

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Schuff-Werner

**Thrombinrezeptorexpression und –funktionalität
maligner Pankreaszellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Benjamin Bohn
Rostock, 2011

Datum der öffentlichen Verteidigung: 17.04.2012

- | | |
|---------------|---|
| Dekan | Prof. Dr. E. C. Reisinger
Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Innere Medizin |
| 1. Gutachter: | Priv.-Doz. Dr. med. M. Steiner
Medizinisches Labor Rostock |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. med. C. Junghanß
Universitätsmedizin Rostock
Zentrum für Innere Medizin |
| 3. Gutachter: | Prof. Dr. med. F. Gieseler
Universität zu Lübeck
Medizinische Klinik I |

Meinem Großvater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1.	Das Pankreaskarzinom – ein Überblick	01
1.2.	Klinische Onkohämostaseologie des Pankreaskarzinoms	04
1.3.	Protease-Activated Receptors (PARs) als zelluläre Thrombinrezeptoren	10
1.3.1.	Signalübertragung und Wirkung der PARs	11
1.3.2.	Alternative Oberflächenbindungsstellen von Thrombin	15
1.4.	Thrombin, PARs und Malignität	16
1.5.	RNA-Interferenz (RNAi)	18
1.6.	Aufgabenstellung	22

2. Material und Methoden

2.1.	Zellkultur	23
2.2.	RNA-Isolierung und RT-PCR	24
2.3.	Durchflusszytometrie	27
2.4.	Proliferationsanalyse	28
2.5.	Transfektion mit siRNA	30
2.5.1.	Transfektion adhärenter Zellen	30
2.5.2.	Doppelte Transfektion einer Zellsuspension	30
2.5.3.	Herstellung von siRNA gegen PAR-1	31
2.6.	Immunoassay (ELISA)	32
2.7.	Statistik	33

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Thrombinrezeptoren und Thrombin-assoziiertes Proteine	34
3.1.1. Thrombinrezeptorexpression	34
3.1.1.1. PAR-1	34
3.1.1.2. PAR-3	38
3.1.1.3. PAR-4	39
3.1.2. Expression Thrombin-assoziiertes Proteine	40
3.1.2.1. Thrombomodulin	40
3.1.2.2. Glykoprotein Iba	43
3.2. Thrombinwirkung auf das Proliferationsverhalten maligner Pankreaszelllinien	44
3.3. RNA-silencing des Gens PAR-1	50
3.4. Thrombinwirkung auf die Sekretion von Wachstums- und Angiogenesefaktoren	56
3.4.1. Interleukin-6	56
3.4.2. Interleukin-8	57
3.4.3. Vascular Endothelium Growth Factor	58

4. Diskussion

4.1. Expression der Thrombinrezeptoren und Thrombin-assoziiertes Proteine	59
4.1.1. Expression der Protease-Activated Receptors (PARs)	59
4.1.2. Expression von Thrombomodulin und fehlende Expression von Glykoprotein Iba	63
4.2. Einfluss von Thrombin auf das Wachstumsverhalten maligner Pankreaszellen	64
4.3. RNAi von PAR-1 mit funktioneller Konsequenz für die Zytokinsekretion	69

5. Zusammenfassung	75
6. Literaturverzeichnis	77
Abkürzungen	95
Thesen	
Danksagung	

1. Einleitung

1.1. Das Pankreaskarzinom – ein Überblick

Karzinome, bösartige Proliferationen epithelialer Herkunft, lassen sich nach Gesichtspunkten wie Wuchsform (bsp. exophytisch/endophytisch) oder phänotypischer, histologischer Klassifikation (z.B. Plattenepithelkarzinom, Drüsenepithel-(Adeno-)karzinom, undifferenziertes Karzinom) einteilen. Die maligne Potenz von Karzinomen entspringt ihren Eigenschaften des ungehemmten Wachstums und der Proliferation, ihrer Apoptoseresistenz, der Neoangiogenese, die sie betreiben, der Gewebeeinfiltration und Gewebeeinvasion sowie der Absiedelung von Metastasen [1-2].

Das Pankreaskarzinom, der dritthäufigste maligne Tumor des Verdauungstraktes nach Kolon- und Magenkarzinom, ist in über 90% der Fälle ein Adenokarzinom. Hiervon ist bei ungefähr 90% der Fälle das Epithel der kleinen Pankreasgänge (duktales Adenokarzinom) und bei ca. 10% das Azinusepithel (azinäres Adenokarzinom) Ausgangsgewebe [3].

Epidemiologische Daten weisen für das Pankreaskarzinom eine besonders hohe maligne Potenz aus: Im Jahr 2010 kam es in den USA zu 43.100 Neuerkrankungen. Im gleichen Jahr starben 36.800 Patienten an einem Pankreaskarzinom, bei einer Mortalität von 9.48 auf 100.000 Einwohner. Diese ist im Vergleich zu 1991 (9.28) als relativ konstant anzusehen. Damit liegt das Pankreaskarzinom an vierter Stelle der Todesursachenstatistik hinter Bronchial-, Prostata- und Kolorektalem Karzinom. Es tritt vor allem bei älteren Patienten (über 60 Jahre) auf und hat insgesamt eine 5-Jahresüberlebensrate von ca. 6% [4].

Trotz großer Anstrengungen Umweltfaktoren für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms zu detektieren, existieren bislang nur evidente Daten für Tabakkonsum, der das Risiko für das Pankreaskarzinom mindestens verdoppelt [5]. Sogar für den passiven Konsum von Zigarettenrauch wurde ein Zusammenhang zum Pankreaskarzinom hergestellt [6]. Weitere Risikofaktoren sind Übergewicht, Alter jenseits der 65, eine positive Familienanamnese, Diabetes mellitus und das Auftreten einer chronischen Pankreatitis [5, 7].

Weiterhin hat die genetische Disposition einen starken Bezug zur Entstehung der malignen Entartung. So hat die Diagnose der hereditären Pankreatitis, eine Mutation des Trypsinogen-Gens auf Chromosom 7q35 (PRSS 1), ein 50-fach erhöhtes Risiko mit einem kumulativen Gesamtrisiko von 40% bis zum 70. Lebensjahr. Aber auch das Peutz-Jeghers-Syndrom (Gen: STK 11) hat ein erhöhtes relatives Risiko [8].

Als Vorläuferläsion des duktales Pankreaskarzinoms wird die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) beschrieben. Diese wird in drei aufeinanderfolgende Stadien (Grad 1-3) eingeteilt. Im Anfangsstadium ist sie gekennzeichnet durch flache Epithelläsionen mit geringgradigen Architekturveränderungen. Im PanIN 3-Stadium bestehen schwere Zellatypien, teilweise mit fokalen Nekrosen, atypischen Mitosen und Kernanomalien, entsprechend einem Carcinoma in situ [9].

Parallel zu den mikroskopischen Epithelveränderungen kommt es zur Akkumulation von genetischen Mutationen, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung von Onkogenen führen [10]. Interessanterweise zeigt sich, dass bestimmte Mutationen eher in frühen Stadien (KRAS2), weitere in Intermediärstadien (p16/CDKN2A) und andere in Spätstadien der Karzinogenese (DPC-4, TP53) auftreten. Bei nahezu allen Pankreaskarzinompatienten ist zumindest eines der angesprochenen Gene, häufig mehrere, mutiert [11]. Aktivierende Mutationen im KRAS2 Onkogen, die zu Proliferation und gesteigertem Überleben führen, weisen 95% der Patienten auf. Bei der gleichen Zahl von Patienten kommt es zu einer Inaktivierung von CDKN2A, wodurch der Zellzyklusregulator p16 verloren geht. Durch eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 – in 50 bis 75% der Fälle – erlangt der Tumor die Fähigkeit der Apoptoseresistenz. Bei der Hälfte der Patienten geht DPC-4 verloren, was zu einer aberranten Aktivierung des transforming growth factor β (TGF- β) führt. Weitere Mutationen in den Tumorsuppressorgenen ARPC5 und INK4A sind beschrieben [10-15].

Außerdem ist die Bildung von Wachstumsfaktoren, wie die der EGF-Rezeptorfamilie, stark erhöht und diese Überexpression hat eine positive

Korrelation mit der Tumorinvasion, mit einem ansteigenden Potential zur Metastasierung und einer schlechteren Prognose [16].

Zusammenfassend ist die genetische Entstehung des Pankreaskarzinoms äußerst heterogen und komplex [17].

Bei Auftreten eines Pankreaskarzinoms besteht ein großes diagnostisches Problem auf Grund der fehlenden spezifisch-klinischen Frühsymptomatik. Als erstes auffällig sind meist ein schmerzloser Ikterus und eine ausgeprägte B-Symptomatik. Hinzu kommen diffuse, in den Rücken ausstrahlende Oberbauchschmerzen und eine gestörte Glukosetoleranz, zusammengefasst Symptome der chronischen Pankreatitis. Ein weiteres Symptom ist das Auftreten paraneoplastischer Syndrome, hier insbesondere eine gesteigerte Thrombose- neigung, auf die im weiteren Verlauf noch detailliert eingegangen wird [3].

Da das Pankreaskarzinom aus internistischer Sicht eine nicht kurativ therapierbare Krankheit darstellt, ist die chirurgische Tumorsektion unabhängig vom Alter bei resektablen Tumoren die Therapie der Wahl. Die Resektabilität ist jedoch nur bei fehlender Infiltration des Truncus coeliacus bzw. der Arteria mesenterica superior, fehlender Peritonealkarzinose sowie fehlender Fernmetastasierung gegeben [18]. Eine adjuvante Chemotherapie mit Gemcitabine zeigt ein signifikant verlängertes, rezidivfreies Überleben bei akzeptablen Nebenwirkungen [19].

Im fortgeschrittenen Tumorstadium kann neben der etablierten Gemcitabinetherapie eine zusätzliche Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib bei einer signifikanten Lebenszeitverlängerung und geringem Nebenwirkungsprofil erwogen werden [20]. Bisläng hat die in den USA praktizierte, äußerst aggressive Therapie mit Radiatio und Chemotherapie mit Gemcitabine und 5-Fluorouracil im fortgeschrittenen Tumorstadium keinen Nachweis des besseren Überlebens bei gleicher Lebensqualität im Vergleich zur Gemcitabinemonotherapie erbracht und ist daher in Europa nicht der Standard. In der Palliativsituation erfolgt die Schmerzbehandlung durch palliative Radiatio und auch eine Plexus coeliacus-Blockade. Operativ kann eine biliodigestive Anastomose oder eine Gastroenterostomie indiziert sein [18].

Nur bei 10-20% der Patienten erfolgt die Behandlung in kurativer Absicht [21] und selbst diese Patienten haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von höchstens 23%. Die 2-Jahres-Überlebensrate in der Palliativsituation liegt bei 0% [22].

1.2. Klinische Onkohämostaseologie des Pankreaskarzinoms

Als früheste klinische Manifestation maligner Tumore treten häufig thromboembolische Ereignisse auf. Bereits zur Mitte des 19. Jahrhunderts beschrieb der französische Arzt Armand Trousseau einen klinischen Zusammenhang zwischen idiopathischer tiefer Venenthrombose und einer zugrunde liegenden malignen Erkrankung. In seiner heute als „Trousseau-Syndrom“ bekannten Arbeit postuliert er als Erstsymptom einer malignen Erkrankung des Bauchraums die Entstehung einer Thrombophlebitis [23-24].

Diesem Ansatz wurde lange wenig Beachtung geschenkt. Erst in den letzten drei Dekaden kam es durch erhöhte Aufmerksamkeit, Grundlagenforschung und klinische Studien zu einer Renaissance des Trousseau-Syndroms, woraus ein Wissenszugewinn über die Zusammenhänge der Entwicklung eines malignen Tumorleidens resultierte. Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen Tumorentwicklung und gleichzeitiger intravasaler Hyperkoagulabilität mit daraus resultierendem steigendem Risiko thromboembolischer Ereignisse. Insgesamt gesehen fallen bei ca. 50% aller Krebspatienten und bei über 90% der Patienten mit Metastasierung abnormale Gerinnungswerte auf. Thromboembolische Ereignisse sind die häufigsten Komplikationen und die zweithäufigste Todesursache bei Krebspatienten [25].

Bei Malignompatienten sind häufig die Wege der Blutgerinnungskaskade in unterschiedlichem Maße aktiviert. Dies kann einerseits zu foudroyanten Komplikationen, wie der Ausbildung einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) oder einer massiven Lungenembolie, führen. Andererseits kann es auch - bei Fehlen jedweden klinischen Zeichens einer Thrombose - nur zu Veränderungen der labormedizinischen Gerinnungsparameter kommen.

Durch die Laborbefunde wird verdeutlicht, wie unterschiedlich die Hyperkoagulabilität bei unterschiedlichen Patienten ausgeprägt sein kann [26]. Die tiefe Beinvenenthrombose ist als Folge eines Ungleichgewichts der Gerinnung an erster Stelle zu nennen. Bei Vorliegen eines Pankreasmalignoms tritt diese Erkrankung bei bis zu einem Drittel der Patienten auf [27]. Klinische Studien zeigen sogar, dass Patienten mit idiopathischer tiefer Beinvenenthrombose ein vier- bis siebenfaches Risiko für ein zugrunde liegendes okkultes malignes Geschehen haben [25]. Malignompatienten haben somit ein erhöhtes Risiko für das Auftreten einer tiefen Beinvenenthrombose und konsekutiver Lungenembolie.

Portalvenen-, Milzvenen- und Mesenterialvenenthrombosen sind häufige Begleiterscheinungen des Pankreaskarzinoms und begründen eine schlechtere Prognose. Bei später Diagnosesicherung sind die therapeutischen Möglichkeiten begrenzt. Im Falle einer Stenteinlage sind hohe Rezidivraten zu erwarten [27].

Die Thrombophlebitis saltans sive migrans ist eine weitere häufige Erkrankung beim Pankreaskarzinom. Weiterhin kann eine nichtbakterielle thrombotische Endokarditis auftreten; Autopsiedaten bei Malignompatienten zeigen dies bei bis zu 75% der Fälle mit der Bandbreite von mikroskopischen Thrombozytenaggregaten bis hin zu großen makroskopischen Klappenvegetationen [28].

In 7% aller Fälle des Krankheitsbildes der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) sind Malignome oft in höhergradigen Stadien und hier meist eine akute myeloische Leukämie die Grunderkrankung [29].

Eine Komplikation von malignen, meist hämatologischen Erkrankungen, aber auch des Magen- oder des Pankreaskarzinoms, ist die thrombotische Mikroangiopathie. Symptome reichen von Hämolyse, Thrombozytopenie und Nierenbeteiligung bis hin zu zerebralen Ausfällen.

Weitere Syndrome bei malignem Grundgeschehen sind die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura und das hämolytisch-urämische Syndrom. Beide sind potentiell lebensbedrohliche Krankheitsbilder, die durch Hämolyse, Thrombozytopenie, Nierenversagen und mögliche zentralnervöse

Manifestationen auffällig werden und dringend maximaler Therapie zugeführt werden müssen [30-31].

Insbesondere im Falle des Adenokarzinoms des Pankreas zeigt sich deutlich ein gerinnungsfördernder Status, wobei es durch tumorzellunspezifische und tumorzellspezifische Gründe zu den Entgleisungen der Gerinnung kommen kann. Als tumorzellunspezifische Gründe können u.a. Patientenimmobilisation, zerstörtes bzw. nekrotisches Gewebe, assoziierte Entzündungen oder Infektionen und Folgen von Chemotherapie, Radiatio und Tumorchirurgie angeführt werden. Im Gegensatz dazu steht bei tumorzellspezifischen Gründen eine Veränderung der Expression prokoagulatorischer Enzyme im Vordergrund. Dabei bilden Tumorzellen diese Enzyme selbst und/oder inflammatorische Zytokine, die beispielsweise bei ortsständigen Makrophagen oder Endothelzellen eine erhöhte Expression prokoagulatorischer Enzyme erwirken [32].

Die Ätiologie eines Thrombus wurde von Rudolf Virchow in einer Trias eingeteilt: (1) Gefäßwandläsionen, (2) Veränderungen des Blutflusses und (3) Veränderungen der Blutbestandteile. Insbesondere die letzte Säule mit den Schlüsselenzymen der Gerinnungskaskade ist hier von besonderem Interesse. Tissue Factor (TF) oder Gewebethromboplastin, ein membranständiges Protein, das bei einer Endothelverletzung gemeinsam mit Kollagen präsentiert wird, löst den extrinsischen Weg der Blutgerinnung durch Bindung des Faktors VIIa und gemeinsamer Aktivierung des Faktor X aus, das zur gemeinsamen Endstrecke mit dem intrinsischen Weg zu einer Thrombinaktivierung führt [33].

Scheinbar hat TF indirekte Kontrolle über die Neoangiogenese des Tumors durch Produktion wachstumsregulierender Moleküle. Die Expression von TF führt zu einem gefäßbildenden Phänotyp mit einer Hochregulation von vascular endothelium growth factor (VEGF) und einer Repression des Angiogeneseinhibitor Thrombospondin [34].

Nicht nur, dass die Expression von TF im entarteten Gewebe zu schlechterer Prognose und verstärkter Angiogenese führt [35]; scheinbar steht die Bildung dieses Proteins sogar im direkten Zusammenhang mit der Differenzierung des

Pankreastumorgewebes. Es wurde gezeigt, dass in nicht bis wenig differenziertem Pankreastumorgewebe in vivo eine signifikant höhere TF-Expression vorliegt als in hochdifferenziertem Gewebe [36]. Darüber hinaus beteiligt sich TF an Prozessen der Metastasierung und des Tumorwachstums, gezeigt an einer Korrelation der Expression von TF in Metastasen kolorektaler und pulmonaler Karzinome und am Mausmodell. Der genaue Mechanismus ist bislang nicht geklärt [37].

Weiterhin hat normales Pankreasgewebe keine Tendenz Proteine zu bilden, die im Zusammenhang mit der Gerinnungskaskade stehen. Ganz im Gegenteil dazu exprimiert Pankreastumorgewebe in situ alle teilhabenden Enzyme des extrinsischen Wegs der Gerinnung inklusive Prothrombin, Fibrinogen und insbesondere TF [38].

Die Serinprotease Thrombin nimmt als zentrales Enzym der Gerinnungskaskade eine besondere Stellung ein. Als multifunktionale Protease bildet sie aus löslichem Fibrinogen Fibrinpolymere, die die Basis des stabilen Thrombus sind. Daneben ist sie der potenteste physiologische Stimulus zur Plättchenaggregation, ist Schlüsselenzym sowohl negativer als auch positiver Feedback-Mechanismen zur Regulation der Gerinnungskaskade [33] und hat im Besonderen durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) nach intrazellulär signalgebende Wirkungen, die für die Tumorbilogie eine besondere Rolle spielen (s. 1.3.).

Der Nachweis von Prothrombinfragment 1 + 2 im Bereich der invasiven Tumorfront (Magen und Pankreas) und Neoangiogenesebezirken unterstreicht die Annahme, dass Thrombin die Neovaskularisierung unterstützt [39].

Fibrin trägt als Endprodukt der Gerinnungskaskade entscheidend zur besonderen Gerinnungsproblematik bei Zugrundeliegen eines Pankreaskarzinoms bei. Sahni und Kollegen postulieren, dass die Fibrinmatrix auch als Gerüst und Speicher für proangiogenetische Wachstumsfaktoren, wie VEGF, dient, die Aktivität von heparin binding growth factor 2 (fibroblast growth factor) steigert und diese und weitere Faktoren vor einer Proteolyse schützt [40-41].

Intravaskuläres Fibrinogen hat bei Malignompatienten eine deutlich verkürzte Plasmaüberlebenszeit. Ursache hierfür könnten das bei Pankreaskarzinomen

extravasal nachgewiesene Fibrin (im gesamten Tumorstroma insbesondere im Bereich der stromalen Blutgefäße) und das nach extravasal austretende Fibrinogen (besonders im Bereich der Tumorzellnester) sein. Dies gibt Anlass zur Vermutung, dass Fibrin und Fibrinogen neben der Förderung der Neoangiogenese auch strukturell an der Erhaltung der Tumorintegrität beteiligt sind oder durch Bildung einer mechanischen Barriere den Tumor vor der körpereigenen Immunabwehr abschirmen [38-39].

Gegenstand erhöhter Aufmerksamkeit ist die Zusammensetzung des Tumorgewebes, die direkte Umgebung, im englischen Sprachgebrauch „tumor microenvironment“ genannt, sowie die Schnittstelle zwischen Tumor und Organismus, die „invasive Front“.

Tumore sind komplexe Gesellschaften sich gegenseitig beeinflussender Zellen, zusammengesetzt aus dem zentralen Tumorparenchym und dem umgebenden Tumorstroma, das mehr als 50% des Tumors ausmacht, bestehend aus Immunzellen, Endothel und Fibroblasten. Zusammen mit einer veränderten Extrazellulärmatrix bilden sie das Tumorstroma oder Tumormikroenvironment [42]. Die Zellen des Tumorparenchyms und des Tumorstromas pflegen einen regen Austausch, der Tumorwachstum durch Regulierung der Angiogenese beeinflusst, die Immunabwehr des Organismus unterdrückt und die Sekretion von Signalmolekülen steuert. Diese wiederum verändern die Zusammensetzung des zellulären wie auch des nicht-zellulären Tumorstromas [1-2, 43].

Die veränderte Extrazellulärmatrix dient dem Tumor als dreidimensionale Stützstruktur. Der Bildungsvorgang dieses Netzwerks wird Desmoplasie genannt [42]. Zunächst kommt es zu einer Proliferation des lokalen Bindegewebes. Hier spielen Prozesse der epithelialen-mesenchymalen Transition eine entscheidende Rolle [44]. Exemplarisch wurde das Snail-Gen sowohl in mesenchymalen, als auch in epithelialen Tumoren detektiert. Dieses Gen reprimiert die Expression von E-Cadherin und induziert eine Transition von epithelialen Zellen in mesenchymale Zellen. Physiologisch tritt das Snail-Gen v.a. während der Embryogenese auf. Nachweisbar ist es aber auch im Erwachsenenalter. Durch das Auftreten im Bereich des Tumorstromas zeigt es

seine besondere Relevanz für die Kommunikation zwischen Tumor und Stroma [45].

Daraufhin erfolgt die Bildung der veränderten Extrazellulärmatrix. Histopathologische Untersuchungen zeigen einen Verlust der Integrität der Basalmembran mit einer Invasion maligner Zellen in diese Matrix. Außerdem ist die Vaskularisierung zu abnorm vielen, kleinen und stark durchlässigen Blutgefäßen und Kapillaren verändert [42].

In diesem Bereich befindet sich die „invasive Front“. Sie ist die Schnittstelle maligner Zellen und physiologischer Zellen des Organismus und ist somit eine dynamische Grenze attackierender Malignom- und abwehrender Körperzellen. Auf der einen Seite versucht die infiltrierende Konfiguration der Tumorgrenze in Lymph- und Blutgefäße einzudringen, auf der anderen Seite versucht der Organismus mit zytotoxischen T-Zellen die Blut- und Lymphgefäße zu verteidigen [44].

Grundlegend für die Invasion des Tumors ist die Fähigkeit neoplastischer Zellen, die Barriere der Extrazellulärmatrix des Organismus zu durchbrechen. Der komplette Mechanismus ist im Detail noch nicht verstanden. Als gesichert gilt, dass Tumorzellen normale Körperzellen unterwandern, diese als aktive „Kollaborateure“ benutzen und somit die Antwort des Organismus dirigieren können [46]. Außerdem wird das Invasionsprogramm von einer Vielzahl proteolytischer Prozesse unterstützt. Da im Humangenom über 500 Proteasen kodiert sind und die Prozesse über Protease-abhängige und -unabhängige Signalwege ablaufen, ist das Invasionsprogramm maligner Tumore ein Gebilde unüberschaubarer Komplexität [47].

Tumorzellen besitzen z. B. die Fähigkeit, entscheidende Funktionsträger des fibrinolytischen Systems zu bilden. Sowohl Urokinase, als auch Gewebepasminogenaktivator (t-PA) sowie die Plasminogenaktivatorinhibitoren PAI-1 und PAI-2 sind mit dem membranständigen spezifischen Plasminogenaktivatorrezeptor (u-PAR) Teil der Expressionsmöglichkeiten von Tumorzellen [26].

Gesteigerte Plättchenaktivität, vermittelt durch steigenden Plättchenumsatz mit Aggregatbildung und sinkender intravasaler Plättchenüberlebenszeit, ist ein

weiterer wichtiger Bestandteil der hämostaseologischen Veränderungen. Diese Veränderungen können Tumorzellen über direkte Aktivierung oder indirekt durch Freisetzung weiterer Signalträger (z.B. ADP) erwirken. Scheinbar korreliert diese Fähigkeit mit Auftreten von Fernmetastasierungen des Tumors [26].

Neben Veränderungen physiologischer Gerinnungsmechanismen bilden Malignome darüber hinaus eigene Wege zur Einflussnahme. Genannt sei beispielsweise der tumorzellenspezifische gerinnungsbeeinflussende Faktor cancer procoagulant (CP). Diese Cysteinproteinase mit Nachweis im fetalen und malignen Gewebe hat aktivierende Wirkung auf Faktor X und fördert somit die Blutgerinnung [48].

Durch den großen Einfluss von Enzymen der Gerinnungskaskade auf Tumorwachstum, Neoangiogenese und Metastasierung ist anzunehmen, dass die im Rahmen einer malignen Erkrankung ständig auftretenden Fibrinformierungs- und -abbauprozesse, die ursächlich für schwere thromboembolische Ereignisse sind, dem zunehmenden Versagen der physiologischen Homöostase geschuldet sind.

1.3. Protease-Activated Receptors (PARs) als zelluläre Thrombinrezeptoren

Die Regulation zellulärer Funktionen in höheren Organismen unterliegt einer strengen Kontrolle, um die Funktionsfähigkeit des Organismus zu gewährleisten. Extrazelluläre Signalmoleküle übernehmen hierbei im Zusammenspiel mit membranständigen Rezeptoren unentbehrliche Aufgaben und beeinflussen Genexpression, Stoffwechselaktivität, Differenzierung, Migration, Proliferation und auch Apoptose in benignen und malignen Prozessen.

Innerhalb der großen Familie der heptahelikalen, G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptoren wurde 1991 ein bisher unbekannter und einzigartiger Aktivierungsmechanismus von membranständigen Rezeptoren entdeckt. Es

handelt sich um den vorher als „Thrombinrezeptor“ bekannten Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) [49].

Er war der erste Vertreter einer neuen Rezeptorenfamilie, die nach ihrem Aktivierungsmechanismus „Protease Activated Receptors“ benannt wurde. Die bislang bekannten Mitglieder sind Protease Activated Receptor-1 (PAR-1), PAR2, PAR-3 und PAR-4 [50].

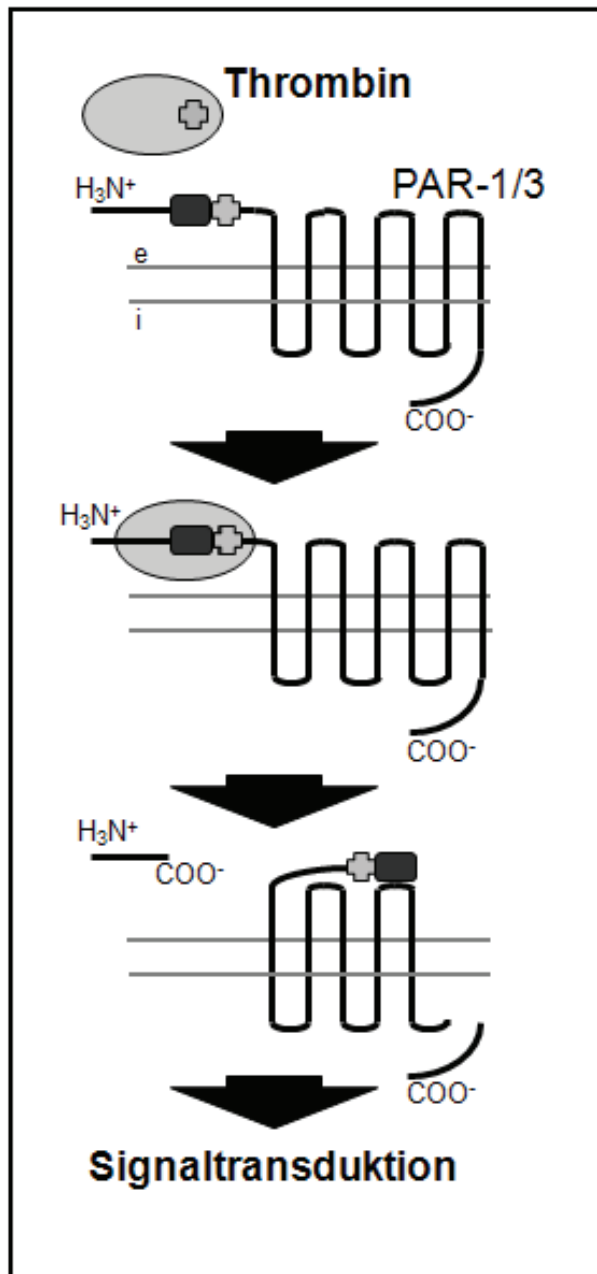
1.3.1. Signalübertragung und Wirkung der PARs

Der Aktivierungsmechanismus der einzelnen Rezeptoren ist weitgehend ähnlich und beginnt mit der Bindung der Protease an den Rezeptor. Im Falle von PAR-1 hat dieser ein verlängertes, aminotermiales, extrazelluläres Ende mit sowohl einer potentiellen Thrombinspaltungstelle (LDPR41 ↓ S42) als auch einer hirudinähnlichen Domäne (K52YEPEF) komplementär zu der anionischen Bindungsstelle von Thrombin. Nach Bindung von Thrombin erfolgt eine proteolytische Abspaltung des verlängerten Aminoterminus. Dies führt zur Freilegung eines neuen Aminoterminus, dem tethered ligand SFLLRN. Dieser bindet an einen anderen extrazellulären Loop des Rezeptors, führt zu dessen Aktivierung und der G-Protein vermittelten Signaltransduktion [49].

Zum Beweis dieses Mechanismus wurden in Studien synthetisch hergestellte Peptide mit imitiertem tethered ligand (S42FLLRNPNDKYEPF bzw. S42FLLRN) zur PAR-1-Aktivierung genutzt. Diese sogenannten TRAPs (thrombin receptor activation peptides) mit nicht-enzymatischer Aktivierung sind für PAR-1, PAR-2 und PAR-4, jedoch nicht für PAR-3 verfügbar [49].

Unterschiedliche Proteasen, insbesondere Thrombin aber auch Trypsin, die Faktoren VIIa und Xa u.a., sind in der Lage, PARs zu aktivieren, wobei diese Signalübertragung aufgrund folgender unterschiedlicher Faktoren selbstlimitierend ist: (1) Die Protease muss in ausreichender Konzentration zur Verfügung stehen. (2) Der Pool an Rezeptoren ist durch den besonderen Aktivierungsmechanismus einer Limitierung ausgesetzt. (3) Bisweilen ist die Präsenz weiterer Kofaktoren notwendig. (4) Die Fähigkeit der Protease, ein Signal zu übertragen, unterliegt der An- bzw. Abwesenheit des jeweiligen

Proteaseinhibitors. (5) Weiterhin gibt es eine Vielzahl von Proteasen, die die extrazellulären Domänen der PARs zerstören und somit eine Aktivierung unmöglich machen [50].



- tethered ligand
- ⊕ Thrombinbindungsdomäne

Abbildung 1.1:

Thrombin aktiviert PAR-1 und PAR-3 in zwei Schritten. Zunächst kommt es zur extrazellulären Bindung an eine hirudin-ähnliche Domäne. Danach erfolgt die proteolytische Spaltung des Rezeptors. Der freiliegende „tethered ligand“ klappt um zu einem anderen extrazellulären Loop und führt so zu dessen Aktivierung.

Es zeigt sich, dass PARs in vielen verschiedenen, physiologischen Systemen wie der Gerinnung, der Immunantwort, der Schmerzübertragung, der Mukosa-barriere und bei Gewebe- und Zellreparaturmechanismen, Signalgeber sind und damit viele zelluläre Funktionen kontrollieren. PAR-1 wird auf menschlichen

Thrombozyten exprimiert und ist mitverantwortlich für Degranulation, Oberflächenveränderungen und Aggregatbildung. PAR-1 findet sich weiterhin auf Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten, T-Zellen, Osteoblast-ähnlichen Zellen, Epithelzellen des Gastrointestinaltraktes und der Nieren sowie auf Nerven- und Gliazellen, zentral und in der Peripherie [50].

Tabelle 1.1:

Vertreter der PAR-Familie mit physiologischer Lokalisation und aktivierender Protease [50]

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Aktivierende Protease	Thrombin, TF-FVIIA-FXa-Complex, Trypsin (u.a.)	Trypsin, TF-FVIIA-FXa-Complex, Tryptase, Proteinase 3, (u.a.)	Thrombin	Thrombin, Trypsin
Lokalisation	Thrombozyt (Mensch) Endothel, Epithel, Fibroblasten, Myozyten, Astrozyten	Epithel, Endothel, Fibroblasten, Myozyten, Astrozyten	Thrombozyt (Maus), Endothel, Myozyten, Astrozyten	Thrombozyt (Mensch), Endothel, Myozyten, Astrozyten

Durch die Aktivierung von PAR-1 werden chemotaktische Signale zur Immunantwort übermittelt. Endothel, Myozyten, Fibroblasten und Astrozyten bekommen proliferative Reize. Endothelzellen werden angeregt, Zytokine zu bilden, Plasma extravasal zu überführen und Granulozytenadhäsion zu ermöglichen. Myozyten ändern ihre Beweglichkeit. Weiterhin übernehmen PARs Vorgänge der Neurotransmission [50].

PARs spielen in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine wichtige Rolle. Sie beteiligen sich an kardiovaskulären und inflammatorischen Krankheitsgeschehen. Außerdem haben sie großen Einfluss auf das Fortschreiten von Malignität.

Elste und Petersen konnten zeigen, dass alle vier Vertreter der PARs und hier insbesondere PAR-1 und PAR-2 omnipräsent auf der Oberfläche der meisten Tumore überexprimiert werden [51].

PAR-1 findet sich bei verschiedenen Brustkrebszelllinien [52], bei der Prostatakarzinomzelllinie DU 145 [53], bei verschiedenen Zelllinien laryngealer Karzinome [54], bei verschiedenen Glioblastomzelllinien [55-56] und zahlreichen weiteren Entitäten. Da die Zelle im Zuge der Ausprägung einer malignen Entartung ihr natürliches Expressionsmuster ändert, lassen sich deutliche Unterschiede darlegen. Die Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 hat eine starke Überexpression von PAR-1, wohingegen der Rezeptor bei natürlichem Pankreasgewebe nicht nachweisbar ist [57-58].

Nicht nur der Tumor selbst, sondern auch das umgebende Tumorstroma verändert sein Expressionsmuster. Jin und Kollegen zeigten, dass sich die Expression von PAR-1 und PAR-2 in den Alveolarwänden um einen Lungentumor bis zu 10- bis 16-fach steigerte im Vergleich zu physiologischem Alveolargewebe [59].

Vergleiche von gesundem und malignem Gewebe ergaben, dass es bei den im Tumormikroenvironment angesiedelte Fibroblasten, die hohe Proliferationsraten zeigen, zu einer starken Überexpression von PAR-1 und PAR-2 kommt. Weiterhin sind auf einzelnen Tumorzellen, Mastzellen, Makrophagen, Endothel- und glatten Gefäßmuskelzellen des Tumorstromas PAR-1 und PAR-2 nachweisbar [60].

Even-Ram und Kollegen zeigen eine direkte positive Korrelation zwischen dem Expressionslevel von PAR-1 und der Invasivität und damit dem Metastasierungspotential bei unterschiedlichen Brustkrebszelllinien [52]. Im Kontrast dazu kamen die Arbeitsgruppen um Karpatkin und Kamath zu gegensätzlichen Erkenntnissen. Sie zeigen, dass Thrombin durch PAR-1-Aktivierung in unterschiedlichen malignen Zelllinien Kontrolle über den

Zellzyklus und Apoptosemechanismen erlangt [61] und dass PAR-1-Aktivierung auch die Wanderung und Invasion von Brustkrebszellen hemmt [62].

1.3.2. Alternative Oberflächenbindungsstellen von Thrombin

Neben der zentralen Bedeutung in der plasmatischen Gerinnung und der Aktivierung der PARs hat Thrombin weitere Optionen, an membranständige Proteine zu binden.

1.3.2.1. Thrombomodulin

Das membranständige Glykoprotein Thrombomodulin ist primär auf dem Endothel von Blut- und Lymphgefäßen lokalisiert. Die Bildung eines Komplexes mit Thrombin bewirkt eine Konfigurations- und Funktionsänderung von Thrombin. So wird die prokoagulatorische Eigenschaft der Bildung von Fibrin gehemmt und die antikoagulatorische Eigenschaft der Aktivierung von Protein C gefördert [63-64]. Außerdem erfolgt durch Aktivierung von TAFI (thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor) eine Hemmung der Fibrinolyse [65].

Das Fehlen von Thrombomodulin bei Knock-out-Mäusen führt zu einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse [66]. Durch die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin wird zudem die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin gehemmt [67].

Thrombomodulin kann als Marker für invasive Gefäß- und Lymphumore benutzt werden [68]. Weiterhin wird angenommen, dass Thrombomodulin eine entscheidende Funktion in der Tumorbilogie innehat. Plattenepithelkarzinome des Mundraums, der Speiseröhre und der Lunge und auch kolorektale Adenokarzinome exprimieren Thrombomodulin [69]. Jedoch zeigt sich, dass im Falle von kolorektalen Karzinomen ein Verlust der Expression mit fortgeschritteneren Stadien und einer schlechteren Überlebensprognose korreliert [70].

1.3.2.2. Glykoprotein Iba

Das Glykoprotein Iba ist auf der Oberfläche von Thrombozyten lokalisiert. Hierbei ist es Bestandteil eines Multienzymkomplexes, bestehend aus den Glykoproteinen Iba, IX und V, der die Plättchenadhäsion an den Von-Willebrand-Faktor initiiert [71-72]. Die Bindung von Thrombin an das Glykoprotein Iba wird für die optimale Plättchenaktivierung benötigt [73]. Weitere Funktionen sowie die Rolle der Glykoprotein Iba/Thrombin-Interaktion in der Tumorbilogie sind noch nicht abschließend ergründet. Bislang wurde u.a. festgestellt, dass Glykoprotein Iba auf der Oberfläche von Brustkrebszellen exprimiert wird [74] und im Tierexperiment die Lungenmetastasierungsrate von Melanomzellen unterstützt [75].

1.4. Thrombin, PARs und Malignität

Grundsätzlich kommt es zu sechs essentiellen Veränderungen der Zellphysiologie im Verlauf malignen Wachstums: (1) Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, (2) Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmung, (3) Umgehen des natürlichen Zelltodes (Apoptose), (4) unbegrenztes Teilungsvermögen, (5) Neoangiogenese und (6) Gewebeinvasion sowie Metastasierung [1-2].

Thrombin hat in vitro nachgewiesene mitogene Eigenschaften auf glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Endothelien und unterschiedliche Krebszellen. Der genaue zelluläre Mechanismus dieses Proliferationsantriebs ist im Detail nicht aufgeklärt. Nachgewiesen wurde bisher, dass in diesem Signalweg G-Protein gekoppelt die Proteinkinase C und nachfolgend die Kaskade der mitogen activated protein (MAP) Kinasen aktiviert wird [53]. Interessanterweise konnte ein dosisabhängiger Effekt festgestellt werden. Niedrige Thrombinkonzentrationen führen zu verstärktem Tumorwachstum, während hohe Konzentrationen Wachstumshemmung bewirken [76] und sogar in Verbindung mit einer Hochregulation von p21(waf/cip1) und Kaspasen durch

einen p53-unabhängigen, STAT-1-abhängigen Signalweg, Apoptose erzeugen [61]. Unabhängig davon scheint Thrombin auch die Apoptoseinduktion der Tumorzelle positiv zu beeinflussen [77].

Durch Thrombin aktivierte Tumorzellen haben eine verstärkte Adhäsion an nativen Plättchen, Endothelzellen, und subendothelialen Matrixproteinen und erfüllen somit eine Voraussetzung zur Gewebeinvasion und Metastasierung [78]. PAR-1-Aktivierung durch Thrombin führt zu einer gesteigerten Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, wie Integrin $\alpha V\beta 5$, Integrin IIb-IIIa Rezeptor, ICAM-1, VCAM-1 und P-Selektin [53]. Zur Gewebeinvasion müssen die Tumorzellen die Basalmembran durchdringen. Dazu benötigen sie extrazelluläre Proteasen. Durch PAR-1-Aktivierung kommt es bei Prostatakrebszellen zur Hochregulation von Plasminogenaktivator vom Urokinasetyp (uPA) und damit zur Plasminaktivierung, welche wiederum extrazelluläre Matrixproteine degradiert [79]. Außerdem steigert Thrombin die Expression von Metalloproteinase 2, einer weiteren extrazellulären Proteinase [54]. Diese Aspekte lassen vermuten, dass der thrombinvermittelten Aktivierung von PARs, insbesondere PAR-1, eine wichtige Funktion für Tumorwachstum, lokales Fortschreiten und Fernmetastasierung zukommt.

Daneben stimuliert Thrombin die Neoangiogenese. Diese tritt physiologisch nur in der Embryogenese, der Wundheilung und während der Proliferationsphase des weiblichen Zyklus auf. Tumorzellen haben jedoch die Fähigkeit ebenfalls Neoangiogenese zu betreiben; dies stellt einen essentiellen Bestandteil der Tumorbiologie dar, da der Tumor ab einer bestimmten Größe auf den Anschluss an die Systemzirkulation angewiesen ist, um mit Nährstoffen versorgt zu bleiben und Abfallprodukte zu entsorgen. Der Anschluss an die Systemzirkulation führt zu einem uneingeschränkten Wachstum des Tumors [80-82].

Thrombin hat einen stimulierenden Effekt für die Bildung von vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in Tumorzellen [83]. VEGF-A ist ein proangiogenetisches Zytokin und ein wichtiges Mitglied der VEGF-Familie, deren Vertreter die potentesten Modulatoren des Gefäßsystems sind [84]. Außerdem stimuliert Thrombin die Ausschüttung von Angiopoetin-2 aus

Endothelzellen [85] und Plättchen [86] sowie die Ausschüttung von VEGF-A aus Plättchen [87].

Ein weiteres Zytokin, das von Tumorzellen, Bindegewebe und Endothelzellen gebildet wird, ist Interleukin-8 (IL-8). Es bewirkt Endothelzellteilung, Expression von Matrixmetalloproteinasen und Tumorneoangiogenese, so dass es an den Prozessen von Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt ist [88]. Asokanathan und Kollegen erbrachten den Nachweis, dass bei menschlichem Lungengewebe die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin u.a. die Ausschüttung von IL-8 bewirkt [89].

Der Einfluss von Thrombin auf Selbstversorgung des Tumors mit Wachstumssignalen, die Unempfindlichkeit des Tumors gegenüber Wachstumshemmung und das Umgehen der Apoptose ist nicht abschließend geklärt. Unabhängig davon muss es als erwiesen gelten, dass das Zusammenspiel von Thrombin und PAR-1 von zentraler Bedeutung für die Tumorbio­logie ist.

1.5. RNA-Interferenz (RNAi)

Mit Hilfe der Mechanismen des RNA-silencing können kleine RNA-Moleküle aus dem großen Pool nicht-kodierender RNA verschiedene Prozesse auslösen, wie zum Beispiel den Eingriff in die Regulation der Genexpression, die Abwehr von RNA-Viren oder den Erhalt der Genomintegrität.

RNA-silencing kann einerseits bereits auf Transkriptionsebene erfolgen, nämlich durch transcriptional gene silencing mittels Modifikation auf Chromatinebene, DNA-Elimination oder DNA-Methylierung, andererseits aber auch nachgeschaltet sein. Dies wird posttranscriptional gene silencing (PTGS) bzw. RNA-Interferenz (RNAi) genannt.

RNAi ist ein natürlicher Regulationsmechanismus zur Limitierung der Genexpression eukaryoter Zellen. Sie wird durch die Aktivierung eines sequenzspezifischen mRNA-Degradationsprozesses mit Hilfe kleiner RNA-Moleküle bewerkstelligt [90].

Erstmalig 1990 entdeckte die Arbeitsgruppe Mol und Jorgensen - eher zufällig - RNAi bei dem Versuch, die dunkelblaue Farbe transgener Petunien zu verstärken. Nach Einbringen exogener Transgene kam es jedoch nicht zu dem erwünschten Ergebnis. Die meisten Pflanzen waren vielmehr weniger stark pigmentiert und trugen teilweise sogar weiße Blüten. Es zeigte sich, dass bei den Petunien nicht nur die Transgene inaktiv sondern auch – in ungeklärter Form - die Aktivität endogener Genloci durch das Einbringen von doppelsträngiger RNA gehemmt war. Hierfür wurde der Begriff Cosuppression geprägt [91].

In der Folge entdeckten andere Forschungsgruppen ähnliche unerklärliche Phänomene bei weiteren Pflanzen, Algen, Pilzen und dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Man fand heraus, dass die Genexpression nicht nur transkriptionell sondern auch posttranskriptionell durch Degradation von mRNA gehemmt wurde. Zunächst wurde angenommen, Pflanzen würden diese Mechanismen zur Abwehr von RNA-Viren [92-93] bzw. zur Vorbeugung der Integration mobiler Transposons nutzen. Nachdem jedoch bekannt wurde, dass bestimmte Gene in Pflanzen und Tieren überhängende doppelsträngige RNA kodieren, die als Vorläufermoleküle von so genannter miRNA fungieren, ergab sich, dass RNAi einen übergeordneten Mechanismus der Genregulation darstellt [94].

Die genauen intrazellulären Vorgänge blieben lange unbekannt. Schließlich beschrieben Fire und Mello bei *C.elegans* Techniken, wie doppelsträngige RNA zur Hemmung der Genexpression zu nutzen ist [95], was 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie gewürdigt wurde.

Der Begriff short interfering RNA (siRNA) wurde 1999 durch Hamilton und Baulcombe geprägt, welche damit begannen, die intrazellulären Vorgänge zu erklären [96]: Durch RNA-abhängige RNA-Polymerisation (z.B. virale Replikation) oder Hybridisierung überlappender Transkripte entstehen im Zytoplasma lange, doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA). Diese bilden das Ausgangssubstrat für siRNA.

Analog dazu kommt es auf Kernebene zur Bildung endogener Transkripte, die spezifische Strukturen - aus 20 bis 50 Basenpaare langen, invertierten dsRNA-

Haarnadelschleifen bestehend - beinhalten. Diese RNA-Moleküle sind das Ausgangssubstrat für mikro-RNA (miRNA). Mittels einer dsRNA spezifischen RNase-III-Typ Endonuklease, genannt Drosha, werden die Primärtranskripte im Kern gespalten und gelangen als Vorläufermoleküle der miRNA (pre-miRNA) über das Transportprotein Exportin-5 in das Zytoplasma [97]. Hier wird die pre-miRNA durch einen Enzymkomplex - bestehend aus der Endonuklease Dicer, dem TAR RNA-Bindungsprotein (TRBP) und dem Proteinaktivator der Proteinkinase PKR (PACT) – in 21 bis 23 nukleotidlange dsRNA-Fragmente mit 2 Nukleotid-3'-Überhang prozessiert. Anzumerken ist, dass unterschiedliche Spezies auch mitunter mehrere Gene, für den wichtigsten Bestandteil dieses Multienzymkomplexes, die Endonuklease Dicer, besitzen. Säuger tragen nur ein Dicergen [98].

Nun wird Dicer mit der gebundenen siRNA in einen Multienzymkomplex integriert, den sogenannten RNA induced silencing complex (RISC), bestehend aus einem dsRNA-bindenden Protein, der Ziel-siRNA (bzw. miRNA), Dicer sowie der Endonuklease Argonaute 2 (AGO2) [99].

Innerhalb von RISC wird das dsRNA-Fragment unter ATP-Verbrauch entwunden. Der Sense-Strang dissoziiert und wird degradiert. Der Antisense-Strang bleibt jedoch gebunden und bildet die Zielsequenz für die mRNA, wobei siRNA und mRNA zwingend komplementär zueinander sind. Dies ist die letzte Kontrollinstanz bevor AGO2 endonukleolytisch die mRNA hydrolisiert, diese gesplattene mRNA durch zelluläre Exonukleasen degradiert und dadurch ein epigenetisches Inaktivieren des jeweiligen Gens erwirkt wird. Hierdurch wird zwar die Translation beträchtlich gehemmt, es kommt jedoch normalerweise nicht zur vollständigen Elimination der jeweiligen mRNA [97, 100-102].

Die Etablierung dieser Methode in Säugetierzellen gestaltete sich lange Zeit sehr problematisch. Einbringen von dsRNA mit einer Länge von mehr als 30 Nukleotiden in die Zellen führt zu unspezifischen Immunantworten im Sinne einer induzierten Interferonexpression und Aktivierung des Komplementsystems. dsRNA aktiviert die Proteinkinase PKR, die über die Phosphorylierung von EIF-2 α eine generalisierte Translationshemmung bewirkt. Dazu aktiviert dsRNA das 2'-5' Oligoadenylatpolymerase/RNase L System und

hemmt IκB. All diese Mechanismen können über die Auslösung der Apoptose zum Zelltod führen [103-105].

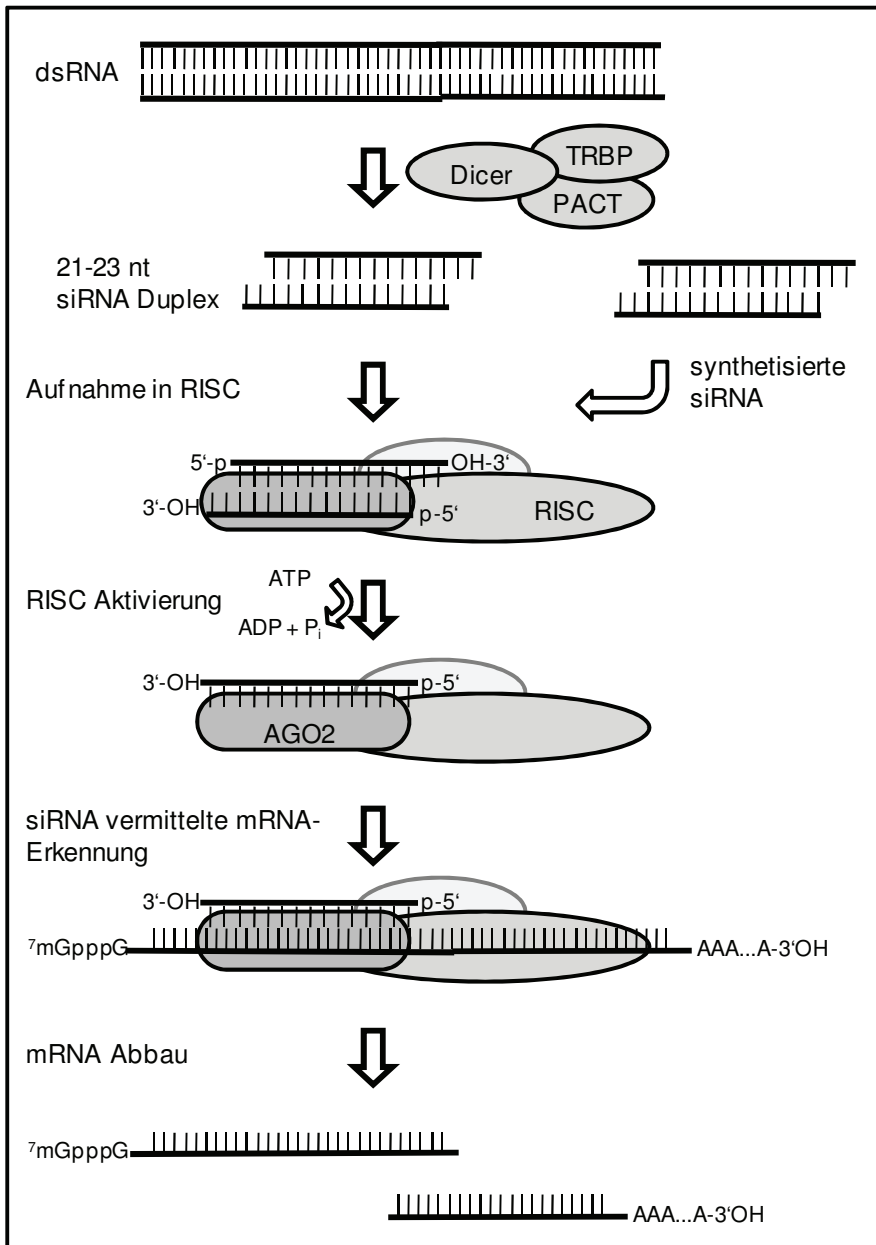


Abbildung 1.2:

Ablauf des mRNA-Abbaus: Kurze RNA-Duplexe bilden mit verschiedenen Proteinen RISC, der nach Aktivierung mRNA homolog zur in RISC aufgenommenen siRNA abbaut

Erstmals gelang es der Arbeitsgruppe um Tuschl und Kollegen, die Mechanismen der RNAi bei Säugetierzellen einzusetzen. Sie benutzten kurze 19-22 Nukleotide-lange siRNA-Stücke [106-107]. Diese siRNAs können sowohl in vitro als auch chemisch synthetisiert und aus langer dsRNA enzymatisch mittels Exonukleasen prozessiert werden mit vergleichbarer Effizienz [108]. Das Problem des Transfers in die Zielzelle lösten Tuschl und Elbashir mit liposomalen Transfektionsmitteln, die mit der Nukleinsäure einen Komplex bilden, der von der Zelle aufgenommen wird. Somit gelangt siRNA ins Zytosol [106-107].

Neben der neuen Sichtweise zur Erklärung molekularbiologischer Abläufe war nun ein wichtiges Werkzeug zur Unterdrückung der Genantwort verfügbar, dem nachgesagt wird, es sei der wichtigste pharmakologische Fortschritt seit der Einführung der Gentherapie.

1.6. Aufgabenstellung

Die Ziele dieser Arbeit lassen sich folgend darstellen:

- (1) Kommt es bei verschiedenen malignen Pankreazelllinien und einer Zelllinie eines hepatozellulären Karzinoms (HCC) zur Transkription membranständiger Thrombinrezeptoren?

Hierbei wurde das Verfahren der RT-PCR verwandt und anschließend die Translation und die Oberflächenpräsentation der jeweiligen Rezeptoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft, wodurch die Charakterisierung des Thrombinrezeptorprofils der verwendeten Zelllinien erfolgte.

- (2) Ändert sich das Proliferationsverhalten der ausgewählten Pankreaskarzinomzelllinien bei manipulierten Umgebungsverhältnissen unter der Annahme, dass die Änderung des Expressionsmusters bei Vorliegen von entarteten Zellen einem bestimmten Zweck diene?

Den einzelnen Pankreaszelllinien wurde Thrombin verschiedener Konzentrationen angeboten und das daraus resultierende Wachstumsverhalten analysiert.

- (3) Ist mit den Mechanismen der RNA-Interferenz bei der malignen Pankreaszelllinie PANC-1 die Überexpression von PAR-1 zu silencen? Der Nachweis erfolgte hierbei wiederum durchflusszytometrisch.
- (4) Hat das Silencing des PAR-1-Gens eine funktionelle Konsequenz? Hierfür erfolgte die Überprüfung des Zytokinmusters der veränderten Tumorzelle mittels ELISA-Technik.

Insgesamt zielt diese Arbeit darauf ab, die Zusammenhänge von der Veränderung der Gerinnungslage und dem Auftreten von Malignität darzustellen sowie die funktionelle Schlüsselrolle der Verbindung von Thrombin und PARs weiter zu erforschen und zu verstehen. Sie stellt somit einen weiteren Schritt auf dem Weg dar, das expansive lokale Wachstum, die starke Neoangiogenese und die frühe Metastasierung maligner Pankreastumore besser zu analysieren sowie zukünftig bei der Behandlung von Pankreastumoren neue Strategien durch moderne molekularbiologische Methoden aufzuzeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Die menschliche Zelllinie PANC-1 eines duktales exokrinen Pankreaskarzinoms [109] und die menschliche Zelllinie AsPC-1 ebenfalls eines Adenokarzinoms des Pankreas [110] wurden bezogen von LGC Promochem (Teddington, UK), die menschliche Zelllinie BXPC-3 eines Adenokarzinoms des Pankreas [111] wurde bezogen von der European Collection of Cell Cultures (Salisbury, Wiltshire, UK) und die menschliche Zelllinie Hep-G2 eines hepatozellulären

Karzinoms [112] von DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland).

Die Zellen wurden in 75 cm² Flaschen unter Zugabe von 12 ml RPMI 1640 mit 2% Glutamin, 10% fetalem Kälberserum (FCS) und zusätzlich Ampicillin-Streptomycin (sämtliche Materialien bezogen von Biochrom, Berlin, Deutschland) im Inkubationsschrank bei konstanten Bedingungen (37° C, 5% CO₂) kultiviert. Ein Mediumwechsel mit Waschvorgang mit PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ erfolgte alle 48 Stunden (h). Die Passagierung der Zellen in neue Kulturflaschen erfolgte mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA nachdem im Mittel 80% der Kulturflasche von den Zellen bewachsen waren. Erst nach einer Erholungsphase von mindestens 48 h in Kompletmedium wurde mit den Zellen gearbeitet.

2.2. RNA-Isolierung und RT-PCR

Zur RNA-Isolierung wurde das TRIZOL-Reagens, eine Phenol- und Guanidinisothiocyanatlösung, benutzt (Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Deutschland). Der Arbeitsablauf gestaltete sich wie folgt: Zunächst wurden nach einem Waschvorgang mit PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ 7,5 ml TRIZOL-Reagens (1 ml à 10 cm²) auf die Zellen gegeben, das Lysat durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt und 5 Minuten (min) bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch erfolgte eine mechanische Lysierung der Zellen, wobei die Integrität sämtlicher zellulärer RNA erhalten blieb. Nach Zugabe von Chloroform (in einem Verhältnis von 1:5 (Chloroform:Lysat) und Zentrifugation bei 6° C und 13000 rpm 15 min (Zentrifuge Universal 30F, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) wurde eine Auftrennung in eine organische Chloroform- und eine wässrige Phase, in der exklusiv die RNA verblieb, erreicht. Durch Transfer dieser Phase, Zugabe von Isopropanol und Zentrifugation bei 6° C und 13000 rpm 10 min wurde die RNA wiedergewonnen. Nach einem Waschvorgang mit 75% Ethanol konnte das RNA-Pellet in nukleasefreiem Wasser wiederaufgelöst und bei -80° C gelagert werden.

Zur Reinigung der RNA von DNA wurde RQ1 RNase-freie DNase (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) benutzt. Nach dem DNA-Verdau wurden 2 µg RNA durch SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Deutschland) gemäß Herstellervorschrift in c-DNA umgeschrieben. Die gewonnene c-DNA wurde bei –20° C gelagert.

Tabelle 2.1:

PCR-Konditionen

Gen	Größe (bp)	Primer (f-forward, r-reverse)	Annealing [°C]	Zyklen	Ref.
PAR-1	598	f: 5'- GTG CTG TTT GTG TCT GTG CT r: 5'- CCT CTG TGG TGG AAG TGT GA	55	30	[113]
PAR-3	513	f: 5'- TCC CCT TTT CTG CCT TGG AAG r: 5'- AAA CTG TTG CCC ACA CCA GTC CAC	55	30	[114]
PAR-4	121	f: 5'- GGT GCC CGC CCT CTA TGG r: 5'- TCG CGA GGT TCA TCA GCA	60	30	[76]
TM	153	f: 5'- CGG TAC CTT CGA GTG CAT CT r: 5'- ACG GCC GGA GGA GTC AAG GT	65	30	[115]
GPIb α	643	f: 5'- ACC TAG AAG TGA ACT GTG AC r: 5'- TTT TCA GCA TTG TCC TGC AG	60	35	[116]

Die Polymerase-Kettenreaktion (Cycler von Biometra, Göttingen, Deutschland) wurde durchgeführt in 50 µl Reaktionsgemisch. Dieses Gemisch enthielt PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; pH 8,3),

Desoxynukleotidtriphosphat (je 0,2 mM), R- und F-Primer (je 0,2 μ M) und zwei Einheiten Taq-DNA-Polymerase (Quiagen, Hilden, Deutschland).

Die initiale Denaturierung der DNA erfolgte für 5 min bei 94° C. Die Kettenreaktion wurde in folgendem Zyklus durchgeführt: 1 min Denaturierung bei 94° C, Annealing 1 min (die Annealing-Temperaturen sind Tabelle 2.1. zu entnehmen) und 2 min Synthese bei 72° C. Zum Schluss folgten weitere 7 min bei 72° C. Mittels Gelelektrophorese mit 2 bis 2,5% Agarosegel und einer Färbung mit 5 μ g/ml Ethidiumbromid wurden die PCR-Produkte unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Als Positivkontrolle diente für PAR-1 cDNA der menschlichen Prostatakarzinomzelllinie DU 145 [117] und für PAR-3 cDNA menschlicher Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC).

Für PAR-4, Thrombomodulin und Glykoprotein Iba cDNA wurde als Positivkontrolle c-DNA aus einem c-DNA-Panel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) verwandt. Die Ergebnisse der Voruntersuchungen zur Detektion der idealen Positivkontrolle mittels PCR und Gelelektrophorese sind in den Abbildungen 2.1 bis 2.3 dargestellt.

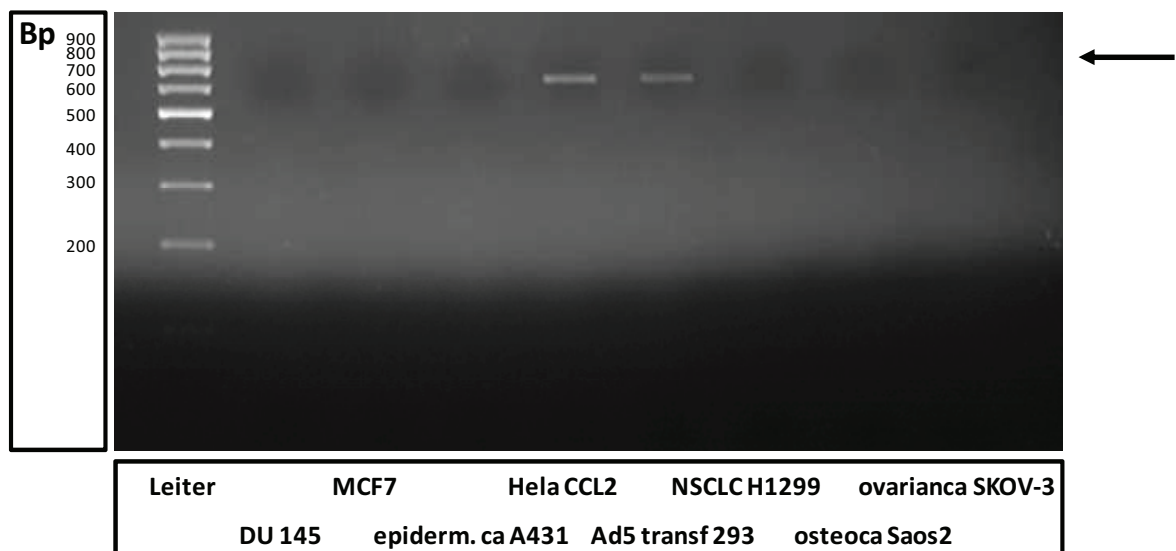


Abbildung 2.1:

Glykoprotein Iba human MTC tm Panel mit positivem Ergebnis für HeLa CCL2 und Ad5 transformed 293.

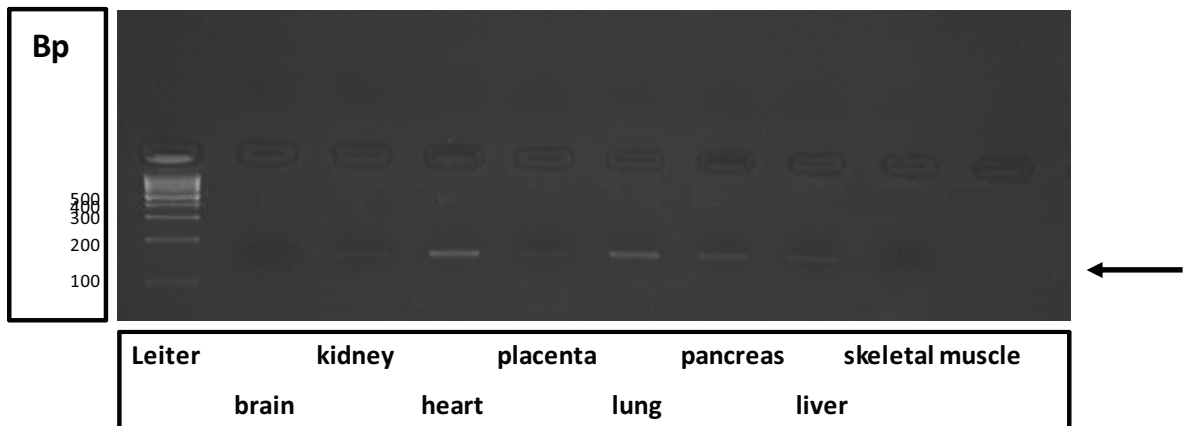


Abbildung 2.2:

Thrombomodulin human MTC tm Panel mit positivem Ergebnis für Nieren-, Herz-, Plazenta-, Lungen-, Pankreas- und Lebergewebe

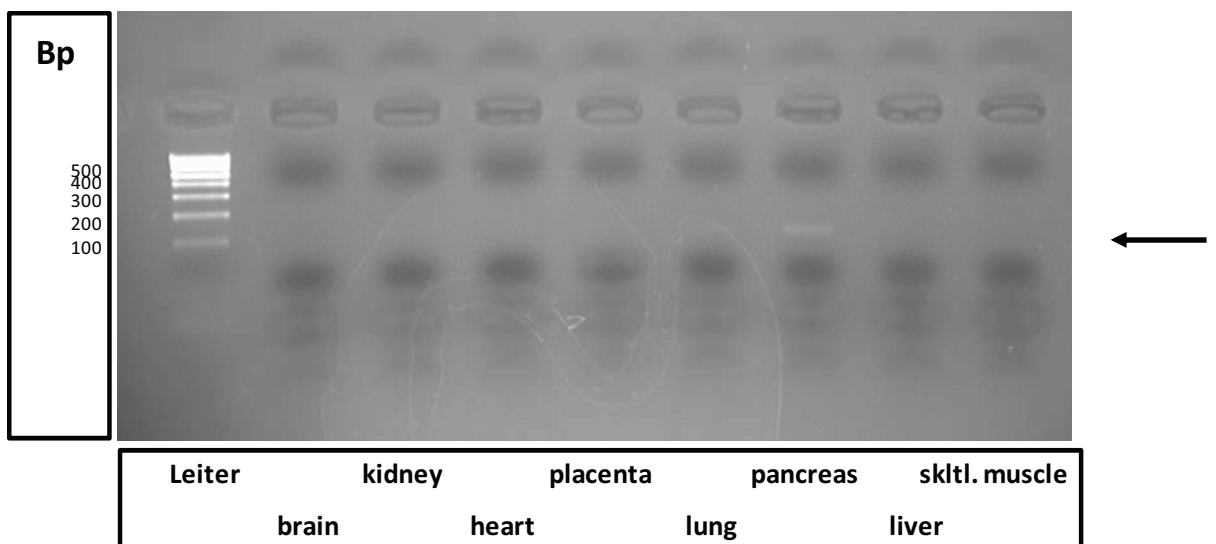


Abbildung 2.3:

PAR-4 human MTC tm Panel mit schwach positivem Ergebnis menschlichen Pankreasgewebes

2.3. Durchflusszytometrie

Um die Präsenz von PAR-1 und Thrombomodulin auf der Zelloberfläche zu beweisen, wurden die Rezeptoren mit etablierten Verfahren

nachgewiesen [118]. Zur Schonung der Oberflächenstruktur wurde nicht Trypsin zur Lösung der Zellkulturen von der Kulturflasche verwandt. Vielmehr wurden die am Untergrund haftenden Zellkulturen 20 min bei 37° C mit 50 mM EDTA in PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ versetzt. Nach einem Waschvorgang wurde eine Zellsuspension in PBS mit Ca²⁺/Mg²⁺ mit 2% Rinderalbumin (PBS-BSA) hergestellt. 5x10⁵ Zellen wurden mit 5 µg eines monoklonalen Maus-Anti-humanes PAR-1 IgG1 (clone WEDE15, Beckman Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland) bzw. mit 5 µg eines monoklonalen Maus-Anti-humanes Thrombomodulin IgG1 (American Diagnostica Inc., Stamford, CT, USA) für 30 min auf Eis inkubiert. Ein monoklonaler Maus-Isotypen-Antikörper (MslgG1, Beckman Coulter Immunotech, Krefeld, Deutschland) diente als Negativkontrolle. Nach zweimaligem Waschvorgang mit PBS-BSA wurden 0,5 µg eines mit Phycoerythrin konjugiertem Ziege-Anti-Maus F(ab')₂ IgG zugefügt. Nach 30 min Inkubationszeit auf Eis und zweimaligem Waschvorgang mit PBS-BSA wurden 10.000 Zellen mit einem FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

2.4. Proliferationsanalyse

Auf 96 Well-Zellkultur-Mikroplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) wurden 5000 Zellen der Zelllinien PANC-1, AsPC-1 und BXPC-3 pro Vertiefung in 100 µl RPMI 1640 unter Zugabe von 2% Glutamin, 10% fetalem Kälberserum und zusätzlich Ampicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) eingesetzt und 24 h inkubiert. Dann wurden die Zellen 48 h mittels 100 µl RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 0,1% BSA im Wachstumsarrest gehalten. Nach der Zugabe von menschlichem Thrombin (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) in den Konzentrationen 1,0 U/ml, 0,5 U/ml und 0,1 U/ml und einer Kontrollreihe ohne Zugabe von Thrombin wurden die Zellen weitere 24 h, 48 h bzw. 72 h inkubiert. Nach der jeweiligen Zeit wurde die Proliferation mittels einer photometrischen Analyse, basierend auf der Spaltung eines Tetrazoliumsalzes durch Aktivität einer

mitochondrialen Dehydrogenase (WST-1, Roche, Mannheim, Deutschland), bestimmt. Nach Zugabe von 10 µl WST-1 pro Vertiefung wurde die Platte 30 min bei 37° C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm mit einem Mikroplatten-Spektrophotometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Die Hintergrundabsorption wurde in separaten Wells durch Zugabe von 100 µl RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 0,1% BSA und 10 µl WST-1 kontrolliert.

Da die vorgenannte Untersuchungen keinen Nachweis dafür erbringen, inwiefern die Veränderungen des Proliferationsverhaltens abhängig von der Thrombinspezifität und proteolytischen Aktivität sind, wurden zu den jeweiligen Zelllinien, im gleichen Verfahren wie oben beschrieben, Kontrollexperimente durchgeführt.

Hierfür wurde einem Thrombin enthaltenden Kulturmedium (RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 0,5 U/ml Thrombin) bei 37° C 30 min vor Zellzugabe einmal ein thrombin-spezifisches Aptamer (Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) mit finaler Konzentration von 500 µM, bzw. bei 0,5 U/ml Thrombin der irreversible Thrombininhibitor D-Phe-Pro-Arg Chlormethylketon (PPACK, Calbiochem, Bad Soden, Deutschland) mit finaler Konzentration von 10 µg/ml beigefügt und daraufhin 24 h, 48 h und 72 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch nach Zugabe von WST-1 (Roche, Mannheim, Deutschland).

Zur Ergänzung und Überprüfung der Verwicklung der mitogen activated protein (MAP) Kinasen in die Thrombin induzierten, zellulären Veränderungen wurden mit RPMI 1640 (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 0,1% BSA im Wachstumsarrest gehaltene Zellen mit 0,5 U/ml Thrombin und 20 µM des spezifischen MAP-Kinasen Inhibitor PD98059 (Sigma, St. Louis, USA) 48 h inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch nach Zugabe von WST-1 (Roche, Mannheim, Deutschland).

2.5. Transfektion mit siRNA

2.5.1. Transfektion adhärenter Zellen

Spezifische Duplex siRNA gegen menschlichen Thrombinrezeptor PAR-1, Control siRNA (Negativkontrolle bestehend aus einer gescrambelten Sequenz, die zu keiner spezifischen Degradation bekannter zellulärer mRNA führt), siRNA-Transfektionsreagenz zur Übertragung der siRNA nach intrazellulär sowie spezielles serumreduziertes siRNA-Transfektionsmedium wurden bezogen von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Der Herstelleranleitung folgend wurden die Zelllinien PANC-1 und AsPC-1 in der Konzentration 2×10^5 Zellen pro Well mit 2 ml antibiosefreiem Kulturmedium (RPMI 1640 unter Zugabe von 2% Glutamin und 10% FCS) auf einer 6er Kulturplatte eingesetzt und für 24 h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Transfektionskomplex bestehend aus PAR-1 siRNA bzw. Kontroll siRNA, siRNA Transfektionsreagenz und siRNA Transfektionsmedium gemäß der Herstelleranleitung angesetzt. Nach einem Waschvorgang wurden die Zellen mit dem Transfektionskomplex mit einer finalen siRNA-Konzentration von 50 nM pro Well behandelt und nach 5 h wurde der Überstand mit Kompletmedium ersetzt.

2.5.2. Doppelte Transfektion einer Zellsuspension

Zwischen dem Zeitpunkt des Einsetzens der Zellen auf der Kulturplatte und dem ersten Transfektionsschritt besteht nach o.a. Protokoll ein Zeitfenster von 24 h. Zum Ausgleich der Zellproliferation in dieser Zeit wurde ein modifiziertes Transfektionsprotokoll mit dem unter 2.5.1. hergestellten Transfektionskomplex zur direkten Transfektion von Zellen in Suspension nach Ablösung durch Trypsin/EDTA (s. 2.1.) benutzt [117].

Zu einer Zellkonzentration von 8×10^4 Zellen pro Well auf einer 12-Well-Zellkultur-Mikroplatte wurde der Transfektionskomplex wie unter 2.5.1. angegeben, vorsichtig gemischt und 5 h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden 90% des Mediums mit frischem antibiosefreiem Kulturmedium

(RPMI 1640 unter Zugabe von 2% Glutamin und 10% FCS) ersetzt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen ein zweites Mal mit dem Transfektionkomplex, hergestellt nach o.a. Verfahren, behandelt.

Die Ergebnisanalyse sowohl nach einfacher, wie auch nach doppelter Transfektion erfolgte nach 24 h mittels RT-PCR. Hierfür wurde die RNA, wie unter 2.2. beschrieben, unter Verwendung des TRIZOL-Reagens isoliert. Gleichermaßen erfolgten die einzelnen Schritte der PCR (s. 2.2.). Ergänzend wurde dem Mastermix Primer des konstitutiv exprimierten, menschlichen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) Gens (f: GAC CCC TTC ATT GAC CTC AAC; r: CAT ACC AGG AAA TGA GCT TG; 20 µM; 840 b; BioTeZ GmbH, Berlin, Deutschland) beigefügt. Weiterhin erfolgte nach 48 h die Messung der Translation und Oberflächenrepräsentation mittels Durchflusszytometrie (s. 2.3.).

2.5.3. Herstellung von siRNA gegen PAR-1

Neben der herkömmlich verfügbaren siRNA gegen PAR-1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) wurden mithilfe eines online verfügbaren Computerprogramms (<http://www.qiagen.com/products/genesilencing>) (Qiagen, Hilden, Germany) weitere potentielle siRNA Ziele im menschlichen PAR-1 Gen (GI Nr. 6031164) mit einer Länge von 21 Basenpaaren identifiziert [119]. Vier Zielsequenzen mit der Startposition 572, 1124, 1626 und 2858 wurden nach Eliminierung von Zielsequenzen in anderen menschlichen Genen ausgesucht. Die korrespondierenden doppelsträngigen 19-nt siRNAs mit einem 3'-Dithymidin-Überhang wurden von Qiagen (Hilden, Germany) hergestellt (s. Tabelle 2.2.). Die Zelllinien wurden gemäß Protokoll 2.5.2. mit einem Wechsel des Transfektionsreagens zu RNAiFect Reagenz (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt.

Tabelle 2.2:*Herstellung von siRNA gegen humanen PAR-1-Rezeptor als Zielsequenz*

Nr.	Sequenz	DNA-Zielsequenz	Zielposition
1	sense 5'-GGG ACU GCU GGG AGG UUA AdTdT-3' antisense 3'-dTdTCCC UGA CGA CCC UCC AAU U-5'	5'-AA GGG ACT GCT GGG AGG TTA A-3'	1626-1646
2	sense 5'-GCA GUC CUC UUC AAA AAC AdTdT-3' antisense 3'-dTdTTCGU CAG GAG AAG UUU UUG U-5'	5'-AA GCA GTC CTC TTC AAA AAC A-3'	572-592
3	sense 5'-CCC UGC UCG AAG GCU ACU AdTdT-3' antisense 3'-dTdTGGG ACG AGC UUC CGA UGA U-5'	5'-AA CCC TGC TCG AAG GCT ACT A-3'	1124-1144
4	sense 5'-ACA AGG CCU GUC AGC UAA AdTdT-3' antisense 3'-dTdTUGU UCC GGA CAG UCG AUU U-5'	5'-AA ACA AGG CCT GTC AGC TAA A-3'	2858-2878

2.6. Immunoassay (ELISA)

Zur Messung von VEGF, Interleukin-8 und Interleukin-6 wurden 2x10⁵ Zellen pro Well in einer 12-Well Kulturplatte eingesetzt. Nach einer durchgeführten doppelten Transfektion mit siRNA, wie unter 2.5. beschrieben, wurde der Überstand 48 h nach der ersten Transfektion entnommen und durch FCS-freies Medium ersetzt. Diesem wurden 0,1% BSA und 1,0 U/ml Thrombin (Enzyme Research Laboratories, South Bend, IN, USA) zugegeben. Als Kontrolle dienten Zellen inkubiert mit FCS-freiem Medium mit 0,1% BSA ohne Zugabe von

Thrombin. Die Überstände wurden 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h nach Thrombinzugabe gesammelt und bis zur Auswertung bei -80°C gelagert.

Mittels sandwich enzyme-linked immunosorbent assays (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) erfolgte der Herstelleranleitung entsprechend eine Messung der Zytokinkonzentrationen im Zellkulturüberstand. 96-Well Mikrotiterplatten wurden über Nacht mit Ziege anti-Mensch VEGF Antikörper, Maus anti-Mensch IL-8 Antikörper bzw. Maus anti-Mensch IL-6 Antikörper beschichtet. Danach folgte zunächst ein gründliches Waschen der Platten mit 0,05% Tween 20 (pH 7,2-7,4) und Blockieren mit PBS mit 1% BSA und 5% Saccharose. 100 μl des Standards bzw. der Probe wurden in ein Well gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach gründlicher Waschung wurde der korrespondierende zweite Antikörper zugefügt und für weitere 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer weiteren Waschung wurde das Streptavidin horseradish Peroxidase Konjugat aufgetragen und 20 min bei Raumtemperatur belassen. Nach einem Waschschrift und Zugabe von 100 μl Substratlösung pro Well wurde die Entwicklung nach 20 min durch Zugabe von 50 μl 2N H_2SO_4 gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

2.7. Statistik

Für die graphische Darstellung und statistische Analyse der Messergebnisse kamen das Sigma-Plot-Programm (Systat Software Inc.), das InStat-Programm (GraphPAD Software) und das Tabellenkalkulationsprogramm Excel XP (Microsoft) zur Anwendung.

Häufigkeit der Messungen:

Die Aktivitätsanalysen wurden in der Regel dreimal, bei unklaren Ergebnissen auch häufiger durchgeführt. Bei den ELISA fanden aus Kostengründen meist nur zwei Messungen (jeweils Doppelwerte mit unterschiedlichen Passagen) statt.

Zur Ergebnisanalyse wurde der arithmetische Mittelwert ermittelt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter der Angabe des arithmetischen

Mittelwertes mit dem dazugehörigen Standardfehler und der Standardabweichung.

Zum Vergleich zweier Mittelwerte eines metrischen Merkmals und zur Entscheidung ob beide Stichproben aus ein- und derselben Grundgesamtheit stammen, wurde der t-Test (zweiseitig) für verbundene Stichproben verwendet. Die Nullhypothese wurde bei dem Signifikanzniveau $p \leq 0.05$ abgelehnt und als sicher signifikant unter 1% ($0,01 > p > 0,001$) und unter 0,1% ($p < 0,001$) als hochsignifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Expression der Thrombinrezeptoren und Thrombin-assoziiertes Proteine

3.1.1. Thrombinrezeptorexpression

Aus den einzelnen Zelllinien wurde gemäß dem unter 2.2. beschriebenen Arbeitsablauf die Gesamt-RNA isoliert und mithilfe der RT-PCR zu cDNA umgeschrieben sowie nachfolgend am Thermocycler amplifiziert. Anschließend wurde mittels Gelelektrophorese das Produkt sichtbar gemacht.

3.1.1.1. PAR-1

Unter Zugabe spezifischer Primer (s. Tab. 2.1.) wurde PAR-1 als 598 bp großes Produkt amplifiziert. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies, steriles Wasser und als Positivkontrolle cDNA der menschlichen Prostatakarzinomzelllinie DU 145 (Liu et al. 2003).

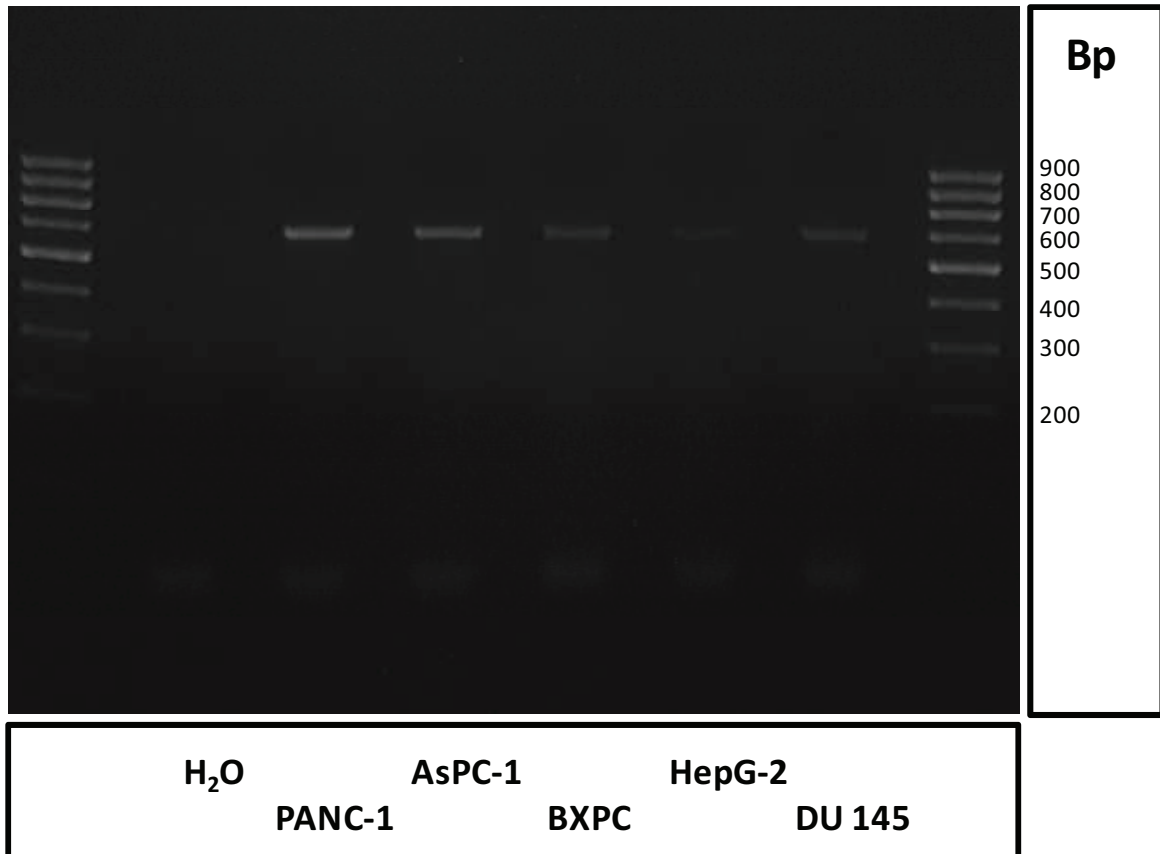


Abbildung 3.1:

Durch UV-Licht sichtbares Bild der mit Ethidiumbromid gefärbten Gelelektrophorese verschiedener Amplifikate von PAR-1

Wie in der Abbildung 3.1 ersichtlich exprimierte die Zelllinie PANC-1 PAR-1 besonders stark. Gleichfalls fand sich bei AsPC-1 ein starker Nachweis von PAR-1.

Um die Expression von PAR-1 auch an der Zelloberfläche zu beweisen, wurde entsprechend der unter 2.3 dargestellten Vorgehensweise eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Als monoklonaler Antikörper gegen PAR-1 wurde WEDE 15 benutzt, welcher sowohl gespaltene als auch ungespaltene PAR-1-Moleküle als Antigenstruktur erkennt.

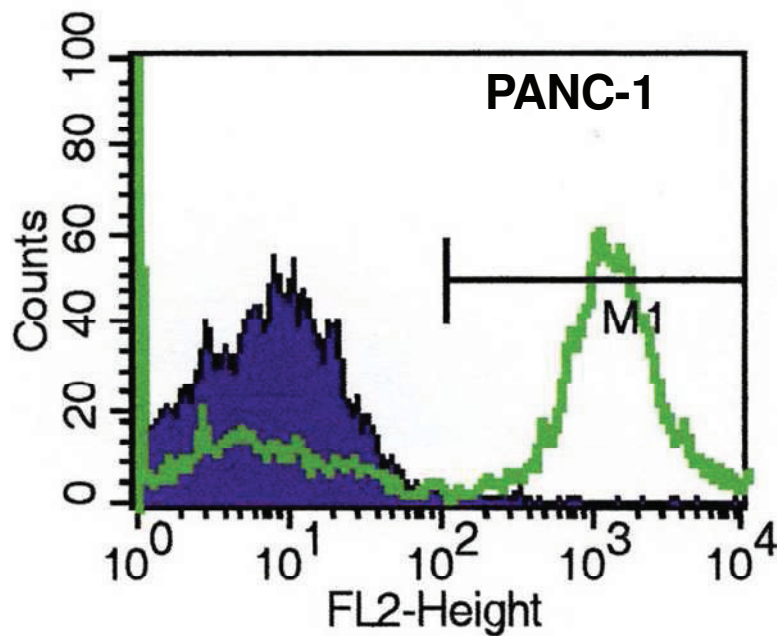


Abbildung 3.2:

Durchflusszytometrie der Zelllinie PANC-1 nach Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper WEDE15 gegen PAR-1 und dem monoklonalen Maus-Isotypen-Antikörper (MslgG1) als Negativkontrolle.

Die Kurve mit der darunter liegenden dunklen Fläche zeigt die Negativkontrolle. Die helle Kurve mit der darunter liegenden hellen Fläche zeigt die logarithmisierte Fluoreszenzintensität von gefärbtem PAR-1.

Als Ergebnis zeigte sich eine deutliche Expression von PAR-1 auf der Oberfläche von PANC-1.

Für die Zelllinien BXP-3, AsPC-1 und HepG-2 wurde diese Messung gleichermaßen durchgeführt:

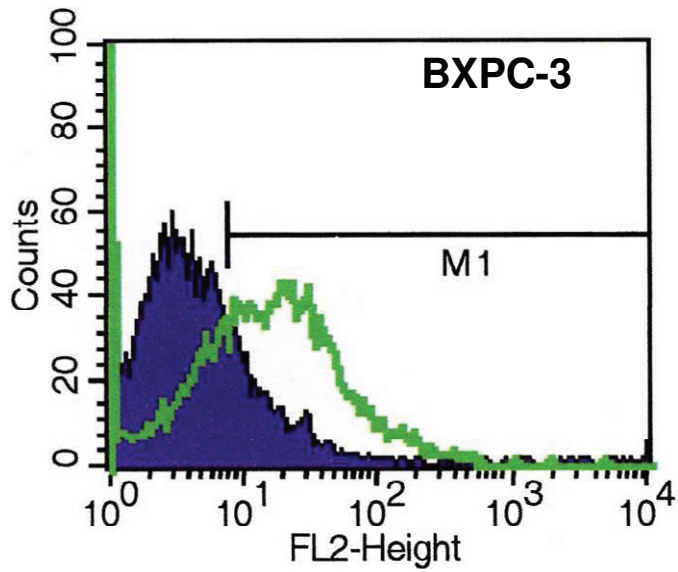


Abbildung 3.3:

Durchflusszytometrie der Zelllinie BXPC-3 nach Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern WEDE15 und MslgG1

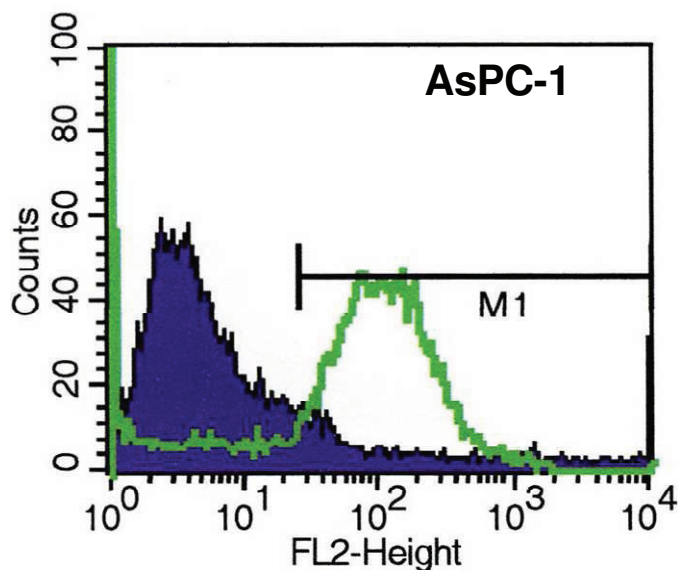


Abbildung 3.4:

Durchflusszytometrie der Zelllinie AsPC-1 nach Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern WEDE15 und MslgG1

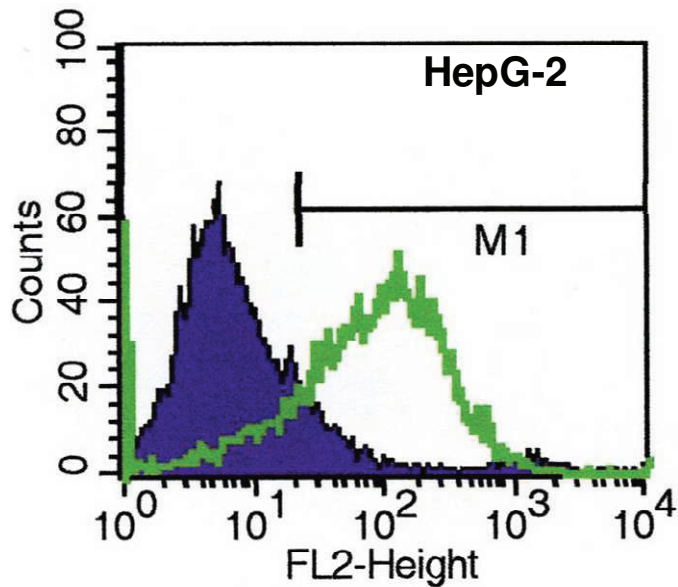


Abbildung 3.5:

Durchflusszytometrie der Zelllinie HepG-2 nach Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern WEDE15 und MslgG1

Es zeigte sich, dass alle vier Zelllinien PAR-1 auf ihrer Oberfläche präsentieren. Bei der Zelllinie BXP-3 konnte der fragliche gelelektrophoretische Nachweis durchflusszytometrisch nicht abschließend geklärt werden. Dagegen spricht bei der Zelllinie HepG-2 der schwache gelelektrophoretische Nachweis bei einem eindeutigen durchflusszytometrischen Ergebnis eher für die Expression von PAR-1.

3.1.1.2. PAR-3

PAR-3 wurde unter Zugabe spezifischer Primer (s. Tab. 2.1.) als 513 bp großes Produkt amplifiziert. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies, steriles Wasser und als Positivkontrolle cDNA menschlicher Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC).

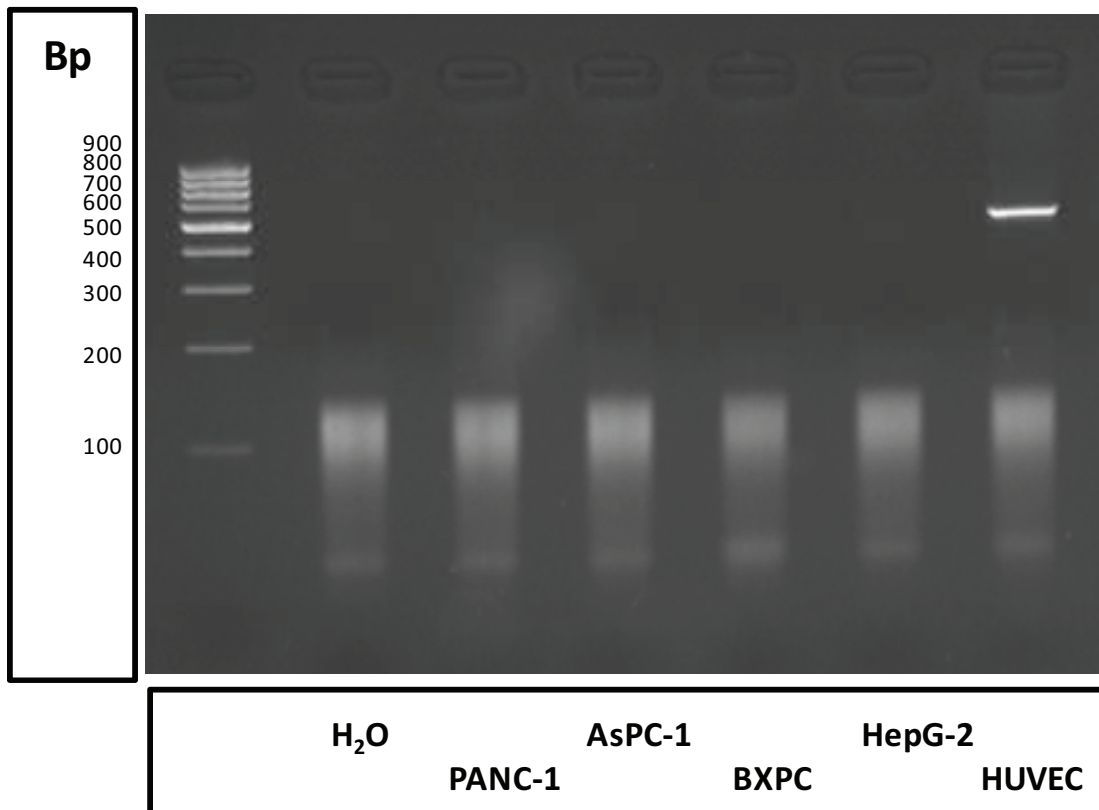


Abbildung 3.6:

Durch UV-Licht sichtbares Bild der mit Ethidiumbromid gefärbten Gelelektrophorese verschiedener Amplifikate von PAR-3

Es konnte in keiner der vier Zelllinien ein positiver Nachweis für PAR-3 geführt werden.

3.1.1.3. PAR-4

PAR-4 wurde unter Zugabe spezifischer Primer (s. Tab. 2.1.) als 121 bp großes Produkt amplifiziert. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies, steriles Wasser und als Positivkontrolle cDNA menschlicher Pankreazellen amplifiziert aus einem c-DNA-Panel (s. 2.2.).

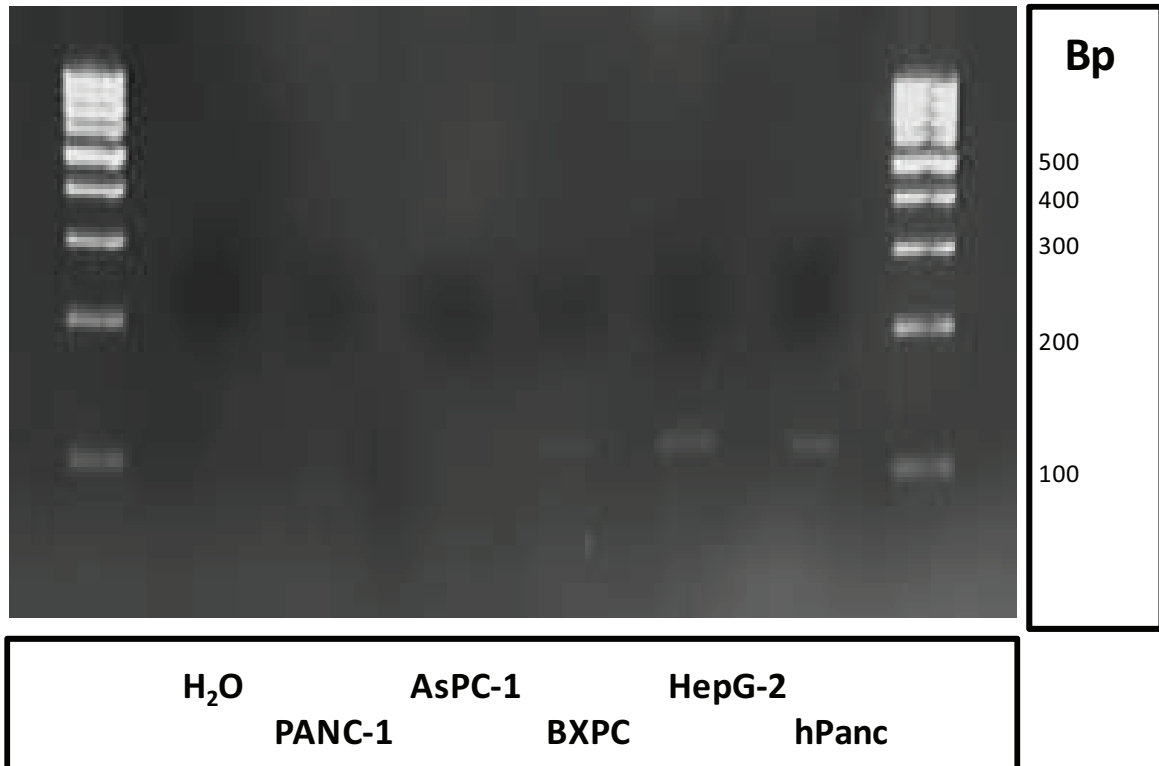


Abbildung 3.7:

Durch UV-Licht sichtbares Bild der mit Ethidiumbromid gefärbten Gelelektrophorese verschiedener Amplifikate von PAR-4

Neben der Positivkontrolle ließ sich nur bei HepG-2 ein positiver Nachweis von PAR-4 führen.

3.1.2. Expression Thrombin-assoziiertes Proteine

Aus den einzelnen Zelllinien wurde – wie unter 2.2. beschrieben - die Gesamt-RNA isoliert und mithilfe der RT-PCR zu cDNA umgeschrieben sowie amplifiziert.

3.1.2.1. Thrombomodulin

Thrombomodulin wurde unter Zugabe spezifischer Primer (s. Tab. 2.1.) als 153 bp großes Produkt amplifiziert. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies,

steriles Wasser und als Positivkontrolle cDNA menschlicher Herzzellen amplifiziert aus einem c-DNA-Panel (s. 2.2.).

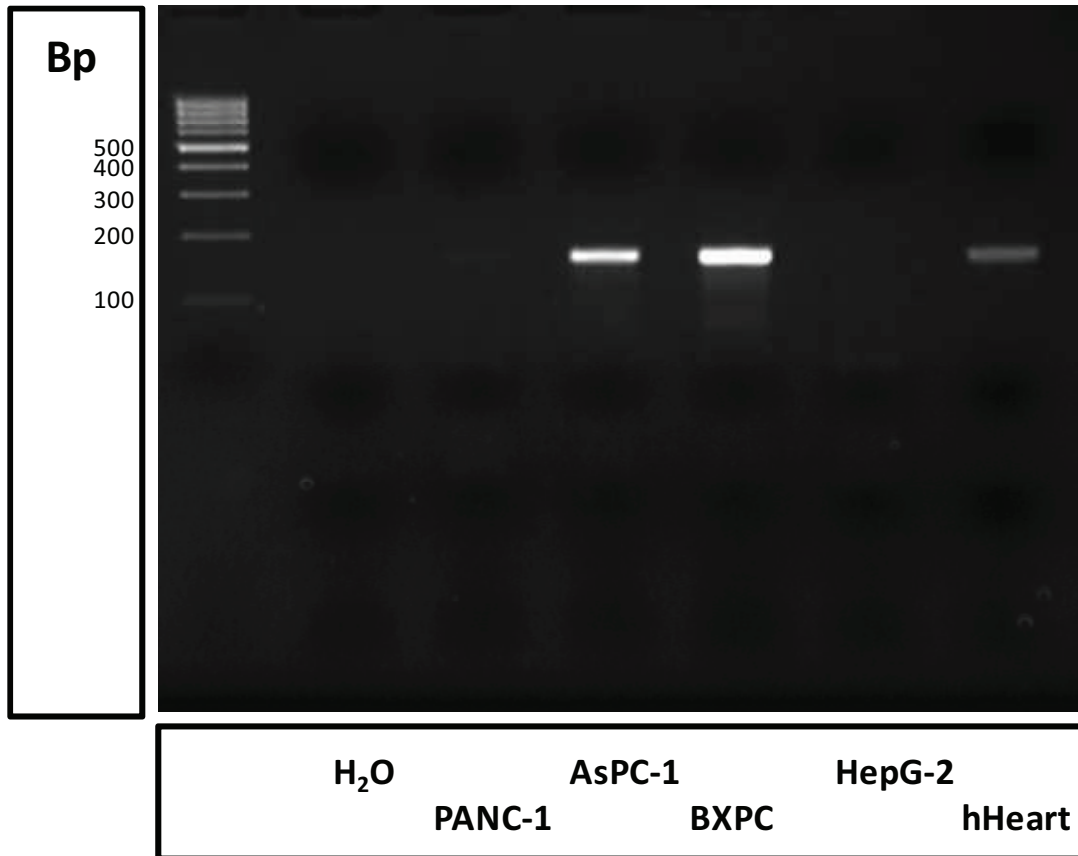


Abbildung 3.8:

Durch UV-Licht sichtbares Bild der mit Ethidiumbromid gefärbten Gelelektrophorese verschiedener Amplifikate von Thrombomodulin

BXPC-3 und AsPC-1 zeigten einen stark positiven Nachweis für Thrombomodulin. PANC-1 und HepG-2 waren negativ für Thrombomodulin.

Um die Expression von Thrombomodulin auch an der Zelloberfläche zu beweisen, wurde entsprechend dem unter 2.3. dargestellten Prozedere eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Hierfür wurde ein monoklonaler Antikörper gegen Thrombomodulin (CD 141) (American Diagnostica, Stamford, USA) benutzt, der hochspezifisch die EGF5 - EGF6-Region als Antigenstruktur erkennt und dem monoklonalen Maus-Isotypen-Antikörper (MslgG1) als Negativkontrolle.

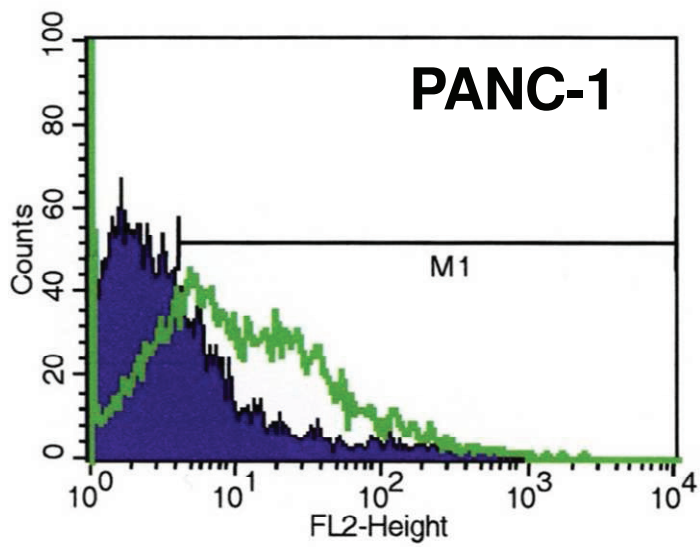


Abbildung 3.9:

Durchflusszytometrie der Zelllinie PANC-1 nach Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern CD 141 und MslgG1

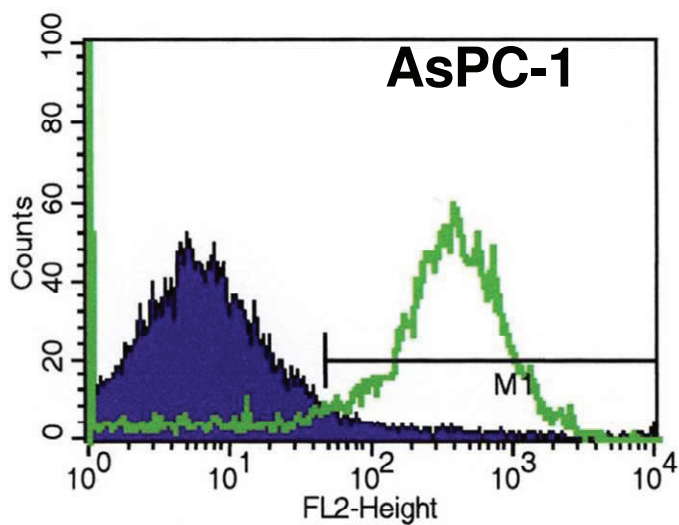


Abbildung 3.10:

Durchflusszytometrie der Zelllinie AsPC-1 nach Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern CD 141 und MslgG1

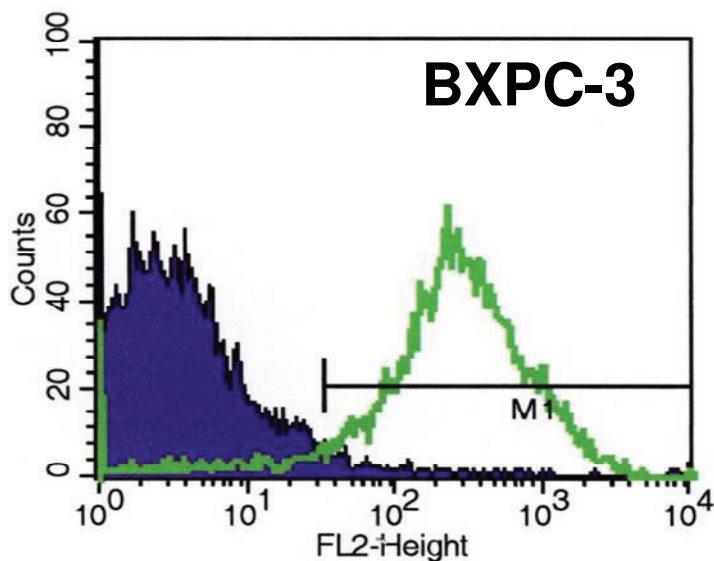


Abbildung 3.11:

Durchflusszytometrie der Zelllinie BXPC-3 nach Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern CD 141 und MslgG1

Die Kurve mit der darunter liegenden dunklen Fläche zeigt jeweils die Negativkontrolle. Die helle Kurve mit der darunter liegenden hellen Fläche zeigt die logarithmisierte Fluoreszenzintensität von gefärbtem Thrombomodulin.

Als Ergebnis zeigte sich eine deutliche Expression von PAR-1 auf der Oberfläche von BXPC-3 und AsPC-1. Für die Zelllinie PANC-1 kann nur ein quantitativ gering positiver Nachweis geführt werden.

3.1.2.2. Glykoprotein Iba

Unter Zugabe spezifischer Primer (s. Tab. 2.1.) wurde Glykoprotein Iba als 643 bp großes Produkt amplifiziert. Als Negativkontrolle diente Nuklease-freies, steriles Wasser und als Positivkontrolle cDNA von Hela CCL2-Zellen amplifiziert aus einem c-DNA-Panel (s. 2.2.).

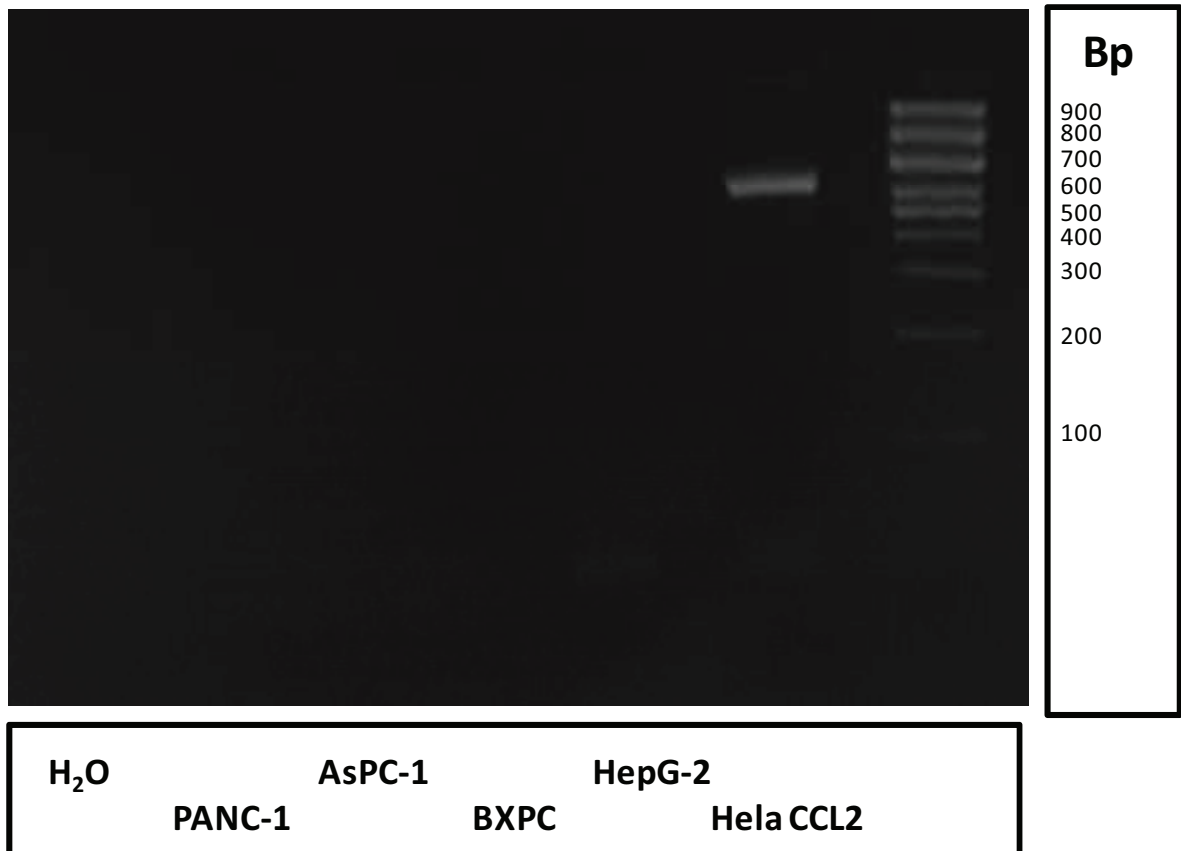


Abbildung 3.12:

Durch UV-Licht sichtbares Bild der mit Ethidiumbromid gefärbten Gelelektrophorese verschiedener Amplifikate von Glykoprotein Iba

Bei keiner der bearbeiteten Zelllinien ließ sich Glykoprotein Iba nachweisen.

3.2. Thrombinwirkung auf das Proliferationsverhalten maligner Pankreaszellen

Zur Überprüfung einer möglichen Veränderung des Proliferationsverhaltens bei manipulierten Umgebungsverhältnissen wurden die im Wachstumsarrest gehaltenen, malignen Pankreaszelllinien PANC-1, AsPC-1 und BXPC-3 ansteigenden Konzentrationen von Thrombin ausgesetzt. Jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden (h) wurden die Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens analysiert. Dies geschah in der Absicht, die

intrazelluläre Wirkung einer Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin und deren Bedeutung für das Proliferationsverhalten aufzuzeigen. (Liu et al. 2003)

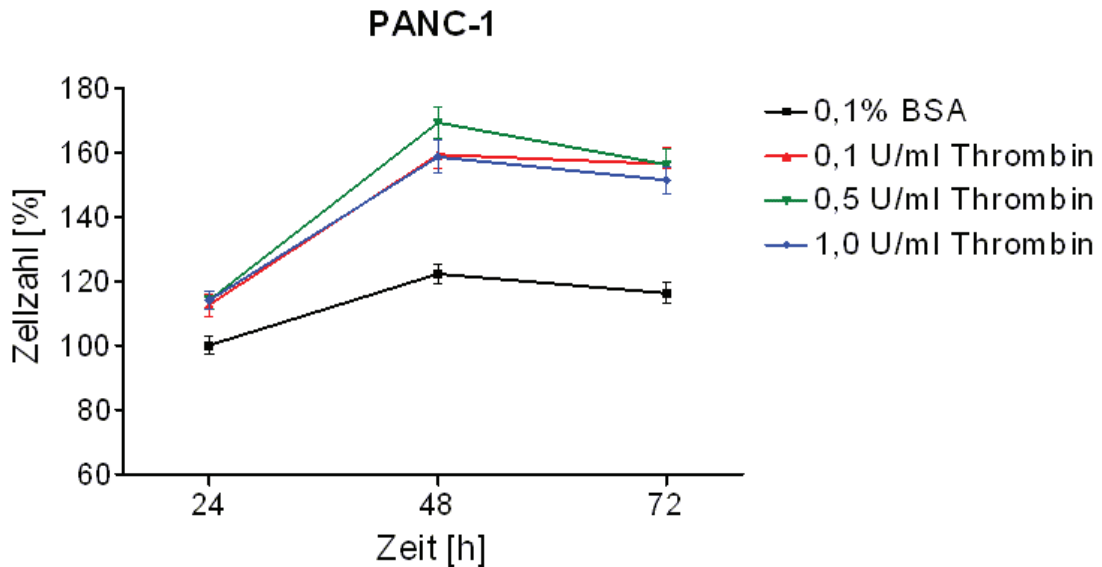


Abbildung 3.13:

Proliferationsanalyse der Zelllinie PANC-1; im Wachstumsarrest gehaltene Zellen wurden verschiedenen Thrombinkonzentrationen ausgesetzt. Zum Vergleich dienten Zellen, gehalten im Kulturmedium RPMI 1640 mit 0,1% BSA. Die Zellzahl wurde nach 24, 48 und 72 h unter Zuhilfenahme des Analyseverfahrens der photometrischen Bestimmung der Aktivität einer mitochondrialen Dehydrogenase (WST-1) ermittelt. Mindestens drei unabhängige Versuchsreihen sind zu der Zelllinie angefertigt worden.

Bei der Zelllinie PANC-1 zeigte sich bei mittlerer Thrombinkonzentration der stärkste Anstieg nach zweitägiger Inkubation (0,5 U/ml Thrombin: $p < 0,0001$ für 48 h gegen 24 h). Auch bei niedriger und hoher Thrombinkonzentration stieg das Proliferationsverhalten deutlich am zweiten Tag an (0,1 U/ml Thrombin: $p < 0,0001$ für 48 h gegen 24 h; 1,0 U/ml Thrombin: $p < 0,0001$ für 48 h gegen 24 h). Bei den im Wachstumsarrest gehaltenen Zellen war allerdings nach zweitägiger Inkubation ebenfalls ein Proliferationsanstieg zu verzeichnen (0,1% BSA: $p < 0,0001$ für 48 h gegen 24 h), der jedoch auf einem niedrigeren Level stehen blieb. Nach einem weiteren Tag Inkubation stagnierte die

Teilungsrates der Zellen jeder Konzentration auf einem Plateau mit leicht abfallender Tendenz (0,1 U/ml Thrombin: $p = 0,43$ für 72 h gegen 48 h; 1,0 U/ml Thrombin: $p = 0,12$ für 72 h gegen 48 h), welche nur für die mittlere Thrombinkonzentration statistisch signifikant war (0,5 U/ml Thrombin: $p = 0,0004$ für 72 h gegen 48 h).

Im Gegensatz zu PANC-1 zeigte sich bei AsPC-1 ein unterschiedliches Proliferationsverhalten. Bei allen drei Thrombinkonzentrationen stieg die Proliferationsrate zunächst leicht an (0,1 U/ml Thrombin: $p = 0,002$ für 48 h gegen 24 h; 0,5 U/ml Thrombin: $p < 0,0001$ für 48 h gegen 24 h), wobei der größte Anstieg bei 1,0 U/ml Thrombin zu verzeichnen war ($p = 0,002$ für 48 h gegen 24 h). Nach weiteren 24 h Inkubation stieg die Teilungsrates bei niedriger Thrombinkonzentration stark ($p = 0,0002$ für 72 h gegen 48 h) und bei mittlerer Thrombinkonzentration statistisch nicht signifikant ($p = 0,08$ für 72 h gegen 48 h) an. Bei Zugabe hoher Thrombinkonzentrationen war jedoch nach 72 h ein starker Abfall der Proliferation zu verzeichnen ($p < 0,0001$ für 72 h gegen 48 h).

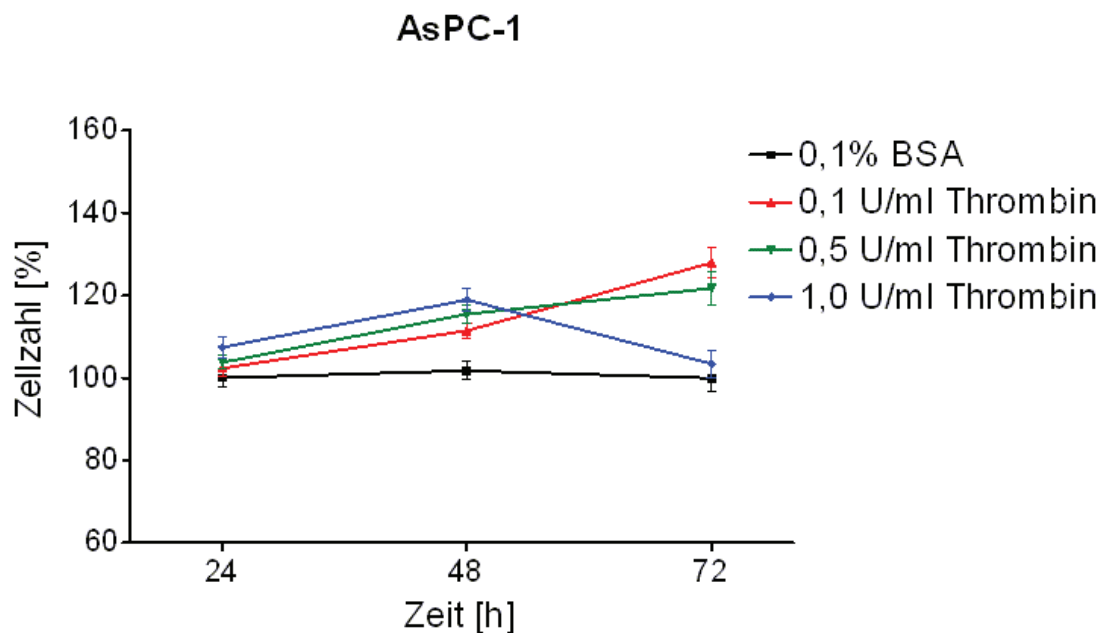


Abbildung 3.14:

Proliferationsanalyse der Zelllinie AsPC-1 (Ablauf s. Abbildung 3.13)

Die Zelllinie BXPC-3 zeigte einzig bei mittlerer Thrombinkonzentration und zweitägiger Inkubation einen signifikanten Abfall der Proliferation ($p = 0,007$ für 48 h gegen 24 h).

Ansonsten hat Thrombin scheinbar keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten (für 48 h gegen 24 h: 0,1 U/ml Thrombin: $p = 0,48$; 1,0 U/ml Thrombin: $p = 0,32$. Für 72 h gegen 48 h: 0,1 U/ml Thrombin: $p = 0,56$; 0,5 U/ml Thrombin: $p = 0,49$; 1,0 U/ml Thrombin: $p = 0,66$).

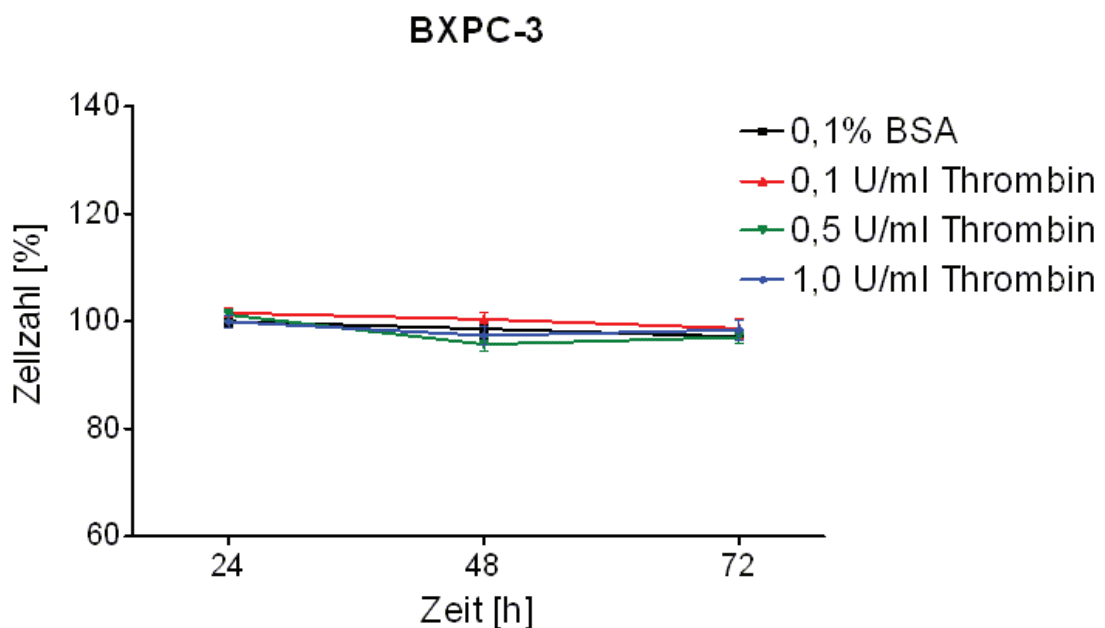


Abbildung 3.15:

Proliferationsanalyse der Zelllinie BXPC-3 (Ablauf s. Abbildung 3.13)

Ob die Veränderungen des Proliferationsverhaltens abhängig von der Thrombinspezifität und proteolytischen Aktivität sind, war mittels der bis hierhin durchgeführten Untersuchungen nicht nachweisbar.

Kontrollexperimente zu den jeweiligen Zelllinien mit o.a. Schema wurden unter Zuhilfenahme eines thrombin-spezifischen Aptamers und des irreversiblen Thrombininhibitor D-Phe-Pro-Arg Chlormethylketon (PPACK) durchgeführt.

Unter Vorbehandlung mit niedriger Thrombinkonzentration (0,1 U/ml) waren nach Beigabe des thrombin-spezifischen Aptamers ($c_{max} = 500 \mu M$) keine signifikanten Veränderungen des Proliferationsverhaltens festzustellen.

Ebenso war nach Vorbehandlung mit 1,0 U/ml Thrombin und Zugabe des irreversiblen Thrombininhibitors D-Phe-Pro-Arg Chlormethylketon (PPACK) mit finaler Konzentration von 10 µg/ml photometrisch nach Zugabe von WST-1 keine signifikante Änderung des Wachstumsverhaltens zu verzeichnen.

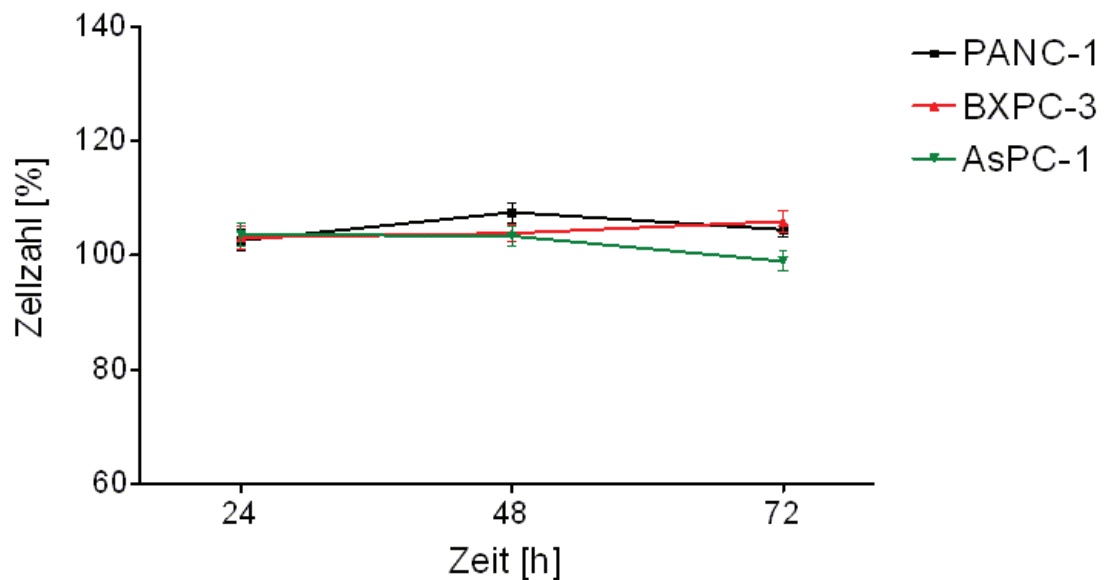


Abbildung 3.16:

Proliferationsanalyse der Zelllinien PANC-1, BXPC-3 und AsPC-1 unter Vorbehandlung mit 0,5 U/ml Thrombin und Beigabe des thrombin-spezifischen Aptamers ($c_{max} = 500 \mu M$)

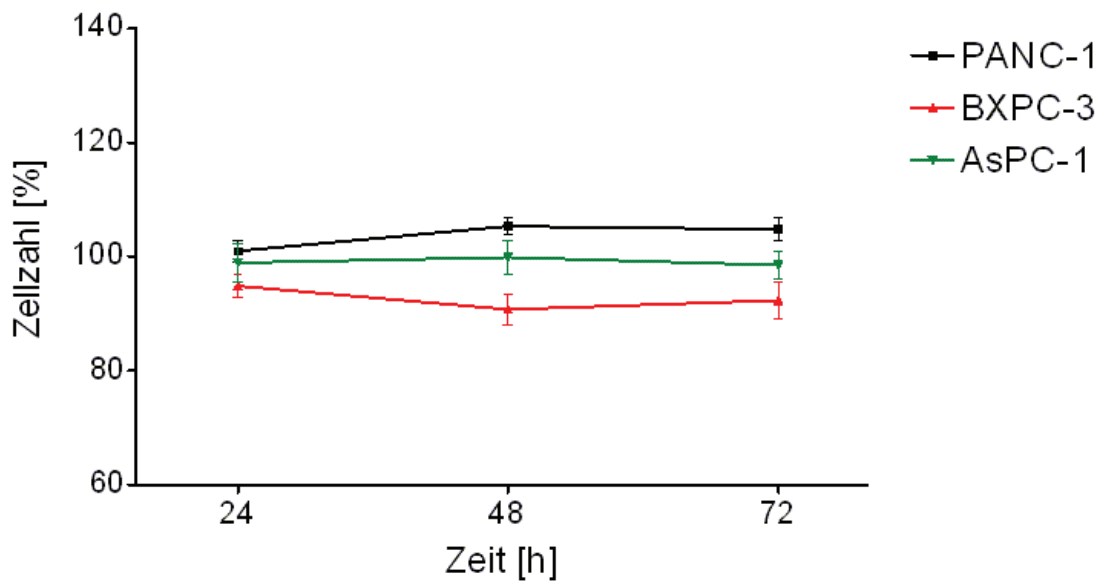


Abbildung 3.17:

Proliferationsanalyse der Zelllinien PANC-1, BXPC-3 und AsPC-1 unter Vorbehandlung mit 0,5 U/ml Thrombin und Beigabe des irreversiblen Thrombininhibitors D-Phe-Pro-Arg Chlormethylketon (PPACK)

Weiterhin wurde untersucht, ob die von Thrombin initiierten Veränderungen der Proliferationsrate in Verbindung mit dem Signalweg der mitogen activated protein (MAP) Kinasen stehen. Hierfür wurde die Versuchsanordnung insoweit geändert, dass mit 0,5 U/ml Thrombin inkubierten Zellen 20 µM des spezifischen MAP-Kinasen Inhibitor PD98059 zugegeben wurden. Nach 48 h weiterer Inkubation erfolgte die photometrische Auswertung nach Zugabe von WST-1.

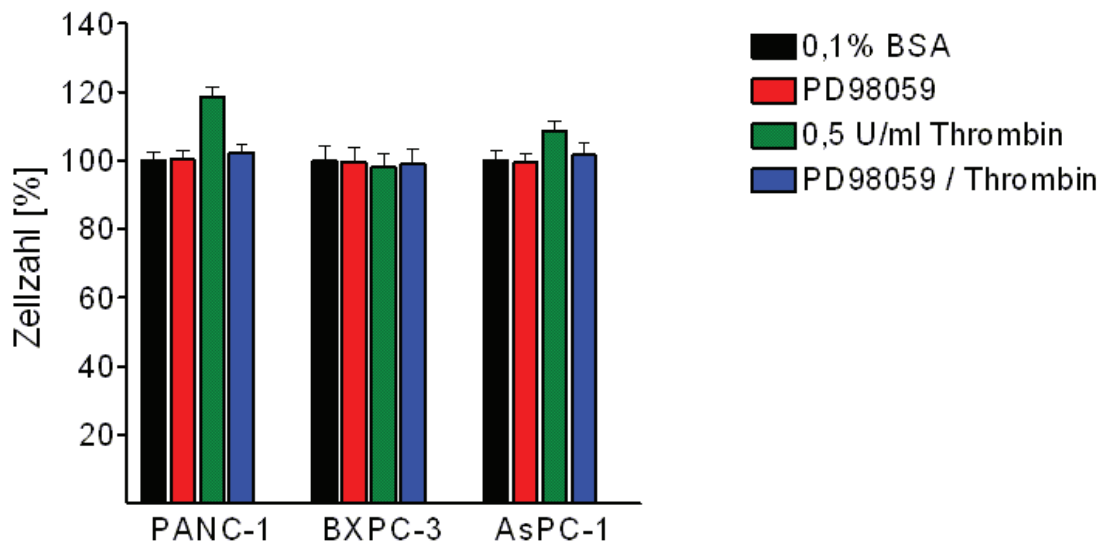


Abbildung 3.18:

Proliferationsanalyse der Zelllinien PANC-1, BXPC-3 und AsPC-1 unter Vorbehandlung mit 0,5 U/ml Thrombin und Beigabe des spezifischen MAP-Kinasen Inhibitor PD98059 (20 μ M)

Es zeigte sich, dass die Zugabe von PD98059 die Thrombinwirkung auf das Proliferationsverhalten der Zelllinien PANC-1 und AsPC-1 invertierte. Dieses Ergebnis stützt die Annahme einer Thrombinsignalgebung über den mitogen activated protein (MAP)-Kinasen-Signalweg.

3.3. RNA-silencing des Gens PAR-1

Basierend auf den Proliferationsversuchen wurde die These aufgestellt, dass zumindest bei den malignen Pankreaszelllinien PANC-1 und AsPC-1 das biologische Verhalten der Zelle in Verbindung mit der Serinprotease Thrombin steht. Daher wurde zunächst der Versuch unternommen, den für diese Signalübermittlung verantwortlichen Rezeptor PAR-1 mit den Methoden der RNAi zu silencen. Hierbei wurden die Zelllinien PANC-1 und AsPC-1 gemäß

dem Versuchprotokoll der Firma Santa Cruz spezifischer siRNA gegen PAR-1 ausgesetzt. Die anschließend isolierte RNA wurde mit der Methode der RT-PCR dargestellt.

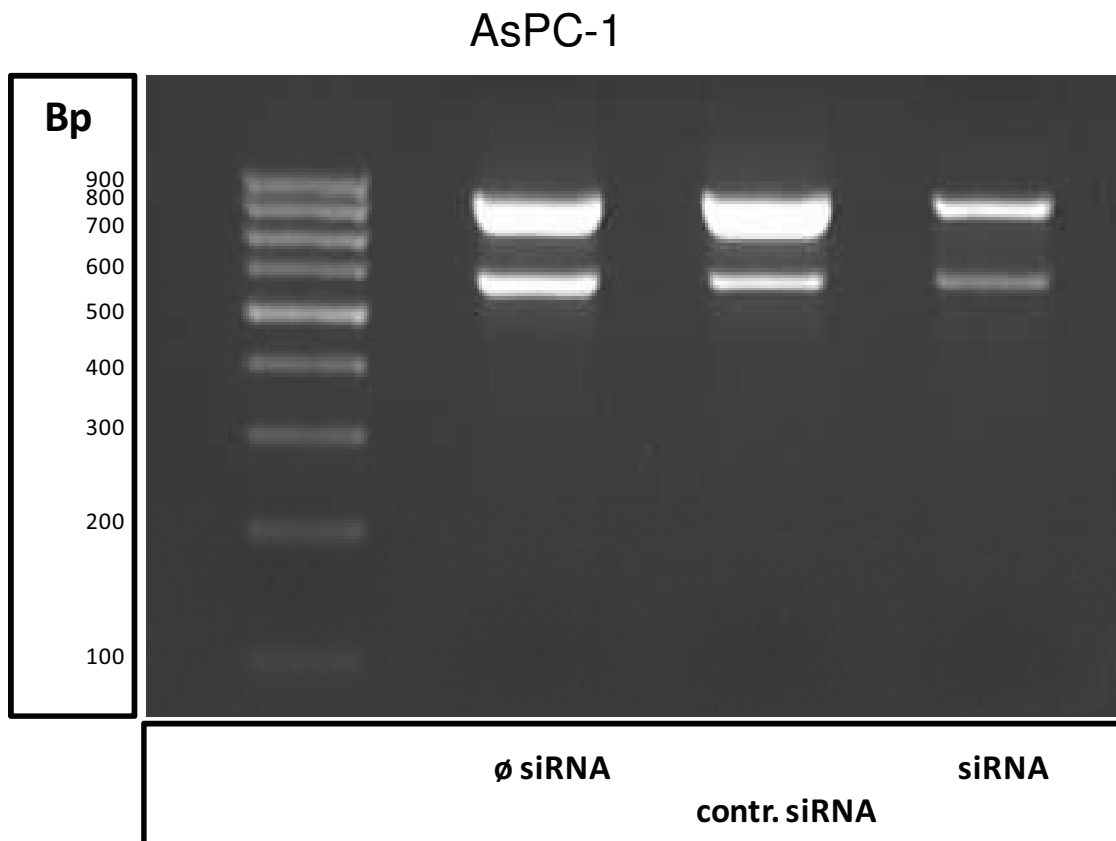


Abbildung 3.19:

PAR-1 (598 bp) und das Housekeeping-Gen GAPDH (840 bp) der Zelllinie AsPC-1 (ø siRNA) sowie der Zelllinie AsPC-1 nach Transfektion gemäß Herstellerangabe Santa Cruz sowohl mit spezifischer siRNA gegen PAR-1 (siRNA) als auch mit unspezifischer Kontroll-siRNA (contr. siRNA)

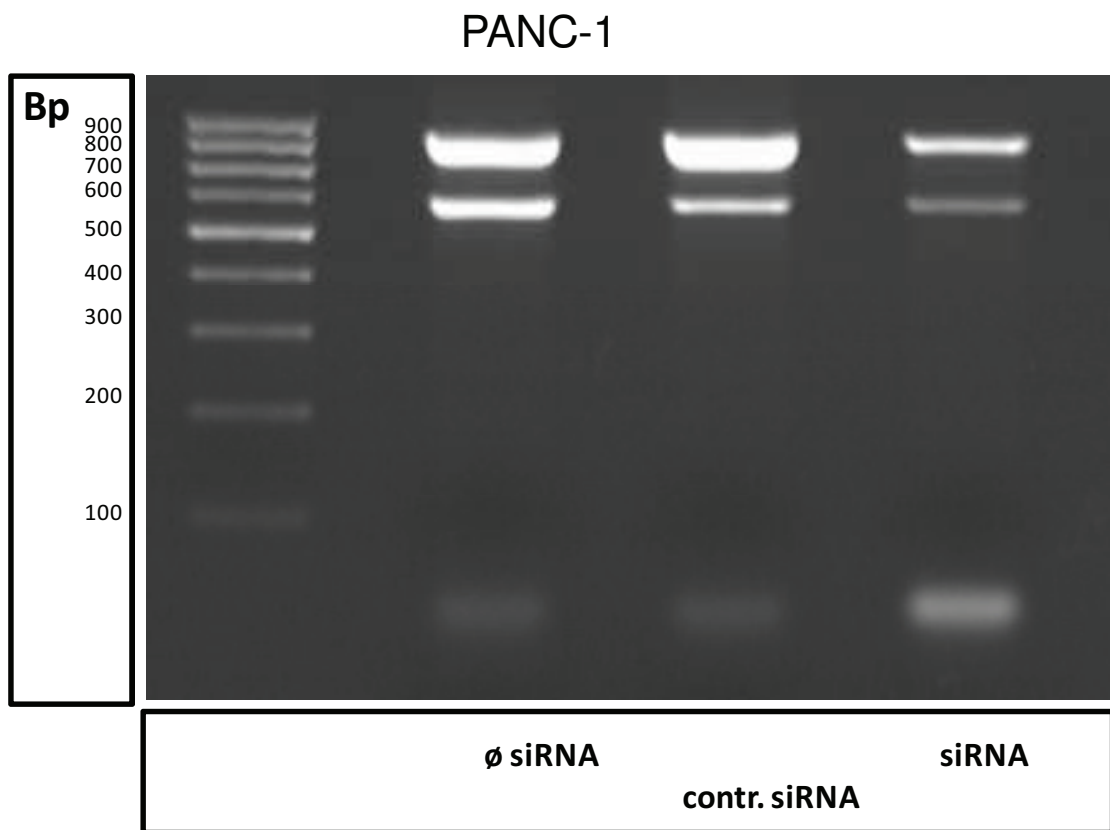


Abbildung 3.20:

PAR-1 (598 bp) und das Housekeeping-Gen GAPDH (840 bp) der Zelllinie PANC-1 (\emptyset siRNA) sowie der Zelllinie PANC-1 nach Transfektion gemäß Herstellerangabe Santa Cruz sowohl mit spezifischer siRNA gegen PAR-1 (siRNA) als auch mit unspezifischer Kontroll-siRNA (contr. siRNA)

Aus den Abbildungen 3.19 und 3.20 wird ersichtlich, dass sich die Signalintensität von PAR-1 in Relation zur Signalintensität des Housekeeping-Gen GAPDH bei mit spezifischer siRNA behandelten Zellen nicht wesentlich von unbehandelten bzw. mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen unterscheidet. Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde der Schluss gezogen, dass sich die Expression des PAR-1-Gens mit der herkömmlichen Versuchsanordnung der Firma Santa Cruz für die Zelllinien PANC-1 und AsPC-1 nicht sicher verändern lässt. Daraufhin wurde die modifizierte Versuchsanordnung der doppelten Transfektion unter Zuhilfenahme alternativer, synthetisierter siRNA benutzt.

AsPC-1

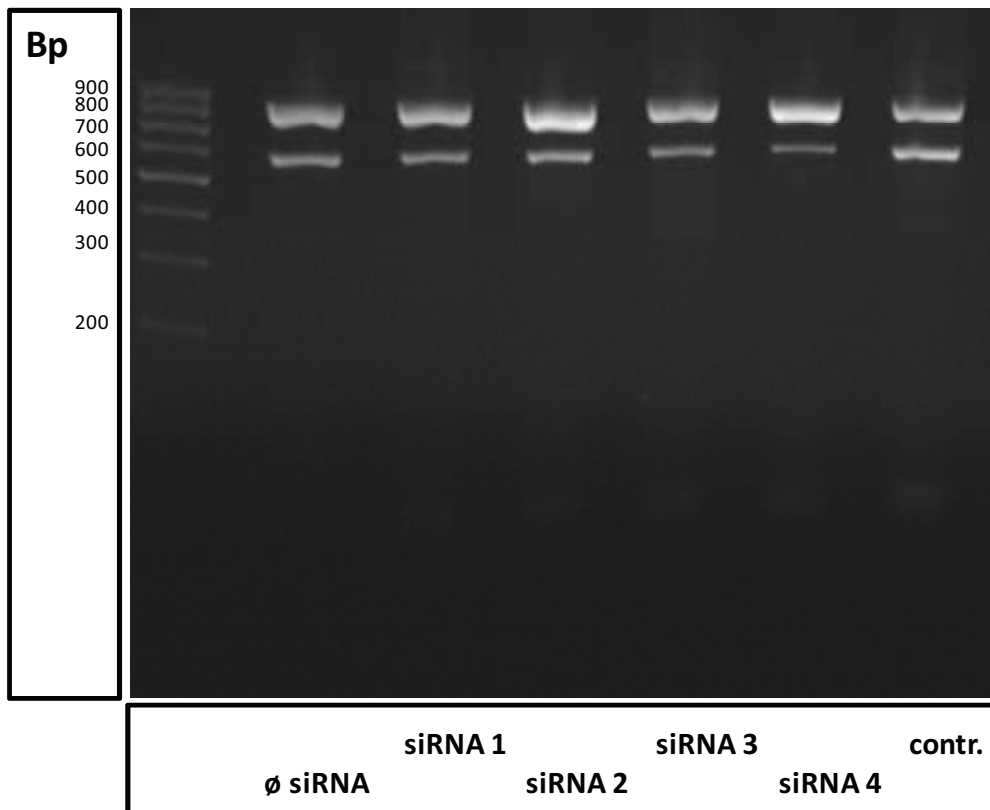


Abbildung 3.21:

PAR-1 (598 bp) und das Housekeeping-Gen GAPDH (840 bp) der Zelllinie AsPC-1 (ø siRNA) sowie der Zelllinie AsPC-1 nach Transfektion mit verschiedener, spezifischer siRNA gegen PAR-1 (siRNA 1-4) und unspezifischer Kontroll-siRNA (contr. siRNA) unter Benutzung eines modifizierten Transfektionsprotokolls. Die Zellen wurden noch in Suspension mit 50 nM siRNA behandelt. Zur Minimierung des zytotoxischen Effekts des Transfektionskomplexes auf Zellen in Suspension wurde nach 5 h 90% des Mediums mit frischem Medium ersetzt, um die Konzentration des Transfektionskomplexes zu reduzieren und einer abnehmenden Zellzahl vorzubeugen. Nach 24 h erfolgte eine Retransfektion der adhärennten Zellen mit siRNA gleicher Konzentration.

PANC-1

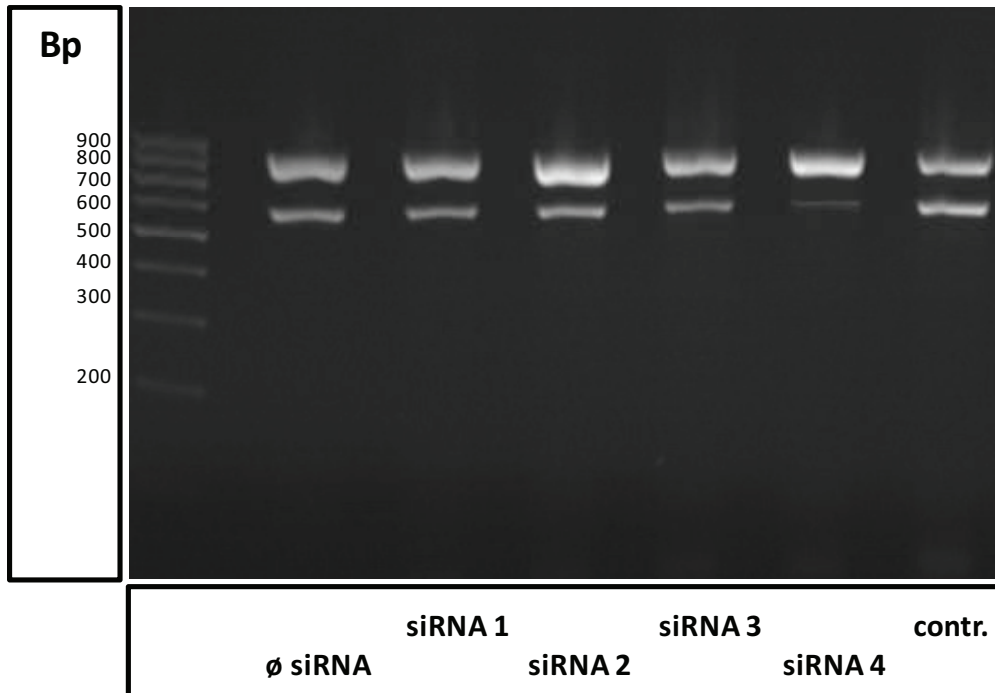


Abbildung 3.22:

PAR-1 (598 bp) und das Housekeeping-Gen GAPDH (840 bp) der Zelllinie PANC-1 (ø siRNA) sowie der Zelllinie PANC-1 nach Transfektion mit verschiedener, spezifischer siRNA gegen PAR-1 (siRNA 1-4) und unspezifischer Kontroll-siRNA (contr. siRNA) mit Benutzung eines modifizierten Transfektionsprotokolls (s.o.).

Die Abbildungen 3.21 und 3.22 verdeutlichen, dass mit synthetisierter siRNA 4 die PAR-1-Expression bei PANC-1 hinsichtlich eines Gen-silencing verändert werden konnte. Bei der Zelllinie AsPC-1 konnte siRNA 4 allenfalls ein geringes Silencing des PAR-1-Gens erwirken.

Daher wurde anschließend bei der Zelllinie PANC-1 der Effekt des Gen-silencing von PAR-1 auf Proteinlevel nach Behandlung mit siRNA 4 durchflusszytometrisch überprüft, um zu zeigen, dass es zu einer Abnahme des Rezeptors auf der Zelloberfläche kommt.

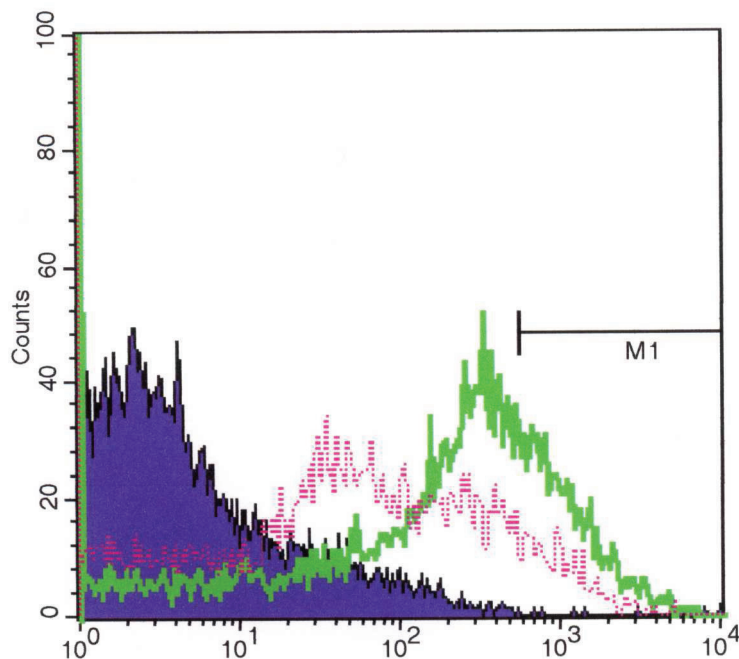


Abbildung 3.23:

Durchflusszytometrische Analyse des Gen-silencing von PAR-1 bei der Zelllinie PANC-1 nach doppelter Transfektion mit 50 nM siRNA bei adhärennten Zellen und in Zellsuspension. Durchführung 72 h nach initialer Transfektion mit Benutzung des monoklonalen Antikörper WEDE 15 gegen PAR-1 und dem monoklonalen Maus-Isotypen-Antikörper (MslgG1) als Negativkontrolle bei unbehandelten Zellen

In der Abbildung 3.23 repräsentiert die Kurve mit der darunter liegenden dunklen Fläche die mit dem monoklonalen Maus-Isotypen-Antikörper (MslgG1) als Negativkontrolle unbehandelten Zellen. Die grüne Kurve zeigt die logarithmisierte Fluoreszenzintensität von Zellen behandelt mit unspezifischer siRNA und die gestrichelte rote Kurve mit der darunter liegenden unausgefüllten Fläche zeigt die mit spezifischer siRNA gerichtet gegen mRNA von PAR-1 behandelten Zellen.

Als Ergebnis zeigte sich eine deutliche Abnahme der Rezeptorbesetzung von PAR-1 auf der Oberfläche von PANC-1-Zellen nach Behandlung mit spezifischer siRNA.

Somit wurde dargestellt, dass das Expressionsmuster maligner Pankreaszelllinien der Zelllinie PANC-1 hinsichtlich PAR-1 mit den Methoden der RNAi veränderbar ist.

3.4. Thrombinwirkung auf die Sekretion von Wachstums- und Angiogenesefaktoren

Nachdem bei der Zelllinie PANC-1 die Expression von PAR-1 nach Behandlung mit spezifischer siRNA gerichtet gegen mRNA von PAR-1 reduziert werden konnte (s. 3.3), wurde der Frage nachgegangen, ob Gen-silencing von PAR-1 direkte zelluläre Konsequenzen hinsichtlich der Zytokinsekretion hat. Hierfür wurden Zellen der Zelllinie PANC-1 nach einer doppelten Transfektion mit siRNA 4 (s. 2.5) 48 h nach der ersten Transfektion 1,0 U/ml Thrombin eingesetzt. Nach weiteren 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h wurde der Überstand gesammelt und durch sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) für Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und vascular endothelium growth factor (VEGF) analysiert. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

3.4.1. Interleukin-6

Bei den Zellen der Zelllinie PANC-1, die mit unspezifischer siRNA behandelt wurden, kam es nach Zugabe von Thrombin zu einem Anstieg der IL-6-Sekretion ($p = 0,03$ non siRNA gegen non siRNA/Thrombin nach 48 h). Eine Unabhängigkeit der Zellen von der Thrombingabe nach Behandlung mit spezifischer siRNA konnte nicht bewiesen werden ($p = 0,26$ siRNA gegen siRNA/Thrombin nach 48 h). Außerdem zeigte sich eine signifikante Abnahme der IL-6-Sekretion nach Behandlung mit spezifischer siRNA gegen PAR-1 sowohl mit als auch ohne Thrombinbeigabe ($p = 0,006$ non siRNA gegen siRNA nach 48 h; $p = 0,02$ non siRNA/Thrombin gegen siRNA/Thrombin nach 48 h).

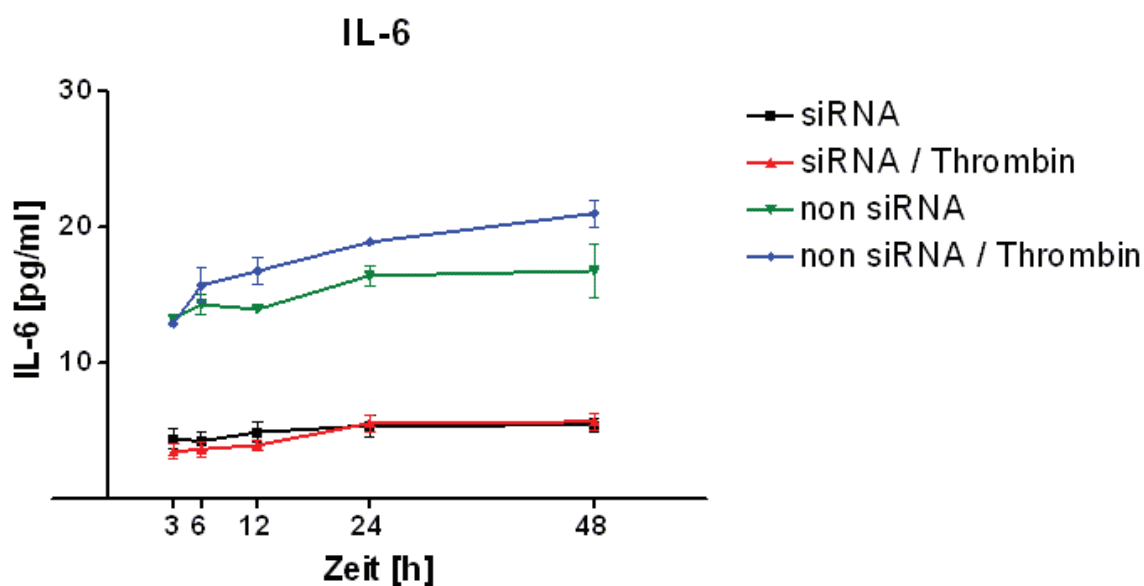


Abbildung 3.24:

IL-6-Sekretion der Zelllinie PANC-1. Die Zellen wurden gemäß der doppelten Transfektion (s. 2.5) mit spezifischer siRNA 4 (siRNA) und unspezifischer siRNA als Kontrolle (non siRNA) behandelt. 48 h nach der ersten Transfektion wurde ein Teil der Zellen 1,0 U/ml Thrombin (siRNA/Thrombin; non siRNA/Thrombin) ausgesetzt und der Überstand nach weiteren 3 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h gesammelt und mittels ELISA-Technik analysiert.

3.4.2. Interleukin-8

Die Sekretion von IL-8 bei der Zelllinie PANC-1 nahm 24 h nach Zugabe von Thrombin bei den mit unspezifischer siRNA behandelten Zellen zu ($p = 0,04$ non siRNA gegen non siRNA/Thrombin nach 24 h). Der Abfall nach weiteren 24 h war statistisch nicht zu beweisen ($p = 0,49$ non siRNA gegen non siRNA/Thrombin nach 48 h). Auch konnte nicht gezeigt werden, dass die gleich niedrige IL-8-Sekretion nach Behandlung mit spezifischer siRNA nach 48 h unabhängig von der Thrombinzugabe ist ($p = 0,38$ siRNA gegen siRNA/Thrombin nach 48 h). Allerdings kam es zu einer signifikanten Abnahme der IL-8-Sekretion nach Behandlung mit spezifischer siRNA gegen PAR-1

sowohl mit als auch ohne Thrombinbeigabe ($p = 0,002$ non siRNA gegen siRNA nach 48 h; $p = 0,04$ non siRNA/Thrombin gegen siRNA/Thrombin nach 48 h).

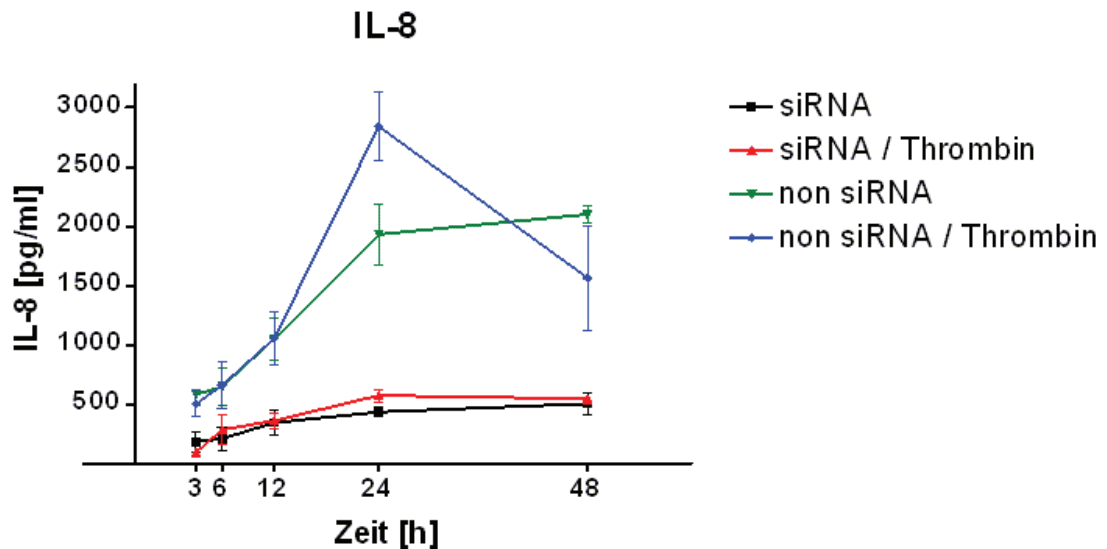


Abbildung 3.25:

IL-8-Sekretion der Zelllinie PANC-1 nach Behandlung mit spezifischer siRNA gegen PAR-1

3.4.3. Vascular Endothelium Growth Factor

Die Zugabe von Thrombin bei der Zelllinie PANC-1 nach Vorbehandlung mit unspezifischer siRNA führte nach 48 h zu einem signifikanten Anstieg der VEGF-Ausschüttung ($p = 0,05$ non siRNA/Thrombin 3 h gegen 48 h). Jedoch konnte auch bei der Behandlung mit spezifischer siRNA und nachfolgender Gabe von Thrombin ein Anstieg der VEGF-Sekretion verzeichnet werden ($p = 0,04$ siRNA/Thrombin 3 h gegen 48 h). Auf Grund der divergierenden Ergebnisse konnten wir nicht zeigen, ob die Steigerung der VEGF-Sekretion eine Abhängigkeit von der Thrombinzugabe hat ($p = 0,61$ non siRNA gegen non siRNA/Thrombin nach 48 h; $p = 0,09$ siRNA gegen siRNA/Thrombin nach 48 h). Außerdem blieb anhand der Versuchsergebnisse ungeklärt, ob die Vorbehandlung mit spezifischer siRNA gegen den PAR-1 Rezeptor das

Sekretionsverhalten bezüglich des proangiogenetischen Wachstumsfaktors VEGF beeinflusst ($p = 0,36$ non siRNA gegen siRNA nach 48 h; $p = 0,67$ non siRNA/Thrombin gegen siRNA/Thrombin nach 48 h).

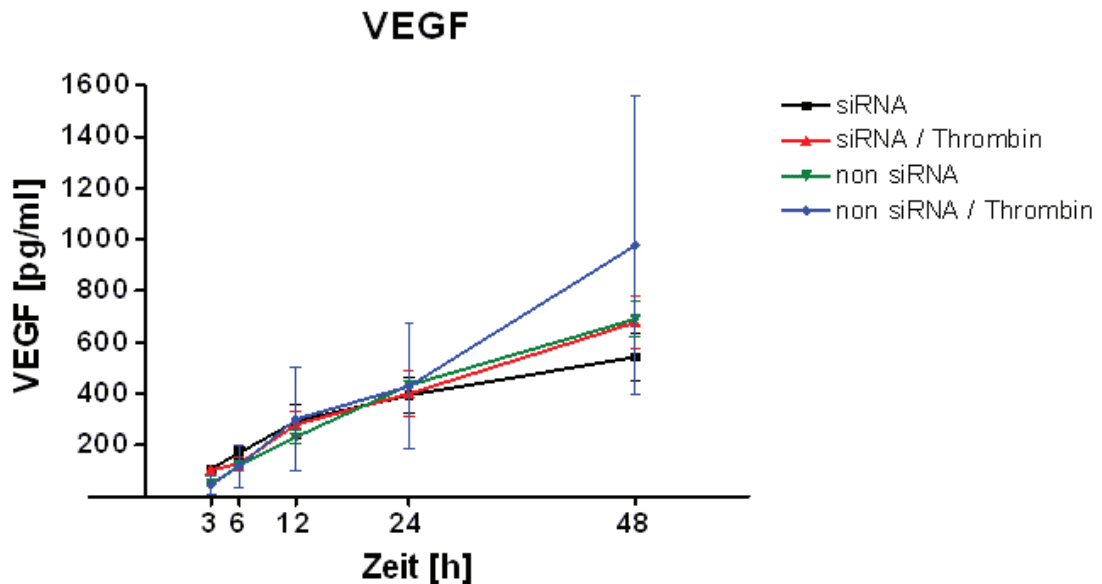


Abbildung 3.26:

VEGF-Sekretion der Zelllinie PANC-1 nach Behandlung mit spezifischer siRNA gegen PAR-1

4. Diskussion

4.1. Expression der Thrombinrezeptoren und Thrombin-assoziiierter Proteine

4.1.1. Expression der Protease-Activated Receptors (PARs)

In der vorliegenden Studie zeigt sich das Protease-Activated Rezeptor-Profil unterschiedlicher maligner Pankreaszellen. Bei den Zelllinien PANC-1, AsPC-1 und BXPC-3 ließ sich PAR-1 in zweifacher Hinsicht nachweisen; zum einen auf prätranslationaler Ebene durch den Nachweis zytosolischer mRNA, zum anderen auf posttranslationaler Ebene durch durchflusszytometrischen Nachweis des Proteins. Anhand dieser Beobachtung steht fest, dass die

malignen Pankreaszelllinien PANC-1, AsPC-1 und BXPC-3 in vitro - im Gegensatz zu benignen Pankreaszellen [58] - den Thrombinrezeptor PAR-1 transkribieren, translatieren und auf ihrer Oberfläche präsentieren.

Die Ergebnisse der PAR-1 m-RNA sind in dieser Studie rein qualitativ erzielt worden. Es wurde kein Versuch des quantitativen PAR-1-mRNA-Nachweises unternommen. Hierzu sei angemerkt, dass eine gewöhnliche RT-PCR genügt, um das Ergebnis zu erbringen. Mit den gleichen Primern sind mit ähnlichen Versuchsanordnungen an malignen Prostatazellen Studien mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt worden [53]. Es gab jedoch auch andere Studien zur Überprüfung der Expression von PAR-1 auf malignen Zelllinien, die keine direkt eindeutigen Ergebnisse erzielen konnten, sondern auf die Methode der nested-PCR mit deutlich höherer Sensitivität zurückgreifen mussten [113].

Für die Thrombinrezeptoren PAR-3 und PAR-4 wurde bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Pankreaszelllinien mit den verwendeten Methoden kein eindeutig positiver Nachweis erbracht. Jedoch konnte gezeigt werden, dass zumindest die hepatozelluläre Karzinomzelllinie Hep-G2 positiv für PAR-4 ist.

Die Expression von PAR-1 bei PANC-1 ist bereits beschrieben [120-121], die fehlende Expression von PAR-3 und PAR-4 bei PANC-1 findet in der Literatur bisher keine Erwähnung. Auch die Expression der Rezeptoren der PAR-Familie bei den Zelllinien AsPC-1 und BXPC-3 ist bislang unerforscht.

Rudroff und Kollegen konnten bei der Pankreaskarzinomzelllinie MIA PaCa-2 eine starke Überexpression von PAR-1 nachweisen [57-58]. Durch den positiven Nachweis von PAR-1 bei den Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1, AsPC-1 und BXPC-3 stützt diese Studie somit die These, dass das Pankreaskarzinom generell PAR-1 exprimiert. Dies steht im krassen Gegensatz zu der Tatsache, dass sich PAR-1 bei normalem Pankreasgewebe nicht nachweisen lässt [58]. Die Rezeptoren PAR-3 und PAR-4 scheinen im Pankreas zusammenhangslos gegenüber Malignität zu sein.

Zur Aktivierung von PAR-1 benötigt der Tumor eine hohe Aktivität von Thrombin im Tumormikroenvironment. Wahrscheinlich erwirbt der Tumor selbst im Zuge seiner Entdifferenzierungsvorgänge die Fähigkeit, Thrombin zu generieren.

Aber auch die strukturgebenden Bindegewebszellen und lokoregionalen Leukozyten des Tumorstromas generieren Thrombin [122].

Die normale Pankreazelle verfügt physiologisch über die Fähigkeit, Trypsin zu bilden, die den Protease-Activated Receptor-2 (PAR-2) hauptsächlich neben einer Vielzahl weiterer endogener und exogener Proteasen (Mastzelltryptase, Kallikrein u.a.) aktiviert [50].

Eine der Hauptfunktionen von PAR-2 ist die Sekretionsregulation exokriner Drüsen im Gastrointestinaltrakt. Zunächst beschrieben Bohm und Kollegen die PAR-2 vermittelte Sekretion von Amylase in Pankreasazinuszellen der Ratte [123], mittlerweile ist es eine anerkannte Tatsache, dass PAR-2 eine Schlüsselrolle in der exokrinen Pankreassekretion einnimmt. Die Aktivierung von PAR-2, oberflächenexprimiert sowohl im Azinus als auch im Gangsystem des Pankreas, führt zur Stimulierung der Pankreassekretion. PAR-2 - im gesunden Pankreas nur von untergeordneter Bedeutung - scheint bei Vorliegen einer Pankreatitis ein Protektivfaktor zu sein. Im Anfangsstadium einer Pankreatitis wird durch die Trypsin-gesteuerte Aktivierung von PAR-2 im Azinus die Sekretion von Verdauungsenzymen inklusive Trypsinogen angeregt, so dass durch fallende intrapancreatische Enzymkonzentrationen die Schwere der Pankreatitis begrenzt wird. Dahingegen wird jedoch durch Aktivierung von PAR-2 auf intrapancreatischen Sensorneuronen die Entzündung gefördert. Außerdem scheint diese Aktivierung in Zusammenhang mit der Schmerzentstehung im Zuge einer Pankreatitis zu stehen. Insgesamt könnten Proteinaseinhibitoren und PAR-2-Antagonisten eine therapeutische Option bei der Behandlung der Schmerzen einer akuten Pankreatitis sein [124-127].

Die Bedeutung von PAR-2 für die Tumorprogression ist noch nicht gänzlich entschlüsselt. Allerdings scheint auch PAR-2 ein wichtiges Signalmolekül für Tumordinvasion, Tumorstadium und Metastasierung zu sein. Eine Teilnahme in diese Prozesse bei Vorliegen eines Magen-, Mamma-, Kolon-, Pankreas- oder Cervixkarzinoms ist bewiesen. In vitro zeigt sich, dass die Aktivierung von PAR-2 die Proliferation differenzierter Pankreaskarzinome induziert, wohingegen eine Antagonisierung diese Proliferation unterdrückt [128].

Insgesamt muss auch hier noch Grundlagenforschung erfolgen, damit neue klinische Erkenntnisse gewonnen werden können.

Tabelle 4.1:

Thrombinrezeptorexpression maligner Pankrezelllinien (Die kommerziellverfügbaren Pankreaskarzinomzelllinien HPAF-II, HPAC, LTPA, HAP-T1, HAP-T3, HUP-T4, , HPD-2NR, BETA-TC-3, YApC, KCI-MOH1 und TA-85B5 sind bislang nicht hinsichtlich ihres Thrombinrezeptorprofils untersucht worden.)

Zelllinie	PAR-1	PAR-3	PAR-4	GPIIb α	TM	Quelle
PANC-1	+	-	-	-	-	Vorliegende Arbeit
AsPC-1	+	-	-	-	+	Vorliegende Arbeit
BXPC-3	+	-	-	-	+	Vorliegende Arbeit
MIA PaCa-2	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	[57]
PA-TU8988T, CAPAN-1, CAPAN-2, DAN-G	+	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	[58]

n.u.: nicht untersucht

4.1.2. Expression von Thrombomodulin und fehlende Expression von Glykoprotein Iba

Die Zelllinien BXPC-3 und AsPC-1 zeigten in der vorliegenden Studie einen stark positiven Nachweis für Thrombomodulin. Thrombomodulin wurde sowohl auf prätranslationaler Ebene durch den Nachweis zytosolischer mRNA als auch auf posttranslationaler Ebene durch durchflusszytometrische Messung des Proteins gefunden.

Bereits Oikawa und Kollegen konnten 1994 zeigen, dass Thrombomodulin von den verwendeten Zelllinien exprimiert wird [129] und erhofften sich in der Analyse des Plasmaspiegels - ähnlich des etablierten Markers für vaskuläre und lymphatische Tumore [68] - einen potenten Marker für das Pankreaskarzinom. Dieses Ziel konnte aber bislang nicht erreicht werden.

Folgend zeigte sich eine Verbindung von Prognose und vorhandener bzw. fehlender Thrombomodulinexpression bei unterschiedlichen Tumorentitäten mit heterogener Ausprägung [130-132]. Mit Blick auf die Tatsache, dass thromboembolische Ereignisse eine häufige Komplikation bei Auftreten des Pankreaskarzinoms sind, ist die Produktion von Thrombomodulin und die dadurch fehlende Feinregulation der Hämostase eine teilweise Erklärung dieser fehlenden Balance.

Auch Hanly und Kollegen postulieren, dass Thrombomodulin eine entscheidende Rolle in der Tumorbiologie einnehme [69] und erklären, Thrombomodulin könne ein zukünftiger Ansatzpunkt therapeutischer Bemühungen sein, die Ausbreitung des Tumors einzudämmen und möglicherweise sogar zu verhindern.

Es ist Tatsache, dass bei kolorektalen Karzinomen ein Verlust der Thrombomodulinexpression mit fortgeschritteneren Stadien und einer schlechteren Überlebensprognose einhergeht [70]. Klinische Studien beweisen eine geringere Überlebenszeit mit schlechterer Prognose bei fehlender Thrombomodulinexpression des Primärtumors. Außerdem ist den Studien zu entnehmen, dass Thrombomodulin-positive Tumorzellen signifikant seltener in metastatischen Absiedlungen als im Primärtumor zu finden waren [131].

Weitere Studien an Plattenepithelkarzinomen der Lunge betrachteten neben der Thrombomodulinexpression die Gefäßinvasion des Tumors. Man kam zu dem Ergebnis, dass Patienten mit fehlender Thrombomodulinexpression und bestätigter vaskulärer Invasion eine 5-Jahresüberlebensrate von 21 % im Gegensatz zu 90 % mit positiver Thrombomodulinexpression und fehlender Gefäßinvasion hatten [133].

An dieser Stelle ist festzuhalten, dass verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien Thrombomodulin exprimieren. Inwieweit sich diese Expression zu Gunsten oder zu Ungunsten des Patienten auswirkt, ist hier nicht erörtert, allerdings ein interessanter Ansatzpunkt für zukünftige klinische Studien. Die Forschung an Thrombomodulin liefert interessante Aspekte der Tumorbilogie.

Es ergeben sich immer wieder Ansätze, dass das Glykoprotein Iba und insbesondere die Glykoprotein Iba-Thrombin-Interaktion für das Voranschreiten von Malignität von Bedeutung ist. Oleksowicz und Kollegen wiesen GPIba auf der Oberfläche von Brustkrebszelllinien nach [74]. Suter und Kollegen zeigten Zusammenhänge zwischen Metastasierung und Expression von GPIba bei Brustkrebs auf [134] und Jain und Kollegen konnten im Tierexperiment den Hinweis einer Verbindung von GPIba und der Lungenmetastasierungsrate von Melanomzellen erbringen [75].

Die in dieser Studie verwendeten Zelllinien zeigten hingegen keinen Nachweis von GPIba. Ansätze zur Entschlüsselung der weiterhin ungeklärten Rolle von GPIba in der Tumorbilogie sind diesem Beitrag daher nicht zu entnehmen.

4.2. Einfluss von Thrombin auf das Wachstumsverhalten maligner Pankreaszellen

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Thrombin auf das Wachstumsverhalten der malignen Pankreaszelllinien PANC-1, Aspc-1 und BXPC-3 untersucht. Erstaunlicherweise zeigten alle drei Zelllinien unterschiedliche Reaktionen auf die Zugabe unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen.

Bei der Zelllinie BXPC-3 konnte keine Veränderung des Proliferationsverhaltens festgestellt werden. Dabei ist zu erwähnen, dass auch die in normalem Kulturmedium gehaltenen Zellen in der untersuchten Zeit keine ansteigende Proliferation boten. Bei den Zelllinien PANC-1 und AsPC-1 kam es bis zu 48 h nach Beigabe sowohl hoher als auch niedriger Thrombinkonzentrationen zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation. Nach weiteren 24 h bildete sich bei der Zelllinie PANC-1 scheinbar ein Plateau gleich bleibender Proliferation aus. Im Gegensatz dazu konnte bei Zellen der Zelllinie AsPC-1 nach dreitägiger Inkubation ein Wachstumsanstieg bei Zellen, behandelt mit niedriger Thrombinkonzentration (0,1 und 0,5 U/ml), verzeichnet werden. Wurden die Zellen hingegen einer hohen Thrombinkonzentration (1,0 U/ml) ausgesetzt, fiel die Proliferationsrate stark ab. Anzumerken ist auch, dass sowohl bei PANC-1 als auch bei AsPC-1 im Unterschied zu BXPC-3 die Zellzahl bei beliebiger Thrombinkonzentration nicht unter das Level der Kontrollzellen (gehalten im Kulturmedium RPMI 1640 und 0,1 % BSA) sank.

Die erzielten Ergebnisse der Zelllinie AsPC-1 bestätigen Beobachtungen anderer Arbeiten. Zain und Kollegen deckten bei Melanom-, Kolonkarzinom- und Prostatakarzinomzellen einen dosisabhängigen Effekt auf: Niedrige Thrombinkonzentrationen steigerten das Wachstum, wohingegen hohe Konzentrationen das Wachstum verringerten und sogar Apoptose hervorriefen [76]. Die Arbeit von Liu zeigte ähnliche Wirkung dosisabhängiger Thrombinkonzentration auf das Wachstum verschiedener maligner Prostatazellen [53].

Zur Überprüfung der Ergebnisse in Hinblick auf die Abhängigkeit von Thrombin wurden Kontrollexperimente mit einem thrombinspezifischen Aptamer und dem irreversiblen Thrombininhibitor D-Phe-Pro-Arg Chlormethylketon (PPACK) durchgeführt. Nukleinsäureaptamere binden an bestimmte Zielmoleküle - wie Proteine, aber auch niedermolekulare Stoffe und Viruspartikel - mit hoher Spezifität und sind somit in der Lage, Funktionen der jeweiligen Moleküle gezielt auszuschalten [135]. Boncler und Kollegen zeigten diese Wirkung bezüglich der Thrombinfunktion auf der Oberfläche von menschlichen Plättchen. Ein thrombin-spezifisches Aptamer wurde eingesetzt, das die

proteolytische Aktivität von Thrombin gegen dessen natürliche Substrate - Fibrinogen und PAR-1 - zum Erliegen brachte [136]. PPACK ist ein irreversibler Inhibitor der proteolytischen Aktivität von Thrombin, ohne dessen Bindungsaffinität zur Zelloberfläche zu beeinträchtigen [137].

Da in der vorliegenden Studie die Beigabe eines thrombin-spezifischen Aptamers oder des irreversiblen Thrombininhibitors PPACK zu einer vollständigen Aufhebung des Wachstums der Pankreaskarzinomzelllinien führte, ist davon auszugehen, dass die modulierenden Effekte von Thrombin auf das Wachstum dadurch neutralisiert wurden. Außerdem scheint für diese Wachstumsmodulation die proteolytische Aktivität von Thrombin essentiell zu sein. Diese Thrombineigenschaft induziert die Aktivierung von PAR-1. Der Nachweis von PAR-1 als Thrombinrezeptorsystem bei den untersuchten Zelllinien deutet ebenfalls darauf hin, dass die Thrombin/PAR-1-Interaktion die Proliferation der untersuchten Zelllinien beeinflusst.

Die Tatsache, dass Thrombin ein Mitogen und potenter Wachstumsfaktor ist, fand erstmals 1975 in einer Arbeit von Chen und Buchanan an embryonalen Fibroblasten des Huhns Erwähnung [138]. In der Folgezeit kam es zu der Annahme, Thrombin sei zentral in die Prozesse der Wundheilung eingebunden [139-140]. Aber auch bei verschiedenen anderen Gewebearten fungiert Thrombin als Mitogen. Es löst mittels einer Reaktivierung der Zellen der S-Phase des Zellzyklus bei menschlichen Linsenepithelien Proliferation aus [140-141]. Thrombin hat proliferative Effekte auf Astrozyten der Maus [105, 142], glatte Gefäßmuskelzellen [143] insbesondere auch glatte Muskelzellen der Aorta [144] und auf menschliche Fibroblasten der Zahnpulpa [145]. Dass Thrombin nur ein moderater Wachstumsfaktor menschlicher Endothelien ist, dessen Hauptwirkung erst durch nachgeschaltete PAR-1-Aktivierung vollzogen wird, wurde anhand neuerer Studien belegt [146].

Außerdem konnte bei Zelllinien unterschiedlicher maligner Entitäten - wie Larynxkarzinom [147], Kolonkarzinom [148], Glioblastom [149] sowie Astrozytom [150] - ein proliferativer Thrombineffekt nachgewiesen werden. Naldini und Kollegen zeigten bei Interferon- γ differenzierten, in Wachstumsarrest gehaltenen Promonozytenzellen (U937) durch Thrombin-

PAR-1-Interaktion die Hochregulation der p21 CIP1/WAF1-Expression und die Herunterregulation der Cyclin D1-Expression mit konsekutiver Wachstumsstimulation [151]. Zellzyklusaktivierung durch Thrombin wurde auch bei malignen Prostatazellen nachgewiesen. Der Zellzyklusinhibitor p27Kip1 wird einerseits durch direkten Thrombineinfluss herunter reguliert, andererseits werden MicroRNA 222 und Skp2 durch Thrombin verstärkt exprimiert, welche wiederum durch verschiedene Mechanismen die p27Kip1-Expression hemmen [152].

Fest steht, dass die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin über G-Protein gekoppelte Signalkaskaden einen komplexen intrazellulären Übertragungsweg induziert, der jedoch im Einzelnen, insbesondere im Tumorfall ungeklärt bleibt. Unbestritten ist hierbei die zentrale Bedeutung der mitogen activated protein (MAP) Kinasen-Signalkaskade, welche Zelldifferenzierungs- und Proliferationsvorgänge kontrolliert [153-154]. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie der spezifische MAP-Kinasen Inhibitor PD98059 verwendet. Dies geschah in der Absicht, die Beteiligung der MAP-Kinasen-Signalkaskade nach thrombinvermittelter PAR-1-Aktivierung bei den malignen Pankreaszelllinien PANC-1 und AsPC-1 zu beweisen. Da weder PD98059 allein noch die gleichzeitige Behandlung mit Thrombin eine Zellproliferation zur Folge hatte, ist davon auszugehen, dass die MAP-Kinasen-Signalkaskade in die proliferativen Effekte der Thrombin-PAR-1-Interaktion involviert ist.

Malignompatienten, bei denen sich der Tumor in einer aktiven Phase befindet, haben durch die enge Verlinkung von Thrombose und Malignität einen Status erhöhter Aktivität innerhalb der Gerinnungskaskade. Venöser Thromboembolismus kann ein okkultes Karzinom anzeigen, stellt eine schwerwiegende Komplikation eines bereits bekannten Karzinoms dar oder erschwert die weitere onkologische Behandlung. Die auf die Ausbildung einer tiefen Venenthrombose konsekutive Lungenembolie ist die zweithäufigste Todesursache hospitalisierter Tumorpatienten. Studien belegen, dass venöser Thromboembolismus ein signifikanter Faktor für eine Verringerung der Überlebenszeit bei vorliegender Malignität ist [155-158]. Außerdem ist die hohe Morbiditätsrate ein nicht unerheblicher ökonomischer Faktor, durch verlängerte Hospitalisierung und erhöhte Tagestherapiekosten.

Mittlerweile scheint es akzeptiert, dass Malignompatienten ein erhöhtes Risiko für eine Thromboseentstehung und Ausbildung eines thromboembolischen Ereignisses haben, sogar ohne das Vorliegen einer Beinvenenthrombose [159-160].

Zunächst muss eine adäquate Thromboseprophylaxe - besonders bei Patienten vor Majoroperationen oder mit Hochrisikofaktoren - durchgeführt werden. Dass dies lange in der Klinik keine Rolle spielte, belegt eine frühe amerikanische Studie. Hier wurde bei hospitalisierten Hochrisikopatienten nur in 32% der Fälle eine Thromboseprophylaxe durchgeführt [161]. Folgeuntersuchungen zeigen, dass selbst bei Patienten mit anamnestisch bekannter Venenthrombose nur in weniger als 50% der Fälle eine Thromboseprophylaxe durchgeführt wurde [162].

Diese Thromboseprophylaxe sollte entweder mit niedrigdosiertem, unfraktioniertem Heparin, niedermolekularem Heparin oder Fondaparinux erfolgen. Allerdings muss die Verordnung an sich, sowie die Erstellung eines individuellen Risikoprofils des Patienten [163] in die klinische Routine Einzug erfahren. Nicht abschließend geklärt ist die Frage der Dauer dieser Prophylaxe [164].

Bei nachgewiesener Thrombose soll zunächst eine therapeutische Heparinisierung mit niedrigdosiertem, unfraktioniertem Heparin, niedermolekularem Heparin oder Fondaparinux mit der Option der Umstellung auf orale Antikoagulation erfolgen. Auch hier ist die Dauer der therapeutischen Heparinisierung bei einer nachgewiesenen Thrombose weiterhin strittig [165].

Die Bestandteile der Gerinnungskaskade sind fundamental In Tumorprogression, -invasion, -neoangiogenese und -metastasierung involviert [166]. Daher ist die Überlegung, ob eine Behandlung mit niedermolekularem Heparin in diese Prozesse eingreift und die Patienten dadurch sogar einen Lebenszeitgewinn haben könnten, nahe liegend. Durch Zusammenfassung der wenigen vorliegenden randomisierten Studien bezüglich einer Antikoagulationsbehandlung bei Malignompatienten ohne bislang dokumentierte, thromboembolische Ereignisse in einer Metaanalyse deutet sich ein positiver Effekt auf die Mortalität der Patienten an. Allerdings fehlen bislang

große klinische Studien, die sich auf homogene Patientenkohorten identischen Tumortyps, sowie ähnlicher Tumorausbreitung und -behandlung fokussieren. Jedoch verspricht die Behandlung mit niedermolekularem Heparin ein verbessertes Outcome von Malignompatienten [167].

Thrombin scheint auch eine Rolle für die so genannte Tumor Dormancy zu spielen. Mit diesem Begriff wird der Ruhezustand eines Tumors beschrieben, in dem eine Tumorprogression klinisch nicht identifizierbar ist. Die wenigen Studien hierzu zeigen, dass der Status der Hyperkoagulabilität den Eintritt des Tumors in seinen Ruhezustand bei kurativ behandelten Patienten unterstützt und eine konsequente Antikoagulation die Rezidivfreiheit signifikant erhöht [152].

Auch in weiteren Kompartimenten wie malignem Pleuraerguß oder Aszites ist ein prokoagulatorischer Status nachzuweisen. Es zeigte sich ein positiver Nachweis für Thrombin, Faktor VII und Faktor X, sowie VEGF und weitere Signalmoleküle. Da die Konzentration von Antithrombin hier jedoch signifikant unter der Plasmakonzentration liegt, erscheint die alleinige Heparingabe als antineoplastische Therapie nicht sinnvoll. Eine direkte Inhibierung von Thrombin oder eine Blockade von VEGF könnten hoffnungsvolle Ansätze neuer Therapien sein [168].

4.3. RNAi von PAR-1 mit funktioneller Konsequenz für die Zytokinsekretion

Neoangiogenese ist ein essentieller Bestandteil der Tumorbiologie. Für den „Organismus im Organismus“ ist es unabdingbar, einen Anschluss an die Systemzirkulation des Wirtes zu besitzen, um die Versorgung mit Nährstoffen und die Entsorgung von Abfallprodukten zu gewährleisten. Das Bestreben nach eigenständiger Blutversorgung hat eine Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren zur Folge [80], welche besonders für das Pankreaskarzinom in verschiedenen Arbeiten beschrieben wird [169-170].

In der vorliegenden Studie wurde der Versuch unternommen, mit modernen molekularbiologischen Methoden der RNAi die Expression des Gens von PAR-1 der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 zu silencen, um somit die Oberflächenbesetzung mit PAR-1 zu verringern. Nachfolgend wurde überprüft, ob sich durch die Methoden der RNAi die Zytokinexpression der Tumorzellen an sich und als Reaktion auf Thrombinzugabe verändert.

Hierbei war zunächst die Bildung von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) als wichtigsten Vertreter der Familie der potentesten Modulatoren des Gefäßsystems [83] in Tumorzellen und insbesondere im Fall des Pankreaskarzinoms [171] zu betrachten. Dass die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin eine erhöhte VEGF-Ausschüttung zur Folge hat, wurde bereits bei unterschiedlichen Tumorzelllinien der Prostata [119] und auch bei gesunden Zellen – u.a. Retinaepithelzellen [172], Stromazellen des Endometriums [173] – gezeigt.

Aus den Ergebnissen dieser Studie ist ersichtlich, dass auch die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 nach Stimulation durch Thrombin vermehrt VEGF ausschüttet. Diese ermittelte VEGF-Expression konnte mittels Methoden der RNAi jedoch nicht gesenkt werden. Daher erscheint es naheliegend, dass die VEGF-vermittelte Tumorneoangiogenese zumindest im Falle der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 nicht durch eine von Thrombin aktivierte PAR-1-Signalkaskade stattfindet. Da eine vermehrte VEGF-Ausschüttung durch Beigabe von Thrombin in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen wurde [83, 119], ist möglicherweise zu überlegen, ob Thrombin über einen zu PAR-1 alternativen Weg zur intrazellulären Signaltransduktion verfügt. Hier sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

Ebenso ist das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) als autokriner Wachstumsfaktor für das Tumorwachstum verschiedener Zelllinien, wie u.a. Multiples Myelom [174-175], duktales Mammakarzinom [176], Cholangiokarzinom [177], großzelliges Lungenkarzinom [178] und Klarzellkarzinom der Niere [179] beschrieben. In der vorliegenden Studie konnte zwar ein Anstieg der IL-6-Sekretion insgesamt (ebenso wie ein Abfall nach Behandlung mit spezifischer siRNA) verzeichnet werden, jedoch bewegten sich sämtliche Ergebnisse im Erwartungsbereich der

Normalwerte des Plasmaspiegels. Dies lässt darauf schließen, dass IL-6 eher eine untergeordnete Rolle für das Thrombin-induzierte Wachstum der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 spielt.

Ein weiteres, in der vorliegenden Studie untersuchtes Zytokin ist Interleukin-8 (IL-8), auch genannt CXCL8 aus der Gruppe der CXC-Motiv-Chemokine, das als Entzündungsmediator für die chemotaktische Leukozytenrekrutierung zuständig ist [180]. Außerdem fungiert IL-8 als Neoangiogenesefaktor maligner Tumore [181], wie z.B. in Glioblastomzellen [182] und Prostatakarzinomzelllinien [183]. Die durch IL-8 übertragenen Signale sind weiterhin für eine gesteigerte Proliferation, ein besseres Überleben und eine höhere Metastasierungsrate maligner Zellen mitverantwortlich [184]. Aber auch bei natürlichen Endothelien ist IL-8 an der Gefäßneubildung beteiligt [88]. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch die Thrombin-induzierte-Aktivierung von PAR-3 bei embryonalen Nierenepithelien [185] als auch durch Thrombin induzierte Aktivierung von PAR-1 [89] die Sekretion von IL-8 gesteigert wird.

In dieser Studie konnte nach Behandlung der Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 mit spezifischer siRNA gerichtet gegen PAR-1 die IL-8 Plasmakonzentration signifikant gesenkt werden.

Zweifellos beteiligt sich eine große Anzahl an Wachstumsfaktoren im Regulationsnetzwerk der Tumorneoangiogenese. Die regulatorischen Mechanismen dieser Faktoren und ihre relativen Beiträge zu einem komplexen Geschehen sind noch größtenteils unbekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass Tumorwachstum grundsätzlich durch Hemmung der Tumorneoangiogenese verringert wird. In diesem Zusammenhang eröffnet Gen-silencing durch siRNA ein neues Spektrum an gezielter Therapie maligner und auch benignen Erkrankungen. Obwohl in vitro hocheffektiv die Expression verschiedener Gene verringert und dadurch die intrazellulären Signalkaskaden moduliert werden konnten, stellt die Anwendung am Menschen die üblichen hohen Hürden der Gentherapie.

Die Systemverteilungsmuster in verschiedenste Gewebe und zelluläre Kompartimente sind hinlänglich präklinisch untersucht. Zunächst gilt es, die lokale Verfügbarkeit von der systemischen zu differenzieren [186-187].

Die lokale Applikation von siRNA z. B. als Salz mit hohen lokalen Konzentrationen gelang in unterschiedlichsten Geweben. Im Epithel des Respirationstraktes von Mäusen wurde die Viruslast sowohl von Respiratorischem Synzytial-Virus (RSV) als auch von Parainfluenza-Virus (PIV) gesenkt [188-189]. Die Huntingtinexpression striataler Mäuse neurone [190] sowie die Viruslast mit Herpes simplex-Virus 2 im Mäusevaginaepithel [191] konnten ebenfalls deutlich gesenkt werden.

Neben diesen lokalen Anwendungen hat jedoch die systemische siRNA-Applikation die wichtigere Bedeutung unter Inkaufnahme weitaus größerer Probleme.

Systemische Degradierung der siRNA, ausgedrückt in kurzer Halbwertszeit ($t_{1/2}$) und eine hohe, renale Clearance, bedingen niedrige Plasmaspiegel mit folgend geringer zellulärer Aufnahme. Außerdem muss ein spezifischer Transfer in die Zielzelle erfolgen, der sich bislang als problematisch darstellt.

Die von Tuschl verwandten Liposomen erwiesen sich als äußerst zytotoxisch [192]. Weitere Arbeiten beschäftigten sich mit der Verwendung von Lipid-Polymer-Gemischen [193] und Cardiolipin [194] als Trägersubstanz, Elektroporation [195], Surjektion [196], High Pressure tail Vene Injection [197] und osmotischem Transfer [198] als technisches Verfahren zum siRNA-Transfer.

Soutschek und Kollegen zeigten am Mausmodell einen Übertragungsvorgang der siRNA mittels Cholesterolbindung, durch den die renale Clearance signifikant reduziert und die Plasmahalbwertszeit um das 16-fache gesteigert werden konnte [199].

Weitere Arbeitsgruppen beschäftigten sich v.a. mit liposomalen Nanopartikeln (LNP) als Trägersubstanz von siRNA [200-201].

Morrissey konnte am Mausmodell einen signifikanten Abfall von zirkulierender Hepatitis B-Virus-DNA aufzeigen. Unter Verwendung von LNP, bestückt mit siRNA-Anti-Hep B-Virus, konnte außerdem bei niedriger renaler Plasmaclearance eine effiziente hepatische Aufnahme bewerkstelligt werden [202]. Zimmerman zeigte am Primatenmodell eine signifikante Senkung von LDL-Cholesterin für mehrere Wochen bei Silencing von ApoB-Protein [203].

Insgesamt hat das Modell zur hepatischen Übertragung von siRNA, basierend auf der Verwendung von LNP, ein robustes Translationspotential mit potenter, vorhersagbarer und reproduzierbarer Pharmakologie bei verschiedener Ziel-mRNA und unterschiedlichen Spezies. Jedoch ist für die systemische Übertragung auf andere Organe außer der Leber noch kein validiertes Modell gefunden.

Außerdem ist das zumeist verwandte Mausmodell problematisch, da deutliche Hinweise dafür bestehen, menschliches Serum degradiere siRNA wesentlich schneller und stärker als Mäuseserum [204].

Es konnte jedoch wiederum am Mausmodell eine LNP-basierende Übertragung von siRNA in subkutane Tumore gezeigt werden [205]. Ebenfalls am Mausmodell erbrachten Antikörper-Modelle zur Übertragung in Subkutangewebe [206] und Lungentumore [207] vielversprechende Ergebnisse. Orale Verfügbarkeit konnte mit siRNA in einer Glykanhülle als Ziel gastrointestinaler Makrophagen erreicht werden [208].

Mit enormen Aufwand wird an der Entwicklung von siRNA als neues Therapieagens gearbeitet, da die Methoden der RNAi es vor allem bei Krankheiten mit pathologisch überexprimierten Genen - wie Malignomen, viralen Infektionen und metabolischen Störungen - erlauben die involvierten Gene gezielt zu inaktivieren [209-210].

Insgesamt sind zurzeit 14 RNAi-Therapieprogramme verzeichnet, von denen allerdings drei schon beendet sind und weitere folgen werden. Bei den bislang weit über 1000 Patienten und freiwilligen, gesunden Probanden kam es bislang nicht zu schweren unerwünschten Ereignissen, jedoch bieten nur wenige Programme die greifbare Option eines gezielten Knockdowns. Das am weitesten fortgeschrittene Programm heißt ALN-RSV der Firmen Alnylam, Cubist und Kyowa Kirin, befindet sich in der Studienphase IIb und kommt bei Infektionen mit RSV mit lokaler Applikation zum Einsatz. Vielversprechend ist auch das Programm PF-04523655 der Firmen Pfizer und Quark, dass in der Studienphase II zur Behandlung der altersabhängigen und diabetischen Makuladegeneration via introkularer Applikation zur Anwendung kommt. Das Programm ApoB SNALP der Firma Tekmira – Studienphase I abgeschlossen -

beschäftigt sich mit der Zivilisationskrankheit Hypercholesterinämie und zeigt von allen Programmen systemischer siRNA-Übertragung die besten Ansätze [211].

Therapien gegen das Voranschreiten eines Tumors zu entwickeln, stellt eine besondere Herausforderung für die Methoden der RNAi dar. Die Karzinogenese ist multifaktorieller, heterogener Natur. Individuen mit demselben Tumortyp weisen meist unterschiedliche genetische Läsionen auf. Diese stellen sich als aktivierende Mutationen in Onkogenen, inaktivierende Mutationen bzw. Deletionen in Tumorsuppressorgenen, verstärkte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren oder Deletionen von Apoptosemechanismen dar. Bei den wenigsten Entitäten ist der exakte Grund bekannt [212-214]. Allerdings hat sich das spezifische Gen-silencing eines bzw. einer Kombination verschiedener Onkogene als sehr erfolgreich erwiesen, das Wachstum verschiedener Krebszelllinien zu reduzieren oder den Zelltod von Krebszellen zu initiieren [215-216].

In dieser Arbeit ließ sich die Expression von PAR-1 bei malignen Pankreazelllinien nur bedingt verändern. Außerdem war die Auswirkung auf das Zytokinmuster der Zelle nur gering ausgeprägt, im Gegensatz wie zum Beispiel bei der Prostatakarzinomzelle DU135 [119].

Allerdings sollte die Wirkung des Gen-silencing gerade im Fall des Pankreaskarzinoms weiter erforscht werden, bedenkt man seine sehr schlechte Prognose für die betroffenen Patienten. Es ist zudem erstrebenswert, durch moderne molekularbiologische Methoden neue Strategien zu entwickeln, um das Pankreaskarzinom besser therapieren zu können.

Zusammenschauend muss festgehalten werden, dass sich durch die Entdeckung der PARs und deren Funktion in der intrazellulären Signalgebung verschiedener Vertreter der Gerinnungskaskade die Sicht auf die Verlinkung von Thrombose und Malignität fundamental verändert hat [128].

Daher sind die Veränderungen der Hämostaseologie und deren Erforschung und Behandlung eine neue Herangehensweise für künftige onkologische Therapiestrategien.

5. Zusammenfassung

Veränderungen der Hämostase bei maligner Grunderkrankung ist ein lange zu wenig untersuchter Aspekt bezüglich der Prozesse der Tumorprogression, -invasion und –metastasierung. Erst im Laufe der letzten Jahre fokussiert sich die Tumorforschung wieder auf die bekannten Zusammenhänge zwischen Tumorgenese und Thromboembolismus. Es zeigt sich, dass Tumore in ihrem Tumormikroenvironment hohe Konzentrationen von gerinnungsaktiven Substanzen halten, die nicht nur zu ernsthaften Komplikationen beim Patienten führen, sondern vielmehr auch von essentieller Bedeutung für das Fortschreiten des Tumors sind.

Nach Entdeckung der Rezeptorenfamilie der Protease-activated Receptors konnte eine Signaltransduktion nach intrazellulär ausgelöst durch verschiedenste Serinproteasen bewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass Tumorzellen und insbesondere Pankreaskarzinomzellen häufig eine Überexpression von verschiedenen Vertretern dieser Rezeptorenfamilie verzeichnen. Die Aktivierung von PAR-1 durch die Serinprotease Thrombin ist ein wichtiger Schritt der lokalen und systemischen Tumorprogression.

In der vorliegenden Arbeit wurde an drei verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien und einer Vergleichszelllinie zunächst das Rezeptorprofil bezüglich der unterschiedlichen Thrombinrezeptoren charakterisiert. Es zeigte sich eine Expression von PAR-1, bei fehlender Expression von PAR-3, PAR-4 und GPIIb α . Einzig Thrombomodulin wurde von zwei untersuchten Zelllinien noch exprimiert.

Im nächsten Schritt wurde das Proliferationsverhalten der unterschiedlichen Zelllinien nach Zugabe unterschiedlicher Thrombinkonzentrationen analysiert. Hier zeigte sich ein dosiabhängiger Effekt auf das Proliferationsverhalten, der sich schon bei anderen Arbeiten zuvor gezeigt hatte. Niedrige und mittlere Thrombinkonzentrationen wirkten proliferativ, wohingegen eine hohe Thrombinkonzentration scheinbar einen negativen Effekt auf Tumorwachstum hat.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Ergebnisse sowohl thrombinspezifisch sind, als auch unter Beteiligung der MAP-Kinasen-Signalkaskade ablaufen.

In Anbetracht der Tatsache, dass diese Tumorproliferation abhängig von der thrombin-vermittelten PAR-1-Aktivierung ist, wurde der Versuch unternommen mittels moderner Methoden der RNAi die Expression von PAR-1 in der Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 zu silencen. Folgend wurde überprüft, ob sich durch die Methoden der RNAi die Zytokinexpression der Tumorzellen an sich und als Reaktion auf Thrombinzugabe verändert.

Die Expression von VEGF konnte nicht gesenkt werden. Hier ist möglicherweise zu überlegen, ob Thrombin über einen zu PAR-1 alternativen Weg zur intrazellulären Signaltransduktion verfügt. Die IL-6-Sekretion konnte nicht wesentlich beeinflusst werden. Allerdings zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-8-Sekretion. Somit ließ sich in dieser Arbeit die Expression von PAR-1 bei malignen Pankreaszelllinien nur bedingt verändern. Außerdem war die Auswirkung auf das Zytokinmuster der Zelle nur gering ausgeprägt.

Es ist aber anzunehmen, dass der Tumorprogress grundsätzlich durch Hemmung der Tumorneoangiogenese und Beeinflussung der Hyperkoagulabilität verringert wird.

6. Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Klöppel, G., *Histological typing of tumours of the exocrine pancreas*. 2nd ed / G. Klöppel ... [et al] in collaboration with pathologists in 7 countries. ed. 1996, Berlin ; London: Springer. x,61p.
4. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2010*. CA Cancer J Clin, 2010. **60**(5): p. 277-300.
5. Hassan, M.M., et al., *Risk factors for pancreatic cancer: case-control study*. Am J Gastroenterol, 2007. **102**(12): p. 2696-707.
6. Villeneuve, P.J., et al., *Environmental tobacco smoke and the risk of pancreatic cancer: findings from a Canadian population-based case-control study*. Can J Public Health, 2004. **95**(1): p. 32-7.
7. Safioleas, M.C. and K.G. Moulakakis, *Pancreatic cancer today*. Hepatogastroenterology, 2004. **51**(57): p. 862-8.
8. Howes, N., et al., *Clinical and genetic characteristics of hereditary pancreatitis in Europe*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2004. **2**(3): p. 252-61.
9. Hruban, R.H., A. Maitra, and M. Goggins, *Update on pancreatic intraepithelial neoplasia*. Int J Clin Exp Pathol, 2008. **1**(4): p. 306-16.
10. Feldmann, G., et al., *Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2007. **14**(3): p. 224-32.
11. Maitra, A. and R.H. Hruban, *Pancreatic cancer*. Annu Rev Pathol, 2008. **3**: p. 157-88.
12. Bardeesy, N., et al., *Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5947-52.
13. Hingorani, S.R., et al., *Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice*. Cancer Cell, 2005. **7**(5): p. 469-83.

14. Schneider, G. and R.M. Schmid, *Genetic alterations in pancreatic carcinoma*. Mol Cancer, 2003. **2**: p. 15.
15. Yamaguchi, K., et al., *Ki-ras codon 12 point mutation and p53 mutation in pancreatic diseases*. Hepatogastroenterology, 1999. **46**(28): p. 2575-81.
16. Lygidakis, N.J., et al., *Adenocarcinoma of the pancreas--past, present and future*. Hepatogastroenterology, 2005. **52**(64): p. 1281-92.
17. Jones, S., et al., *Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses*. Science, 2008. **321**(5897): p. 1801-6.
18. Adler, G., et al., [*S3-Guidelines "Exocrine pancreatic cancer" 2007*]. Z Gastroenterol, 2007. **45**(6): p. 487-523.
19. Oettle, H., et al., *Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial*. JAMA, 2007. **297**(3): p. 267-77.
20. Moore, M.J., et al., *Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group*. J Clin Oncol, 2007. **25**(15): p. 1960-6.
21. Beger, H.G., et al., *Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts*. World J Surg, 2003. **27**(10): p. 1075-84.
22. Riall, T.S., et al., *Resected periampullary adenocarcinoma: 5-year survivors and their 6- to 10-year follow-up*. Surgery, 2006. **140**(5): p. 764-72.
23. Khorana, A.A., *Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym*. J Thromb Haemost, 2003. **1**(12): p. 2463-5.
24. Trousseau, A., *Clinique médicale de l'Hôtel-Dieu de Paris*. 2. éd., revue et augm. ed. 1865, Paris ; New York: Baillière.
25. Rickles, F.R. and M.N. Levine, *Epidemiology of thrombosis in cancer*. Acta Haematol, 2001. **106**(1-2): p. 6-12.
26. Falanga, A., et al., *Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression*. Clin Adv Hematol Oncol, 2003. **1**(11): p. 673-8.

27. Khorana, A.A. and R.L. Fine, *Pancreatic cancer and thromboembolic disease*. *Lancet Oncol*, 2004. **5**(11): p. 655-63.
28. Deppisch, L.M. and A.O. Fayemi, *Non-bacterial thrombotic endocarditis: clinicopathologic correlations*. *Am Heart J*, 1976. **92**(6): p. 723-9.
29. Colman, R.W. and R.N. Rubin, *Disseminated intravascular coagulation due to malignancy*. *Semin Oncol*, 1990. **17**(2): p. 172-86.
30. Remuzzi, G. and P. Ruggenti, *The hemolytic uremic syndrome*. *Kidney Int*, 1995. **48**(1): p. 2-19.
31. Ruggenti, P. and G. Remuzzi, *The pathophysiology and management of thrombotic thrombocytopenic purpura*. *Eur J Haematol*, 1996. **56**(4): p. 191-207.
32. Zacharski, L.R., et al., *Pathways of coagulation/fibrinolysis activation in malignancy*. *Semin Thromb Hemost*, 1992. **18**(1): p. 104-16.
33. Sere, K.M. and T.M. Hackeng, *Basic mechanisms of hemostasis*. *Semin Vasc Med*, 2003. **3**(1): p. 3-12.
34. Zhang, Y., et al., *Tissue factor controls the balance of angiogenic and antiangiogenic properties of tumor cells in mice*. *J Clin Invest*, 1994. **94**(3): p. 1320-7.
35. Haas, S.L., et al., *Expression of tissue factor in pancreatic adenocarcinoma is associated with activation of coagulation*. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(30): p. 4843-9.
36. Kakkar, A.K., et al., *Tissue factor expression correlates with histological grade in human pancreatic cancer*. *Br J Surg*, 1995. **82**(8): p. 1101-4.
37. Kasthuri, R.S., M.B. Taubman, and N. Mackman, *Role of tissue factor in cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(29): p. 4834-8.
38. Wojtukiewicz, M.Z., et al., *Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma*. *Thromb Haemost*, 2001. **86**(6): p. 1416-20.
39. Wojtukiewicz, M.Z., et al., *Expression of prothrombin fragment 1+2 in cancer tissue as an indicator of local activation of blood coagulation*. *Thromb Res*, 2000. **97**(5): p. 335-42.

40. Sahni, A., et al., *Fibrinogen and fibrin protect fibroblast growth factor-2 from proteolytic degradation*. *Thromb Haemost*, 2000. **83**(5): p. 736-41.
41. Sahni, A., L.A. Sporn, and C.W. Francis, *Potential of endothelial cell proliferation by fibrin(ogen)-bound fibroblast growth factor-2*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(21): p. 14936-41.
42. Mahadevan, D. and D.D. Von Hoff, *Tumor-stroma interactions in pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Mol Cancer Ther*, 2007. **6**(4): p. 1186-97.
43. Stuelten, C.H., et al., *Transient tumor-fibroblast interactions increase tumor cell malignancy by a TGF-Beta mediated mechanism in a mouse xenograft model of breast cancer*. *PLoS One*, 2010. **5**(3): p. e9832.
44. Zlobec, I. and A. Lugli, *Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors*. *World J Gastroenterol*, 2009. **15**(47): p. 5898-906.
45. Franci, C., et al., *Expression of Snail protein in tumor-stroma interface*. *Oncogene*, 2006. **25**(37): p. 5134-44.
46. Bukovsky, A., et al., *The role of the host-tumor interface and cell hybridization in invasive cancer*. *Med Hypotheses*, 2001. **57**(6): p. 729-35.
47. Rowe, R.G. and S.J. Weiss, *Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2009. **25**: p. 567-95.
48. De Cicco, M., *The prothrombotic state in cancer: pathogenic mechanisms*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004. **50**(3): p. 187-96.
49. Vu, T.K., et al., *Domains specifying thrombin-receptor interaction*. *Nature*, 1991. **353**(6345): p. 674-7.
50. Ossovskaya, V.S. and N.W. Bunnnett, *Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease*. *Physiol Rev*, 2004. **84**(2): p. 579-621.
51. Elste, A.P. and I. Petersen, *Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer*. *J Mol Histol*, 2010. **41**(2-3): p. 89-99.
52. Even-Ram, S., et al., *Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes*. *Nat Med*, 1998. **4**(8): p. 909-14.

53. Liu, J., et al., *Expression of functional protease-activated receptor 1 in human prostate cancer cell lines*. Urol Res, 2003. **31**(3): p. 163-8.
54. Liu, Y., et al., *Expression of protease-activated receptor 1 in oral squamous cell carcinoma*. Cancer Lett, 2001. **169**(2): p. 173-80.
55. Kaufmann, R., et al., *The two-receptor system PAR-1/PAR-4 mediates alpha-thrombin-induced [Ca(2+)](i) mobilization in human astrocytoma cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 2000. **126**(2): p. 91-4.
56. Okamoto, T., et al., *The effects of stimulating protease-activated receptor-1 and -2 in A172 human glioblastoma*. J Neural Transm, 2001. **108**(2): p. 125-40.
57. Rudroff, C., et al., *Characterization of functional thrombin receptors in human pancreatic tumor cells (MIA PACA-2)*. Pancreas, 1998. **16**(2): p. 189-94.
58. Rudroff, C., et al., *Expression of the thrombin receptor PAR-1 correlates with tumour cell differentiation of pancreatic adenocarcinoma in vitro*. Clin Exp Metastasis, 2002. **19**(2): p. 181-9.
59. Jin, E., et al., *Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas*. Cancer, 2003. **97**(3): p. 703-13.
60. D'Andrea, M.R., et al., *Differential expression of protease-activated receptors-1 and -2 in stromal fibroblasts of normal, benign, and malignant human tissues*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 2031-41.
61. Huang, Y.Q., J.J. Li, and S. Karpatkin, *Thrombin inhibits tumor cell growth in association with up-regulation of p21(waf/cip1) and caspases via a p53-independent, STAT-1-dependent pathway*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6462-8.
62. Kamath, L., et al., *Signaling from protease-activated receptor-1 inhibits migration and invasion of breast cancer cells*. Cancer Res, 2001. **61**(15): p. 5933-40.
63. Esmon, C.T., *The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation*. J Biol Chem, 1989. **264**(9): p. 4743-6.
64. Esmon, C.T., *Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 946-55.

65. Bajzar, L., J. Morser, and M. Nesheim, *TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex*. J Biol Chem, 1996. **271**(28): p. 16603-8.
66. Dorffler-Melly, J., et al., *Functional thrombomodulin deficiency causes enhanced thrombus growth in a murine model of carotid artery thrombosis*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(6): p. 347-52.
67. Bhattacharya, A. and M.L. Cohen, *Vascular contraction and relaxation to thrombin and trypsin: thrombomodulin preferentially attenuates thrombin-induced contraction*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 284-90.
68. Appleton, M.A., R.L. Attanoos, and B. Jasani, *Thrombomodulin as a marker of vascular and lymphatic tumours*. Histopathology, 1996. **29**(2): p. 153-7.
69. Hanly, A.M., et al., *Thrombomodulin: tumour biology and prognostic implications*. Eur J Surg Oncol, 2005. **31**(3): p. 217-20.
70. Hanly, A.M., et al., *Thrombomodulin expression in colorectal carcinoma is protective and correlates with survival*. Br J Cancer, 2006. **94**(9): p. 1320-5.
71. Clemetson, K.J., *A short history of platelet glycoprotein Ib complex*. Thromb Haemost, 2007. **98**(1): p. 63-8.
72. Du, X., *Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex*. Curr Opin Hematol, 2007. **14**(3): p. 262-9.
73. Adam, F., et al., *Thrombin interaction with platelet membrane glycoprotein Ib alpha*. Trends Mol Med, 2003. **9**(11): p. 461-4.
74. Oleksowicz, L., et al., *Characterization of tumor-induced platelet aggregation: the role of immunorelated GPIb and GPIIb/IIIa expression by MCF-7 breast cancer cells*. Thromb Res, 1995. **79**(3): p. 261-74.
75. Jain, S., et al., *Platelet glycoprotein Ib alpha supports experimental lung metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(21): p. 9024-8.
76. Zain, J., et al., *Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3133-8.

77. Schiller, H., et al., *Thrombin as a survival factor for cancer cells: thrombin activation in malignant effusions in vivo and inhibition of idarubicin-induced cell death in vitro*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2002. **40**(8): p. 329-35.
78. Nierodzik, M.L. and S. Karpatkin, *Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 355-62.
79. Yoshida, E., et al., *Enhancement of the expression of urokinase-type plasminogen activator from PC-3 human prostate cancer cells by thrombin*. Cancer Res, 1994. **54**(12): p. 3300-4.
80. Folkman, J., *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis*. Semin Oncol, 2002. **29**(6 Suppl 16): p. 15-8.
81. Folkman, J., *Fundamental concepts of the angiogenic process*. Curr Mol Med, 2003. **3**(7): p. 643-51.
82. Folkman, J., T. Browder, and J. Palmblad, *Angiogenesis research: guidelines for translation to clinical application*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 23-33.
83. Huang, Y.Q., et al., *Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes*. Thromb Haemost, 2001. **86**(4): p. 1094-8.
84. Yla-Herttuala, S., et al., *Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine*. J Am Coll Cardiol, 2007. **49**(10): p. 1015-26.
85. Huang, Y.Q., et al., *Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells*. Blood, 2002. **99**(5): p. 1646-50.
86. Li, J.J., et al., *Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets*. Thromb Haemost, 2001. **85**(2): p. 204-6.
87. Mohle, R., et al., *Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(2): p. 663-8.
88. Li, A., et al., *IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3369-76.

89. Asokanathan, N., et al., *Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells.* J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3577-85.
90. Agrawal, N., et al., *RNA interference: biology, mechanism, and applications.* Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(4): p. 657-85.
91. Napoli, C., C. Lemieux, and R. Jorgensen, *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans.* Plant Cell, 1990. **2**(4): p. 279-289.
92. Febres, V.J., R.F. Lee, and G.A. Moore, *Transgenic resistance to Citrus tristeza virus in grapefruit.* Plant Cell Rep, 2008. **27**(1): p. 93-104.
93. Sijen, T., et al., *RNA-Mediated Virus Resistance: Role of Repeated Transgenes and Delineation of Targeted Regions.* Plant Cell, 1996. **8**(12): p. 2277-2294.
94. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.* Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
95. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
96. Hamilton, A.J. and D.C. Baulcombe, *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants.* Science, 1999. **286**(5441): p. 950-2.
97. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.* Nature, 2004. **431**(7006): p. 343-9.
98. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.* Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
99. Liu, J., et al., *Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.* Science, 2004. **305**(5689): p. 1437-41.
100. Elbashir, S.M., et al., *Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs.* Methods, 2002. **26**(2): p. 199-213.
101. Hannon, G.J., *RNA interference.* Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-51.

102. Tuschl, T., *RNA interference and small interfering RNAs*. *Chembiochem*, 2001. **2**(4): p. 239-45.
103. Caplen, N.J., et al., *Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(17): p. 9742-7.
104. Gil, J. and M. Esteban, *Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action*. *Apoptosis*, 2000. **5**(2): p. 107-14.
105. Wang, Q. and G.G. Carmichael, *Effects of length and location on the cellular response to double-stranded RNA*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004. **68**(3): p. 432-52.
106. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. *Nature*, 2001. **411**(6836): p. 494-8.
107. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. *Genes Dev*, 2001. **15**(2): p. 188-200.
108. Yu, J.Y., S.L. DeRuijter, and D.L. Turner, *RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(9): p. 6047-52.
109. Lieber, M., et al., *Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas*. *Int J Cancer*, 1975. **15**(5): p. 741-7.
110. Chen, W.H., et al., *Human pancreatic adenocarcinoma: in vitro and in vivo morphology of a new tumor line established from ascites*. *In Vitro*, 1982. **18**(1): p. 24-34.
111. Loor, R., et al., *Use of pancreas-specific antigen in immunodiagnosis of pancreatic cancer*. *Clin Lab Med*, 1982. **2**(3): p. 567-78.
112. Aden, D.P., et al., *Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line*. *Nature*, 1979. **282**(5739): p. 615-6.
113. Wojtukiewicz, M.Z., et al., *Solid tumor cells express functional "tethered ligand" thrombin receptor*. *Cancer Res*, 1995. **55**(3): p. 698-704.

114. Shimizu, S., et al., *Thrombin stimulates the expression of PDGF in lung epithelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000. **279**(3): p. L503-10.
115. Faioni, E.M., et al., *The G1456 to T mutation in the thrombomodulin gene is not frequent in patients with venous thrombosis*. Blood, 1997. **89**(4): p. 1467.
116. Yasunaga, M., et al., *Detection of platelet-specific protein mRNAs in different megakaryoblasts using the reverse transcriptase polymerase chain reaction*. Leuk Lymphoma, 1992. **7**(5-6): p. 505-10.
117. Liu, J., P. Schuff-Werner, and M. Steiner, *Double transfection improves small interfering RNA-induced thrombin receptor (PAR-1) gene silencing in DU 145 prostate cancer cells*. FEBS Lett, 2004. **577**(1-2): p. 175-80.
118. Nguyen, K.T., et al., *Shear stress reduces protease activated receptor-1 expression in human endothelial cells*. Ann Biomed Eng, 2001. **29**(2): p. 145-52.
119. Liu, J., P. Schuff-Werner, and M. Steiner, *Thrombin/thrombin receptor (PAR-1)-mediated induction of IL-8 and VEGF expression in prostate cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(1): p. 183-9.
120. Deshet, N., et al., *Plasminogen-induced aggregation of PANC-1 cells requires conversion to plasmin and is inhibited by endogenous plasminogen activator inhibitor-1*. J Cell Physiol, 2008. **216**(3): p. 632-9.
121. Wei, C., et al., *Trypsin and thrombin accelerate aggregation of human endocrine pancreas precursor cells*. J Cell Physiol, 2006. **206**(2): p. 322-8.
122. Nowak, G., M. Lopez, and M. Zieger, *[Thrombin induced tumour growth - pharmacological control]*. Hamostaseologie, 2007. **27**(2): p. 105-10.
123. Bohm, S.K., et al., *Molecular cloning, expression and potential functions of the human proteinase-activated receptor-2*. Biochem J, 1996. **314** (Pt 3): p. 1009-16.
124. Kawabata, A., et al., *Protease-activated receptor-2 (PAR-2) in the pancreas and parotid gland: Immunolocalization and involvement of nitric oxide in the evoked amylase secretion*. Life Sci, 2002. **71**(20): p. 2435-46.

125. Kawabata, A., M. Matsunami, and F. Sekiguchi, *Gastrointestinal roles for proteinase-activated receptors in health and disease*. Br J Pharmacol, 2008. **153 Suppl 1**: p. S230-40.
126. Kawabata, A., et al., *Suppression of pancreatitis-related allodynia/hyperalgesia by proteinase-activated receptor-2 in mice*. Br J Pharmacol, 2006. **148**(1): p. 54-60.
127. Kawabata, A., et al., *Proteinase-activated receptor-2 (PAR-2): regulation of salivary and pancreatic exocrine secretion in vivo in rats and mice*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(8): p. 1808-14.
128. Borensztajn, K.S. and C.A. Spek, *Protease-activated receptors, apoptosis and tumor growth*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2008. **36**(3-4): p. 137-47.
129. Oikawa, T., et al., *Production of endothelin-1 and thrombomodulin by human pancreatic cancer cells*. Br J Cancer, 1994. **69**(6): p. 1059-64.
130. Boffa, M.C., et al., *Plasma thrombomodulin level in malignancy varies according to the tumor type*. Nouv Rev Fr Hematol, 1994. **36 Suppl 1**: p. S87-8.
131. Ogawa, H., et al., *Expression of thrombomodulin in squamous cell carcinoma of the lung: its relationship to lymph node metastasis and prognosis of the patients*. Cancer Lett, 2000. **149**(1-2): p. 95-103.
132. Takebayashi, Y., et al., *The expression of thymidine phosphorylase and thrombomodulin in human colorectal carcinomas*. Cancer Lett, 1995. **92**(1): p. 1-7.
133. Tamura, A., et al., *Prognostic significance of thrombomodulin expression and vascular invasion in stage I squamous cell carcinoma of the lung*. Lung Cancer, 2001. **34**(3): p. 375-82.
134. Suter, C.M., et al., *Identification and characterisation of a platelet GPIIb/IIIa-like complex on human breast cancers: implications for the metastatic process*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(10): p. 1082-92.
135. Ellington, A.D. and J.W. Szostak, *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*. Nature, 1990. **346**(6287): p. 818-22.
136. Boncler, M.A., M. Koziolkiewicz, and C. Watala, *Aptamer inhibits degradation of platelet proteolytically activatable receptor, PAR-1, by thrombin*. Thromb Res, 2001. **104**(3): p. 215-22.

137. Harmon, J.T. and G.A. Jamieson, *Activation of platelets by alpha-thrombin is a receptor-mediated event. D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone-thrombin, but not N alpha-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone-thrombin, binds to the high affinity thrombin receptor.* J Biol Chem, 1986. **261**(34): p. 15928-33.
138. Chen, L.B. and J.M. Buchanan, *Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(1): p. 131-5.
139. Perdue, J.F., et al., *Protease mitogenic response of chick embryo fibroblasts and receptor binding/processing of human alpha-thrombin.* J Biol Chem, 1981. **256**(6): p. 2767-76.
140. Reddan, J.R., D.C. Dziedzic, and S.J. McGee, *Thrombin induces cell division in rabbit lenses cultured in a completely defined serum-free medium.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1982. **22**(4): p. 486-93.
141. Simon, A. and J.P. Brockes, *Thrombin activation of S-phase reentry by cultured pigmented epithelial cells of adult newt iris.* Exp Cell Res, 2002. **281**(1): p. 101-6.
142. Citro, S., et al., *Phospholipase Cepsilon is a nexus for Rho and Rap-mediated G protein-coupled receptor-induced astrocyte proliferation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15543-8.
143. Rauch, B.H., et al., *Thrombin- and factor Xa-induced DNA synthesis is mediated by transactivation of fibroblast growth factor receptor-1 in human vascular smooth muscle cells.* Circ Res, 2004. **94**(3): p. 340-5.
144. Madamanchi, N.R., et al., *Differential activation of mitogenic signaling pathways in aortic smooth muscle cells deficient in superoxide dismutase isoforms.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(5): p. 950-6.
145. Gruber, R., et al., *Proliferation of dental pulp fibroblasts in response to thrombin involves mitogen-activated protein kinase signalling.* Int Endod J, 2004. **37**(2): p. 145-50.
146. Zania, P., et al., *Thrombin mediates mitogenesis and survival of human endothelial cells through distinct mechanisms.* Am J Physiol Cell Physiol, 2008. **294**(5): p. C1215-26.
147. Kaufmann, R., et al., *Thrombin receptor activation results in calcium signaling and protein kinase C-dependent stimulation of DNA synthesis in HEP-2g laryngeal carcinoma cells.* Cancer, 1997. **80**(11): p. 2068-74.

148. Darmoul, D., et al., *Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells*. *Am J Pathol*, 2003. **162**(5): p. 1503-13.
149. Hayakawa, Y., et al., *Thrombin-induced cell proliferation and platelet-derived growth factor-AB release from A172 human glioblastoma cells*. *J Thromb Haemost*, 2007. **5**(11): p. 2219-26.
150. LaMorte, V.J., et al., *A requirement for Ras protein function in thrombin-stimulated mitogenesis in astrocytoma cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(26): p. 19411-5.
151. Naldini, A., et al., *Human alpha-thrombin stimulates proliferation of interferon-gamma differentiated, growth-arrested U937 cells, overcoming differentiation-related changes in expression of p21CIP1/WAF1 and cyclin D1*. *J Cell Physiol*, 2002. **191**(3): p. 290-7.
152. Green, D. and S. Karpatkin, *Role of thrombin as a tumor growth factor*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(4): p. 656-61.
153. Martorell, L., et al., *Vascular effects of thrombin: involvement of NOR-1 in thrombin-induced mitogenic stimulus in vascular cells*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2909-15.
154. Schramek, H., *MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease*. *News Physiol Sci*, 2002. **17**: p. 62-7.
155. Chew, H.K., et al., *The incidence of venous thromboembolism among patients with primary lung cancer*. *J Thromb Haemost*, 2008. **6**(4): p. 601-8.
156. Chew, H.K., et al., *Incidence of venous thromboembolism and the impact on survival in breast cancer patients*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(1): p. 70-6.
157. Ku, G.H., et al., *Venous thromboembolism in patients with acute leukemia: incidence, risk factors, and effect on survival*. *Blood*, 2009. **113**(17): p. 3911-7.
158. Sandhu, R., et al., *The incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with primary bladder cancer*. *Cancer*, 2010. **116**(11): p. 2596-603.
159. Francis, C.W., *Prevention of venous thromboembolism in hospitalized patients with cancer*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(29): p. 4874-80.

160. Lyman, G.H. and A.A. Khorana, *Cancer, clots and consensus: new understanding of an old problem*. J Clin Oncol, 2009. **27**(29): p. 4821-6.
161. Anderson, F.A., Jr., et al., *A population-based perspective of the hospital incidence and case-fatality rates of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. The Worcester DVT Study*. Arch Intern Med, 1991. **151**(5): p. 933-8.
162. Spencer, F.A., et al., *The Worcester Venous Thromboembolism study: a population-based study of the clinical epidemiology of venous thromboembolism*. J Gen Intern Med, 2006. **21**(7): p. 722-7.
163. Khorana, A.A. and G.C. Connolly, *Assessing risk of venous thromboembolism in the patient with cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(29): p. 4839-47.
164. Kakkar, A.K., *Prevention of venous thromboembolism in the cancer surgical patient*. J Clin Oncol, 2009. **27**(29): p. 4881-4.
165. Streiff, M.B., *Diagnosis and initial treatment of venous thromboembolism in patients with cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(29): p. 4889-94.
166. Xie, W.Z., et al., *Activation of the coagulation system in cancerogenesis and metastasation*. Biomed Pharmacother, 2005. **59**(3): p. 70-5.
167. Kuderer, N.M., T.L. Ortel, and C.W. Francis, *Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival*. J Clin Oncol, 2009. **27**(29): p. 4902-11.
168. Gieseler, F., et al., *Activated coagulation factors in human malignant effusions and their contribution to cancer cell metastasis and therapy*. Thromb Haemost, 2007. **97**(6): p. 1023-30.
169. Summy, J.M., et al., *AP23846, a novel and highly potent Src family kinase inhibitor, reduces vascular endothelial growth factor and interleukin-8 expression in human solid tumor cell lines and abrogates downstream angiogenic processes*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(12): p. 1900-11.
170. Takahashi, Y., et al., *Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(1): p. 187-96.

171. Aii, S., et al., *Implication of vascular endothelial growth factor in the development and metastasis of human cancers*. Hum Cell, 1999. **12**(1): p. 25-30.
172. Bian, Z.M., S.G. Elner, and V.M. Elner, *Thrombin-induced VEGF expression in human retinal pigment epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(6): p. 2738-46.
173. Furukawa, Y., et al., *The production of vascular endothelial growth factor and metalloproteinase via protease-activated receptor in human endometrial stromal cells*. Fertil Steril, 2009. **91**(2): p. 535-41.
174. Gerlo, S., G. Haegeman, and W. Vanden Berghe, *Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells*. Cell Signal, 2008. **20**(8): p. 1489-96.
175. Zdzisinska, B., et al., *Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008. **56**(3): p. 207-21.
176. Sansone, P., et al., *IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland*. J Clin Invest, 2007. **117**(12): p. 3988-4002.
177. Wehbe, H., et al., *Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10517-24.
178. Fu, J., et al., *Effect of interleukin-6 on the growth of human lung cancer cell line*. Chin Med J (Engl), 1998. **111**(3): p. 265-8.
179. Tachibana, M., et al., *Autocrine growth promotion by multiple hematopoietic growth factors in the established renal cell carcinoma line KU-19-20*. Cell Tissue Res, 2000. **301**(3): p. 353-67.
180. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser, *Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines*. Adv Immunol, 1994. **55**: p. 97-179.
181. Xie, K., *Interleukin-8 and human cancer biology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. **12**(4): p. 375-91.
182. Brat, D.J., A.C. Bellail, and E.G. Van Meir, *The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 122-33.

183. Hrouda, D., D.L. Nicol, and R.A. Gardiner, *The role of angiogenesis in prostate development and the pathogenesis of prostate cancer*. Urol Res, 2003. **30**(6): p. 347-55.
184. Waugh, D.J. and C. Wilson, *The interleukin-8 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(21): p. 6735-41.
185. Ostrowska, E. and G. Reiser, *The protease-activated receptor-3 (PAR-3) can signal autonomously to induce interleukin-8 release*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(6): p. 970-81.
186. Novobrantseva, T.I., et al., *Delivering silence: advancements in developing siRNA therapeutics*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2008. **11**(2): p. 217-24.
187. Whitehead, K.A., R. Langer, and D.G. Anderson, *Knocking down barriers: advances in siRNA delivery*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(2): p. 129-38.
188. Alvarez, R., et al., *RNA interference-mediated silencing of the respiratory syncytial virus nucleocapsid defines a potent antiviral strategy*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. **53**(9): p. 3952-62.
189. Bitko, V., et al., *Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA*. Nat Med, 2005. **11**(1): p. 50-5.
190. DiFiglia, M., et al., *Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17204-9.
191. Palliser, D., et al., *An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection*. Nature, 2006. **439**(7072): p. 89-94.
192. Tuschl, T. and A. Borkhardt, *Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy*. Mol Interv, 2002. **2**(3): p. 158-67.
193. Brazas, R.M. and J.E. Hagstrom, *Delivery of small interfering RNA to mammalian cells in culture by using cationic lipid/polymer-based transfection reagents*. Methods Enzymol, 2005. **392**: p. 112-24.
194. Zhang, Z.Y., et al., *A novel cationic cardiolipin analogue for gene delivery*. Pharmazie, 2006. **61**(1): p. 10-4.

195. Javorovic, M., et al., *RNA transfer by electroporation into mature dendritic cells leading to reactivation of effector-memory cytotoxic T lymphocytes: a quantitative analysis*. Mol Ther, 2005. **12**(4): p. 734-43.
196. Chang, F.H., et al., *Surfection: a new platform for transfected cell arrays*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(3): p. e33.
197. Lewis, D.L., et al., *Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice*. Nat Genet, 2002. **32**(1): p. 107-8.
198. Aoki, M., et al., *RNA interference in immune cells by use of osmotic delivery of siRNA*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **341**(2): p. 326-33.
199. Soutschek, J., et al., *Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 173-8.
200. Abrams, M.T., et al., *Evaluation of efficacy, biodistribution, and inflammation for a potent siRNA nanoparticle: effect of dexamethasone co-treatment*. Mol Ther, 2010. **18**(1): p. 171-80.
201. Akinc, A., et al., *Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms*. Mol Ther, 2010. **18**(7): p. 1357-64.
202. Morrissey, D.V., et al., *Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(8): p. 1002-7.
203. Zimmermann, T.S., et al., *RNAi-mediated gene silencing in non-human primates*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 111-4.
204. Haupenthal, J., et al., *Inhibition of RNase A family enzymes prevents degradation and loss of silencing activity of siRNAs in serum*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(5): p. 702-10.
205. Judge, A.D., et al., *Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(3): p. 661-73.
206. Song, E., et al., *Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(6): p. 709-17.

207. Peer, D., et al., *Selective gene silencing in activated leukocytes by targeting siRNAs to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4095-100.
208. Aouadi, M., et al., *Orally delivered siRNA targeting macrophage Map4k4 suppresses systemic inflammation*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1180-4.
209. Aigner, A., *Applications of RNA interference: current state and prospects for siRNA-based strategies in vivo*. Appl Microbiol Biotechnol, 2007. **76**(1): p. 9-21.
210. Kim, D.H. and J.J. Rossi, *Strategies for silencing human disease using RNA interference*. Nat Rev Genet, 2007. **8**(3): p. 173-84.
211. Vaishnav, A.K., et al., *A status report on RNAi therapeutics*. Silence, 2010. **1**(1): p. 14.
212. Gartel, A.L. and E.S. Kandel, *RNA interference in cancer*. Biomol Eng, 2006. **23**(1): p. 17-34.
213. Izquierdo, M., *Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy*. Cancer Gene Ther, 2005. **12**(3): p. 217-27.
214. Putral, L.N., W. Gu, and N.A. McMillan, *RNA interference for the treatment of cancer*. Drug News Perspect, 2006. **19**(6): p. 317-24.
215. Pai, S.I., et al., *Prospects of RNA interference therapy for cancer*. Gene Ther, 2006. **13**(6): p. 464-77.
216. Sanguino, A., G. Lopez-Berestein, and A.K. Sood, *Strategies for in vivo siRNA delivery in cancer*. Mini Rev Med Chem, 2008. **8**(3): p. 248-55.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
AK	Antikörper
BSA	bovine serum albumine
cm	Zentimeter
cDNA	complementary desoxyribonucleinacid
CP	cancer procoagulant
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DM	Diabetes mellitus
dsRNA	doppelsträngige RNA
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
GPIb α	Glykoprotein I b α
GPCR	G-protein-couplet-receptor
GPI	glykosylphosphatidylinositol
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
LNP	Liposomale Nanopartikel
mg	Milligram
min	Minute
ml	Milliliter
miRNA	mikro RNA
mRNA	messenger RNA
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	messenger ribonucleinacid
MTP	Mikrotiterplatte
ng	Nanogram

nm	Nanometer
PA	Plasminogenaktivator
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasie
PAR-1	protease-activated receptor 1
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	platelet derived growth factor
pre-miRNA	Vorläufermolekül der miRNA
PTGS	posttranscriptional gene silencing
µl	Mikroliter
rpm	rotation per minute
RISC	RNA induced silencing complex
RNAi	RNA Interferenz
RSV	Respiratorische Synzytial-Virus
RPMI	Roswell Park Memorial Institut (Puffersystem für die Zellkultur)
sec	Sekunde
siRNA	short interfering RNA
TF	Tissue Factor
TGF-β	transforming growth factor-beta
TM	Thrombomodulin
TNF- α	tumor necrosis factor-α
TRAP	Thrombin Receptor Activation Peptide
tPA	tissue-typ Plasminogenaktivator
U	Unit
UV	Ultraviolettstrahlung
VEGF	vascular endothelial growth factor

Thesen

- (1) Das Pankreaskarzinom ist eine Entität hoher maligner Potenz, ausgedrückt in raschem organüberschreitendem Wachstum und rascher Metastasierung. Aufgrund fehlender Frühsymptome wird das Pankreaskarzinom häufig erst in höheren Stadien diagnostiziert und ist dann aufgrund Resistenz des Tumors gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie schwer therapierbar.
- (2) Statistisch gesehen, ist das Pankreaskarzinom das Malignom mit der höchsten Letalität aller soliden Malignome des Gastrointestinaltraktes und hat in der Palliativsituation eine 2-Jahresüberlebensrate von 0%.
- (3) Malignome, insbesondere das Pankreaskarzinom, weisen starke Veränderungen der Hämostase auf, die sie bei einem vorherrschenden Status der Pro- bzw. Hyperkoagulabilität für Prozesse der Angiogenese, Tumorinvasion und Metastasierung nutzen und zu thromboembolischen Komplikationen führen.
- (4) Tumore, aus dem zentralen Tumorparenchym und dem umgebenden Tumorstroma zusammengesetzt, verändern ihre Umgebung zu ihrem eigenen Nutzen und attackieren an der invasiven Front den Organismus unter Zuhilfenahme proteolytischer Prozesse.
- (5) Protease-activated Receptors (PAR) sind eine von Proteasen - insbesondere Thrombin, aber auch Trypsin u.a. - aktivierte Rezeptorfamilie, die bei Malignomen wichtige Funktionen der Neoangiogenese, Metastasierung und Apoptoseresistenz steuern.
- (6) RNA-Interferenz ist ein natürlicher Genregulationsmechanismus zur Limitierung der Genexpression eukaryoter Zellen mittels posttranskriptionaler mRNA-Degradation. Mittels moderner

molekularbiologischer Methoden etabliert sich ein neuer Therapieansatz auf molekularer Ebene.

- (7) Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit war, das Expressionsprofil maligner Pankreazellen für die PAR-Proteinfamilie und weitere Thrombinbindungsmoleküle zu untersuchen. Tumorbiologisch relevante Phänomene wie Proliferation und Sekretion proangiogenetischer Zytokine wurden unter Thrombineinfluß untersucht und die Reversibilität unter Bedingungen des PAR-1-Silencing geprüft.
- (8) Auf den Oberflächen der untersuchten Tumorzelllinien duktaler Adenokarzinome des Pankreas lässt sich vor allem PAR-1 als Hauptvertreter der Protease-activated Receptors prätranslational mittels Nachweis zytosolischer mRNA, wie auch posttranslational durchflusszytometrisch nachweisen.
- (9) Unter Zugabe von Thrombin zeigen zumindest die Pankreaskarzinomzelllinien PANC-1 und Aspc-1 einen signifikanten Anstieg ihrer Proliferationsrate.
- (10) Weitergehende Untersuchungen zeigen, dass für die Thrombinwirkung dessen Aktivität essentiell ist. Außerdem zeigt sich eine Involvierung der MAP-Kinasen-Signalkaskade in die proliferativen Effekte der Thrombin-PAR1-Interaktion.
- (11) Durch die Methoden der RNAi konnte bei den untersuchten Pankreaskarzinomzelllinien sowohl die PAR-1-Expression, wie auch konsekutiv die extraplasmatische Zytokinsekretion nur in begrenztem Umfang signifikant verändert werden.
- (12) Bahnbrechende pharmakologische Erfolge in der Behandlung solider Organtumore sind in den letzten Jahren nur bedingt zu verzeichnen.

Somit bieten die Methoden der RNAi zukünftig neue Behandlungsoptionen, wobei die Identifizierung neuer Targets eine Aufgabe der experimentellen und klinischen Onkohämostaseologie bleibt.

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Professor Dr. med. P. Schuff-Werner als Direktor des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock für die Bereitstellung des Labors meine Dankbarkeit ausdrücken.

Herrn PD Dr. med. M. Steiner danke ich in seiner Funktion als Doktorvater und Mentor. Ohne seine Initiative und seine stets kritischen und konstruktiven Anregungen wäre die Arbeit in dieser Form nicht zustande gekommen.

Weiterhin gilt mein Dank Heide Hamp, Astrid Röhring und Katrin Dreissiger. Dieses tolle Laborteam erleichterte mir durch allzeit konstruktive Vorschläge und praktische Hilfe meine experimentelle Arbeit.

Hervorheben möchte ich meinen Dank an Heide, die leider noch vor Fertigstellung dieser Arbeit den Kampf gegen Ihre Erkrankung verlor.

Und zu guter Letzt möchte ich meiner Frau danken, die mir immer den Rücken frei gehalten, mich stets aus Tälern geführt und durch Ihre äußerst kritische, genaue und fachfremd-objektive Korrektur zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.