrer erfolgreichen Streuung beteiligt. Dementsprechend bietet auch diese Erkenntnis vielversprechende Ansatzpunkte für die Krebstherapie. Die gezielte Hemmung der Phagozytose ließe eine deutliche Reduktion der Metastasenhäufigkeit erhoffen.

Tumorstammzellen gelten als die Hauptakteure im Prozess der Metastasierung (122). Hierfür ist unter anderem ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Interaktion mit Thrombozyten verantwortlich zu machen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CSCs quantitativ stärker und schneller mit Blutplättchen in Kontakt treten konnten als differenzierte Tumorzellen. Dies ist ein Umstand, der einen entscheidenden Überlebensvorteil bedeuten kann. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Unterschiede zwischen den Tumorzellen mit und jenen ohne Stammzell-Eigenschaften könnten zur Erforschung geeigneter Inhibitionsmethoden der Tumorentstehung, -progression und -metastasenbildung führen.

Niedermolekulare Heparine wie beispielsweise Tinzaparin werden bereits standardmäßig auf onkologischen Stationen zur Thromboseprophylaxe angewendet (195). Darüber hinaus wird ein antimetastatischer Effekt bei dieser Medikamentengruppe angenommen (76). Die hier beobachtete, stark hemmende Wirkung auf die Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und CTCs liefert dafür eine mögliche Erklärung. Dabei scheint insbesondere die Hemmung des Oberflächenproteins P-Selektin entscheidend zu sein. Die weitere Beleuchtung dieses Sachverhaltes soll in Zukunft einen bewussteren Einsatz von niedermolekularen Heparinen gestatten und damit den Weg zu kurativen Therapieansätzen vieler Tumorleiden ebnen.

## Bibliografie

1. Barow M. Die klinische Wertigkeit von Tumorstammzellmarkern bei Pankreaskarzinomen. Universität zu Lübeck; 2014.
2. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr.* 2016;7(2):418–419.
3. Lou X-L, Sun J, Gong S-Q, Yu X-F, Gong R, Deng H. Interaction between circulating cancer cells and platelets: clinical implication. *Chin J Cancer Res.* 2015;27(5):450–460.
4. Steeg PS. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006;12(8):895–904.
5. Rejniak KA. Circulating tumor cells: When a solid tumor meets a fluid microenvironment. *Adv Exp Med Biol.* 2016;936:93–106.
6. Riede U-N, Freudenberg N, Werner M. Allgemeine und Spezielle Pathologie. In: Martin W, Riede U-N, editors. *Allgemeine und Spezielle Pathologie.* 2. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2017. p. 227–278.
7. Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res.* 1999;59(6):1295–1300.
8. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, Groom AC. Multistep nature of metastatic inefficiency: Dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol.* 1998;153(3):865–873.
9. Li N. Platelets in cancer metastasis: To help the “villain” to do evil. *Int J Cancer.* 2016;138(9):2078–2087.
10. Blockmans D, Deckmyn H, Vermeylen J. Platelet activation. *Blood Rev.* 1995;9:142–156.
11. Menter DG, Kopetz S, Hawk E, Sood AK, Loree JM, Gresele P, Honn KV. Platelet “first responders” in wound response, cancer, and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(2):199–213.
12. Harker LA, Finch CA. Thrombokinetics in man. *J Clin Invest.* 1969;48(6):963–974.
13. Rondina MT, Weyrich AS. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. *J Thromb Haemost.* 2015;13(1):26–32.
14. Provost P. The clinical significance of platelet microparticle-associated microRNAs. *Clin*

- Chem Lab Med. 2017;55(5):657–666.
15. Gremmel T, Frelinger AL, Michelson AD. Platelet physiology. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):191–204.
  16. Rivera J, Lozano ML, Navarro-Núñez L, Vicente García V. Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica.* 2009;94(5):700–711.
  17. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011;25(4):155–167.
  18. Stenberg PE, Shuman MA, Levine SP, Bainton DF. Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets. *J Cell Biol.* 1984;98(2):748–760.
  19. Morgenstern E, Neumann K, Patscheke H. The exocytosis of human blood platelets. A fast freezing and freeze-substitution analysis. *Eur J Cell Biol.* 1987;43(2):273–282.
  20. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol.* 2009;19(2):43–51.
  21. Freyssinet JM, Toti F. Formation of procoagulant microparticles and properties. *Thromb Res.* 2010;125(1):46–48.
  22. Siljander PRM. Platelet-derived microparticles – an updated perspective. *Thromb Res.* 2011;127(2):30–33.
  23. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(8):581–593.
  24. Heijnen HFG, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles. *Blood J.* 1999;94(11):3791–3800.
  25. Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res.* 2005;4(5):1516–1521.
  26. Ribatti D, Crivellato E. Giulio Bizzozero and the discovery of platelets. *Leuk Res.* 2007;31(10):1339–1341.
  27. Schneider SW, Nuschele S, Wixforth A, Gorzelanny C, Alexander-Katz A, Netz RR, Schneider MF. Shear-induced unfolding triggers adhesion of von Willebrand factor fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(19):7899–7903.
  28. Santos-Martínez MJ, Medina C, Jurasz P, Radomski MW. Role of metalloproteinases in platelet function. *Thromb Res.* 2008;121(4):535–542.

29. Gachet C. P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost.* 2008;99(3):466–472.
30. Nakahata N. Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2008;118(1):18–35.
31. Niccoli G, Giubilato S, Russo E, Spaziani C, Leo A, Porto I, Leone AM, Burzotta F, Riondino S, Pulcinelli F, Biasucci LM, Crea F. Plasma levels of thromboxane A2 on admission are associated with no-reflow after primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 2008;29(15):1843–1850.
32. Gasparyan AY, Watson T, Lip GYH. The role of aspirin in cardiovascular prevention: Implications of aspirin resistance. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(19):1829–1843.
33. Crawley JTB, Zanardelli S, Chion CKNK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007;5(SUPPL. 1):95–101.
34. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1800–1814.
35. Plow EF, Byzova T. The biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Coron Artery Dis.* 1999;10(8):547–551.
36. Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B. Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood.* 2004;104(10):3190–3197.
37. Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med.* 2003;197(11):1585–1598.
38. André P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol.* 2004;126(3):298–306.
39. Romo GM, Dong J-F, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, López JA. The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 1999;190(6):803–813.
40. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(13):5193–5197.
41. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol.* 1987;92(1):181–187.



42. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JHF, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, Hajjar KA, Posnett DN, Schoenborn MA, Schooley KA, Gayle RB, Maliszewski CR. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1351–1360.
43. Toda S, Nishi C, Yanagihashi Y, Segawa K, Nagata S. Clearance of apoptotic cells and pyrenocytes. *Curr Top Dev Biol.* 2015;114:267–295.
44. Rand ML, Wang H, Bang KWA, Poon KSV, Packham MA, Freedman J. Procoagulant surface exposure and apoptosis in rabbit platelets: Association with shortened survival and steady-state senescence. *J Thromb Haemost.* 2004;2(4):651–659.
45. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochim Biophys Acta.* 1983;736(1):57–66.
46. Kelly S, Deng X, Hoppe C, Styles L. 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.* 2015;171(2):288–290.
47. Olsson M, Bruhns P, Frazier WA, Ravetch JV, Oldenborg PA. Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood.* 2005;105(9):3577–3582.
48. Maugeri N, Rovere-Querini P, Evangelista V, Covino C, Capobianco A, Bertilaccio MTS, Piccoli A, Totani L, Cianflone D, Maseri A, Manfredi AA. Neutrophils phagocytose activated platelets in vivo: A phosphatidylserine, P-selectin, and  $\beta 2$  integrin-dependent cell clearance program. *Blood.* 2009;113(21):5254–5265.
49. Kirschbaum M, Karimian G, Adelmeijer J, Giepmans BNG, Porte RJ, Lisman T. Horizontal RNA transfer mediates platelet-induced hepatocyte proliferation. *Blood.* 2015;126(6):798–806.
50. Trousseau A. Phlegmasia alba dolens. In: Baillièrre J-B, editor. *Clinique Médicale de L'hôtel-dieu de Paris.* 2nd ed. Paris; 1865. p. 654–712.
51. Sørensen HT, Mellekjær L, Steffensen FH, Olsen JH, Nielsen GL. The risk of a diagnosis of cancer after primary deep venous thrombosis or pulmonary embolism. *N Engl J Med.* 1998;338(17):1169–1173.
52. Gasic GJ, Gasic TB, Stewart CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci.* 1968;61(1):46–52.
53. Thiery JP. Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442–454.

54. Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat.* 1995;154(1):8–20.
55. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420–1428.
56. Trimboli AJ, Fukino K, De Bruin A, Wei G, Shen L, Tanner SM, Creasap N, Rosol TJ, Robinson ML, Eng C, Ostrowski MC, Leone G. Direct evidence for epithelial-mesenchymal transitions in breast cancer. *Cancer Res.* 2008;68(3):937–945.
57. Oft M, Heider K-H, Beug H. TGF $\beta$  signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol.* 1998;8(23):1243–1252.
58. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. *Cancer Cell.* 2011;20(5):576–590.
59. Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int J Dev Biol.* 2004;48(5–6):365–375.
60. Medici D, Hay ED, Olsen BR, Bronner-Fraser M. Snail and Slug promote epithelial-mesenchymal transition through beta-catenin-T-cell factor-4-dependent expression of transforming growth factor-beta3. *Mol Biol Cell.* 2008;19(11):4875–4887.
61. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004;117(7):927–939.
62. Zhang J, Liang Q, Lei Y, Yao M, Li L, Gao X, Feng J. SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. *Cancer Res.* 2012;72(17):4597–4608.
63. Miyashita T, Tajima H, Makino I, Nakagawara H, Kitagawa H, Fushida S, Harmon JW, Ohta T. Metastasis-promoting role of extravasated platelet activation in tumor. *J Surg Res.* 2015;193(1):289–294.
64. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, Bell DW, Irimia D, Ulkus L, Smith MR, Kwak EL, Digumarthy S, Muzikansky A, Ryan P, Balis UJ, Tompkins RG, Haber DA, Toner M. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature.* 2007;450(7173):1235–1239.
65. Berezovskaya O, Schimmer AD, Glinskii AB, Pinilla C, Hoffman RM, Reed JC, Glinsky GV. Increased expression of apoptosis inhibitor protein XIAP contributes to anoikis resistance of circulating human prostate cancer metastasis precursor cells. *Cancer Res.* 2005;65(6):2378–2386.

66. Cao Z, Livas T, Kyprianou N. Anoikis and EMT: Lethal “liaisons” during cancer progression. *Crit Rev Oncog*. 2016;21(3–4):155–168.
67. Haemmerle M, Taylor ML, Gutschner T, et al. Platelets reduce anoikis and promote metastasis by activating YAP1 signaling. *Nat Commun*. 2017;8(1):310.
68. Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J. Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell*. 2012;22(6):725–736.
69. Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, Blick T, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res*. 2006;66(23):11271–11279.
70. Liotta LA. Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am*. 1992;266(2):54-59+62-63.
71. Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, et al. Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*. 2004;10(24):8152–8162.
72. Stone JP, Wagner DD. P-Selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *Clin Invest*. 1993;92(2):804–813.
73. Mannori G, Cecconi O, Hanasaki K, Nelson RM, Bevilacqua MP, Crottet P, Varki A, Aruffo A. Differential colon cancer cell adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of mucin-type glycoproteins. *Cancer Res*. 1995;55(19):4425–4431.
74. Kim YJ, Borsig L, Varki NM, Varki A. P-selectin deficiency attenuates tumor growth and metastasis. *Cell Biol*. 1998;95:9325–9330.
75. Liebsch AG, Schillers H. Quantification of heparin’s antimetastatic effect by single-cell force spectroscopy. *J Mol Recognit*. 2020;34(1):1–11.
76. Stevenson JL, Choi SH, Varki A. Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins - Correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity. *Clin Cancer Res*. 2005;11(19):7003–7011.
77. Varki NM, Varki A. Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: Rationale for clinical studies in humans. *Semin Thromb Hemost*. 2002;28(1):53–66.
78. Borsig L, Wong R, Feramisco J, Nadeau DR, Varki NM, Varki A. Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci*. 2001;98(6):3352–3357.

79. Gong L, Cai Y, Zhou X, Yang H. Activated platelets interact with lung cancer cells through P-selectin glycoprotein ligand-1. *Pathol Oncol Res.* 2012;18(4):989–996.
80. Hanna N. The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis. *Biochim Biophys Acta.* 1985;780(3):213–226.
81. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112(3):461–469.
82. Placke T, Örgel M, Schaller M, Jung G, Rammensee HG, Kopp HG, Salih HR. Platelet-derived MHC class I confers a pseudonormal phenotype to cancer cells that subverts the antitumor reactivity of natural killer immune cells. *Cancer Res.* 2012;72(2):440–448.
83. Egan K, Cooke N, Kenny D. Living in shear: Platelets protect cancer cells from shear induced damage. *Clin Exp Metastasis.* 2014;31(6):697–704.
84. Dardik R, Kaufmann Y, Savion N, Rosenberg N, Shenkman B, Varon D. Platelets mediate tumor cell adhesion to the subendothelium under flow conditions: Involvement of platelet GPIIb-IIIa and tumor cell  $\alpha(v)$  integrins. *Int J Cancer.* 1997;70(2):201–207.
85. McCarty OJ, Mousa SA, Bray PF, Konstantopoulos K. Immobilized platelets support human colon carcinoma cell tethering, rolling, and firm adhesion under dynamic flow conditions. *Blood.* 2000;96(5):1789–1797.
86. Mojiri A, Stoletov K, Carrillo MAL, Willetts L, Jain S, Godbout R, Jurasz P, Sergi CM, Eisenstat DD, Lewis JD, Jahroudi N. Functional assessment of von Willebrand factor expression by cancer cells of non-endothelial origin. *Oncotarget.* 2017;8(8):13015–13029.
87. Schumacher D, Strlic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell.* 2013;24(1):130–137.
88. Alonso-Escolano D, Medina C, Cieslik K, Radomski A, Jurasz P, Santos-Martínez MJ, Jiffar T, Ruvolo P, Radomski MW. Protein kinase C $\delta$  mediates platelet-induced breast cancer cell invasion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318(1):373–380.
89. Akhtar M, Haider A, Rashid S, Al-Nabet ADMH. Paget’s “seed and soil” theory of cancer metastasis: An idea whose time has come. *Adv Anat Pathol.* 2019;26(1):69–74.
90. Labelle M, Begum S, Hynes RO. Platelets guide the formation of early metastatic niches. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(30):E3053–E3061.
91. Kerr BA, McCabe NP, Feng W, Byzova TV. Platelets govern pre-metastatic tumor communication to bone. *Bone.* 2011;23(1):1–7.

92. Sabrkhany S, Griffioen AW, Oude Egbrink MGA. The role of blood platelets in tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2011;1815(2):189–196.
93. Ho-Tin-Noé B, Goerge T, Cifuni SM, Duerschmied D, Wagner DD. Platelet granule secretion continuously prevents intratumor hemorrhage. *Cancer Res*. 2008;68(16):6851–6858.
94. Battinelli EM, Markens BA, Kulenthirarajan RA, Machlus KR, Flaumenhaft R, Italiano JE. Anticoagulation inhibits tumor cell-mediated release of platelet angiogenic proteins and diminishes platelet angiogenic response. *Blood*. 2014;123(1):101–113.
95. Menter DG, Tucker SC, Kopetz S, Sood AK, Crissman JD, Honn K. Platelets and cancer: A casual or causal relationship: Revisited. *Cancer Metastasis Rev*. 2014;33(1):231–269.
96. Yan MJ, Jurasz P. The role of platelets in the tumor microenvironment: From solid tumors to leukemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(3):392–400.
97. Plantureux L, Mège D, Crescence L, Dignat-George F, Dubois C, Panicot-Dubois L. Impacts of cancer on platelet production, activation and education and mechanisms of cancer-associated thrombosis. *Cancers (Basel)*. 2018;10(11):1–23.
98. Digkila A, Voutsadakis IA. Thrombocytosis as a prognostic marker in gastrointestinal cancers. *Obstet Gynecol Sci*. 2014;57(6):457–463.
99. Buergy D, Wenz F, Groden C, Brockmann MA. Tumor-platelet interaction in solid tumors. *Int J Cancer*. 2012;130(12):2747–2760.
100. Al-Mondhiry H. Beta-thromboglobulin and platelet-factor 4 in patients with cancer: Correlation with the stage of disease and the effect of chemotherapy. *Am J Hematol*. 1983;14(2):105–111.
101. Ay C, Pabinger I. Predictive potential of haemostatic biomarkers for venous thromboembolism in cancer patients. *Thromb Res*. 2012;129(1):6–9.
102. Hanke AA, Roberg K, Monaca E, Sellmann T, Weber CF, Rahe-Meyer N, Görlinger K. Impact of platelet count on results obtained from multiple electrode platelet aggregometry (multiplate™). *Eur J Med Res*. 2010;15(5):214–219.
103. Suzuki A, Takahashi T, Nakamura K, Tsuyuoka R, Okuno Y, Enomoto T, Fukumoto M, Imura H. Thrombocytosis in patients with tumors producing colony-stimulating factor. *Blood*. 1992;80(8):2052–2059.
104. Stone RL, Nick AM, McNeish IA, et al. Paraneoplastic thrombocytosis in ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(7):610–618.

105. Sasaki Y, Takahashi T, Miyazaki H, Matsumoto A, Kato T, Nakamura K, Iho S, Okuno Y, Nakao K. Production of thrombopoietin by human carcinomas and its novel isoforms. *Blood*. 1999;94(6):1952–1960.
106. Hara Y, Steiner M, Baldini MG. Characterization of the platelet-aggregating activity of tumor cells. *Cancer Res*. 1980;40(4):1217–1222.
107. Heinmöller E, Weinel RJ, Heidtmann HH, Salge U, Seitz R, Schmitz I, Müller KM, Zirngibl H. Studies on tumor-cell-induced platelet aggregation in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1996;122(12):735–744.
108. Chiang H, Swaim MW, Huang T. Characterization of platelet aggregation induced by human colon adenocarcinoma cells and its inhibition by snake venom peptides, trigramin and rhodostomin. *Br J Haematol*. 1994;87(2):325–331.
109. De Leval X, Benoit V, Delarge J, Julémont F, Masereel B, Pirotte B, Merville MP, David JL, Dogné JM. Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (II/II). Effects of BM-567 on osteogenic sarcoma-cell-induced platelet aggregation. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2003;68(1):55–59.
110. Nie D, Lamberti M, Zacharek A, Li L, Szekeres K, Tang K, Chen Y, Honn KV. Thromboxane A<sub>2</sub> regulation of endothelial cell migration, angiogenesis, and tumor metastasis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;267(1):245–251.
111. Bastida E, Almirall L, Ordinas A. Tumor-cell-induced platelet aggregation is a glycoprotein-dependent and lipoxygenase-associated process. *Int J Cancer*. 1987;39(6):760–763.
112. Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: Emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol*. 2012;3(283):1–11.
113. Bertozzi CC, Schmaier AA, Mericko P, et al. Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2-SLP-76 signaling. *Blood*. 2010;116(4):661–670.
114. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*. 2005;166(3):913–921.
115. Kato Y, Sasagawa I, Kaneko M, Osawa M, Fujita N, Tsuruo T. Aggrus: A diagnostic marker that distinguishes seminoma from embryonal carcinoma in testicular germ cell tumors. *Oncogene*. 2004;23(52):8552–8556.
116. Shuo W, Ying Z, Weihong C, Jie L, Yuren Z, Huiting F, Yonggang X, Hongsheng L. Breast cancer stem-like cells can promote metastasis by activating platelets and down-regulating

- antitumor activity of natural killer cells. *J Tradit Chinese Med.* 2016;36(4):530–537.
117. Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321(5897):1807–1812.
  118. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2019;366(10):883–892.
  119. Furth J, Kahn MC. The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am J Cancer.* 1937;31(2):276–282.
  120. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976;194(4260):23–28.
  121. Clevers H. The cancer stem cell: Premises, promises and challenges. *Nat Med.* 2011;17(3):313–319.
  122. Peitzsch C, Tyutyunnykova A, Pantel K, Dubrovskaya A. Cancer stem cells: The root of tumor recurrence and metastases. *Semin Cancer Biol.* 2017;44:10–24.
  123. Bruce WR, van der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature.* 1963;199:79–80.
  124. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2001;414:105–111.
  125. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dickl JE. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367:645–648.
  126. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: Cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell.* 2009;138(5):822–829.
  127. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med.* 2017;23(10):1124–1134.
  128. Koren E, Fuchs Y. The bad seed: Cancer stem cells in tumor development and resistance. *Drug Resist Updat.* 2016;28:1–12.
  129. Greaves M. Cancer stem cells as “units of selection.” *Evol Appl.* 2013;6(1):102–108.
  130. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. Cancer stem cells - Perspectives on current status and future directions: AACR workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* 2006;66(19):9339–9344.
  131. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature.* 2012;488(7412):527–530.

132. Dick JE, Bonnet D. Human acute myeloid leukaemia is organised as a hierarchy that originates from a primitive haematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3(7):730–737.
133. Ishizawa K, Rasheed ZA, Karisch R, Wang Q, Kowalski J, Susky E, Pereira K. Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell.* 2010;7(3):279–282.
134. Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, Fullen DR, Johnson TM, Morrison SJ. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature.* 2008;456(7222):593–598.
135. Barker N, Van Es JH, Kuipers J, Kujala P, Van Den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene *Lgr5*. *Nature.* 2007;449(7165):1003–1007.
136. Sato T, Van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, Van Den Born M, Barker N, Shroyer NF, Van De Wetering M, Clevers H. Paneth cells constitute the niche for *Lgr5* stem cells in intestinal crypts. *Nature.* 2011;469(7330):415–418.
137. De Sousa E Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, Anderson JE, Storm EE, Modrusan Z, Koeppen H, Dijkgraaf GJP, Piskol R, De Sauvage FJ. A distinct role for *Lgr5* + stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature.* 2017;543(7647):676–680.
138. Schwitalla S, Fingerle AA, Cammareri P, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties. *Cell.* 2013;152:25–38.
139. Suvà ML, Rheinbay E, Gillespie SM, et al. Reconstructing and reprogramming the tumor-propagating potential of glioblastoma stem-like cells. *Cell.* 2014;157(3):580–594.
140. Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704–715.
141. Ye X, Tam WL, Shibue T, Kaygusuz Y, Reinhardt F, Ng Eaton E, Weinberg RA. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature.* 2015;525(7568):256–260.
142. Beck B, Lapouge G, Rorive S, Drogat B, Desaedelaere K, Delafaille S, Dubois C, Salmon I, Willekens K, Marine JC, Blanpain C. Different levels of *Twist1* regulate skin tumor initiation, stemness, and progression. *Cell Stem Cell.* 2015;16(1):67–79.
143. Celià-Terrassa T, Kang Y. Metastatic niche functions and therapeutic opportunities. *Nat Cell Biol.* 2018;20(8):868–877.



144. Chen J, Li Y, Yu T-S, McKay RM, Burns D, Kernie SG, Parada LF. A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy. *Nature*. 2012;488(7412):522–526.
145. Zhuo W, Wang Y, Zhuo X, Zhang Y, Ao X, Chen Z. Knockdown of Snail, a novel zinc finger transcription factor, via RNA interference increases A549 cell sensitivity to cisplatin via JNK/mitochondrial pathway. *Lung Cancer*. 2008;62(1):8–14.
146. Creighton CJ, Li X, Landis M, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(33):13820–13825.
147. Oshimori N, Oristian D, Fuchs E. TGF- $\beta$  promotes heterogeneity and drug resistance in squamous cell carcinoma. *Cell*. 2015;160(5):963–976.
148. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: Role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):48–58.
149. Bram EE, Ifergan I, Grimberg M, Lemke K, Skladanowski A, Assaraf YG. C421 allele-specific ABCG2 gene amplification confers resistance to the antitumor triazoloacridone C-1305 in human lung cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(1):41–53.
150. Wu C, Alman BA. Side population cells in human cancers. *Cancer Lett*. 2008;268(1):1–9.
151. Song J, Chang I, Chen Z, Kang M, Wang CY. Characterization of side populations in HNSCC: Highly invasive, chemoresistant and abnormal Wnt signaling. *PLoS One*. 2010;5(7):1–9.
152. Abbaszadegan MR, Bagheri V, Razavi MS, Momtazi AA, Sahebkar A, Gholamin M. Isolation, identification, and characterization of cancer stem cells: A review. *J Cell Physiol*. 2017;232(8):2008–2018.
153. Balla MMS, Yadav HD, Pandey BN. Tumorsphere assay provides a better in vitro method for cancer stem-like cells enrichment in A549 lung adenocarcinoma cells. *Tissue Cell*. 2019;60:21–24.
154. Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. Eyes wide open: A critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell*. 2011;8(5):486–498.
155. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707–1710.
156. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004;432(7015):396–401.

157. Dimakakos EP, Vathiotis I, Syrigos K. The role of tinzaparin in oncology. *Clin Appl Thromb.* 2018;24(5):697–707.
158. Martins Castanheira N, Spanhofer AK, Wiener S, Bobe S, Schillers H. Uptake of platelets by cancer cells and recycling of the platelet protein CD42a. *J Thromb Haemost.* 2021;00:1–12.
159. Hoy SM, Scott LJ, Plosker GL. Tinzaparin Sodium: A review of its use in the prevention and treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism, and in the prevention of clotting in the extracorporeal circuit during haemodialysis. *Drugs.* 2010;70(10):1319–1347.
160. Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood.* 1993;82(11):3253–3258.
161. Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(16):7390–7397.
162. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(8):563–572.
163. Maurer W. SystemPhysik [Internet]. 2007 [cited 2020 Jun 4]. Available from: <https://www.systemdesign.ch/wiki/Blutkreislauf>
164. World Medical Association. World Medical Association declaration of Helsinki: Ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA.* 2013;310(20):2191–2194.
165. Leo Pharma GmbH. Fachinformation innohep® 20.000 Anti-Xa I.E./ml Fertigspritzen Injektionslösung. 2016. 1–4 p.
166. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik [Internet]. 2018 [cited 2020 Nov 14]. Available from: [https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene\\_anzahl.html;jsessionid=5C965D808AFDD99E5906F6D75373AE72.internet8722](https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/gestorbene_anzahl.html;jsessionid=5C965D808AFDD99E5906F6D75373AE72.internet8722)
167. Finley MJ, Rauova L, Alferiev IS, Weisel JW, Levy RJ, Stachelek SJ. Diminished adhesion and activation of platelets and neutrophils with CD47 functionalized blood contacting surfaces. *Biomaterials.* 2012;33(24):5803–5811.
168. Grissmer S. Blutkreislauf. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, Hoth M, Kurtz A, Leipziger J, Müller F, Pedain C, Rettig J, Wagner C, Wischmeyer E, editors. *Duale Reihe Physiologie.* 3. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. p. 117–130.
169. Butler TP, Gullino PM. Quantitation of cell shedding into efferent blood of mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1975;35(3):512–516.

170. Yu M, Stott S, Toner M, Maheswaran S, Haber DA. Circulating tumor cells: Approaches to isolation and characterization. *J Cell Biol.* 2011;192(3):373–382.
171. Neumann MHD, Bender S, Krahn T, Schlange T. ctDNA and CTCs in liquid biopsy – Current status and where we need to progress. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018;16:190–195.
172. Khetawat G, Faraday N, Nealen ML, Vijayan KV, Bolton E, Noga SJ, Bray PF. Human megakaryocytes and platelets contain the estrogen receptor beta and androgen receptor (AR): testosterone regulates AR expression. *Blood.* 2000;95(7):2289–2296.
173. Berlin G, Hammar M, Tapper L, Tynngård N. Effects of age, gender and menstrual cycle on platelet function assessed by impedance aggregometry. *Platelets.* 2019;30(4):473–479.
174. Statistisches Bundesamt. Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebs [Internet]. 2018 [cited 2020 Jun 23]. Available from: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/sterbefaelle-krebs-insgesamt.html>
175. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013;63(1):11–30.
176. Sung JM, Cho HJ, Yi H, Lee CH, Kim HS, Kim DK, Abd El-Aty AM, Kim JS, Landowski CP, Hediger MA, Shin HC. Characterization of a stem cell population in lung cancer A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;371(1):163–167.
177. Satonaka H, Kusuzaki K, Akeda K, Tsujii M, Iino T, Uemura T, Matsubara T, Nakamura T, Asanuma K, Matsumine A, Sudo A. More than 45% of A549 and H446 cells are cancer initiating cells: Evidence from cloning and tumorigenic analyses. *Anticancer Res.* 2011;31(12):4163–4168.
178. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506–5511.
179. Louis SA, Rietze RL, Deleyrolle L, Wagey RE, Thomas TE, Eaves AC, Reynolds BA. Enumeration of neural stem and progenitor cells in the neural colony-forming cell assay. *Stem Cells.* 2008;26(4):988–996.
180. Zhang Q, Wang H, Wu X, Liu B, Liu W, Wang R, Liang X, Ma C, Gao L. TIM-4 promotes the growth of non-small-cell lung cancer in a RGD motif-dependent manner. *Br J Cancer.* 2015;113(10):1484–1492.
181. Wang M, Petersen NO. Lipid-coated gold nanoparticles promote lamellar body formation in A549 cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2013;1831(6):1089–1097.

182. Kruth HS, Chang J, Ifrim I, Zhang WY. Characterization of patocytosis: Endocytosis into macrophage surface-connected compartments. *Eur J Cell Biol.* 1999;78(2):91–99.
183. Motskin M, Müller KH, Genoud C, Monteith AG, Skepper JN. The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment. *Biomaterials.* 2011;32(35):9470–9482.
184. Risitano A, Beaulieu LM, Vitseva O, Freedman JE. Platelets and platelet-like particles mediate intercellular RNA transfer. *Blood.* 2012;119(26):6288–6295.
185. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol.* 2001;3:339–346.
186. Goubran H, Sabry W, Kotb R, Seghatchian J, Burnouf T. Platelet microparticles and cancer: An intimate cross-talk. *Transfus Apher Sci.* 2015;53(2):168–172.
187. Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer. *Int J Cancer.* 2005;113(5):752–760.
188. Dashevsky O, Varon D, Brill A. Platelet-derived microparticles promote invasiveness of prostate cancer cells via upregulation of MMP-2 production. *Int J Cancer.* 2009;124(8):1773–1777.
189. Laffont B, Corduan A, Pél H, Duchez AC, Cloutier N, Boilard E, Provost P. Activated platelets can deliver mRNA regulatory Ago2•microRNA complexes to endothelial cells via microparticles. *Blood.* 2013;122(2):253–261.
190. Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. *Biochem Cell Biol.* 2013;44(12):2144–2151.
191. Sato R, Semba T, Saya H, Arima Y. Concise review : Stem cells and epithelial-mesenchymal transition in cancer: Biological implications and therapeutic targets. *Stem Cells.* 2016;34:1997–2007.
192. Friedl P, Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(7):445–457.
193. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 2000;407:249–257.
194. Xu XR, Yousef GM, Ni H. Cancer and platelet crosstalk: Opportunities and challenges of aspirin and other antiplatelet agents. *Blood.* 2018;131(16):1777–1789.
195. Prof. Dr. A. Encke, Prof. Dr. S. Haas PDIK et al. S3-Leitlinie Prophylaxe der venösen

- Thrombembolie. Leitlinienkommission der Dtsch Gesellschaft für Unfallchirurgie eV. 2015;(003):1–238.
196. Rothwell PM, Wilson M, Price JF, Belch JFF, Meade TW, Mehta Z. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials. *Lancet*. 2012;379:1591–1601.
197. Engelberg H. Actions of heparin that may affect the malignant process. *Cancer*. 1999;85(2):257–272.
198. Boukerche H, Berthier-Vergnes O, Tabone E, Doré J-F, Leung LLK, McGregor JL. Platelet-melanoma cell interaction is mediated by the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood*. 1989;74(2):658–663.
199. Karpatkin S, Pearlstein E, Ambrogio C, Collier BS. Role of adhesive proteins in platelet tumor interaction in vitro and metastasis formation in vivo. *J Clin Invest*. 1988;81(4):1012–1019.

## Danksagung

Allen voran möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hermann Schillers danken, dass er mir dieses spannende und vielseitige Projekt anvertraut hat. Seine stets offene Tür mit dem Resultat zahlreicher anregender Gespräche in ungezwungener Atmosphäre haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gebührt Prof. Dr. Johannes Eble, für die gute Kooperation und die freundliche Bereitstellung der zur Durchführung der Experimente entscheidenden Geräte.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Angestellten des Instituts für Physiologie II bedanken. Keine Frage blieb lange unbeantwortet. Besonders Sergej Handel möchte ich für seine unerschütterliche Geduld und stetige Hilfsbereitschaft an dieser Stelle hervorheben. Auch meine Kommilitonin und Mitdotorandin Stefanie Bobe schaffte es stets, mir die Augen für neue Aspekte der Forschungsmaterie zu öffnen.

Darüber hinaus möchte ich den Einsatz der Menschen hochhalten, die mich außerhalb der Universität liebevoll unterstützten. Als Erstes meinen Eltern, die neben ihrer seelsorgerischen Leistung auch durch ihre fachliche Kompetenz eine große Hilfe darstellten. Meinem Kommilitonen Flavio Teipel, der mit seiner unerreichten Fähigkeit, Probleme zu benennen, um sie anschließend auch zu lösen, mich nachts ruhiger schlafen ließ. Jana Katharina Schmitz, die ihr künstlerisches Talent bereitwillig teilte und die Abbildungen dieser Arbeit auf eine andere Ebene hob. Daniel Zhou, dafür dass er mich das Schreiben lehrte. Nina Engel für 24 Stunden Volleinsatz. Larissa Harder, für die Lektüre der Arbeit ohne medizinische Vorbelastung und damit die Sicherstellung ihrer Verständlichkeit. Und natürlich allen anderen, die sich meiner auf diesem langen Weg angenommen haben.

