

AUS DER KLINIK FÜR HÄMATOLOGIE, ONKOLOGIE UND PALLIATIVMEDIZIN;
MEDIZINISCHE KLINIK III, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. C. JUNGHANß

TISSUE FACTOR ABUNDANZ UND PROKOAGULANTER PHÄNOTYP KOLOREKTALER KARZINOMZELLEN NACH ZYTOSTATISCHER UND ZIELGERICHTETER THERAPIE

INAUGURALDISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES DOKTOR DER MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

GUTACHTER

PD DR. RER. NAT. HABIL. CLAUDIA MALETZKI, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

PD DR. RER. NAT. SONJA OEHMCKE-HECHT, UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

PROF. DR. MED. FLORIAN LANGER, UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

VORGELEGT VON

ANNIKA FRIZZI KAYSER | GEB. AM 17.07.1998 IN SCHWEDT/ODER

AUS ROSTOCK

EINREICHUNG | 17.10.2023

VERTEIDIGUNG | 28.05.2024

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00005075

| | |
|---|------------|
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS..... | IV |
| TABELLENVERZEICHNIS | VI |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | VII |
| I. EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Anmerkungen | 1 |
| 1.2 Tissue Factor und Gerinnung | 1 |
| 1.2.1 Struktur und Isoformen | 3 |
| 1.2.2 Die Rolle von Tissue Factor bei Krebserkrankungen..... | 4 |
| 1.3 Kolorektales Karzinom | 7 |
| 1.3.1 Epidemiologie und Ätiologie..... | 7 |
| 1.3.2 Systemische Therapien | 9 |
| 1.3.3 Präklinische Ansätze | 10 |
| 1.4 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zur Tissue Factor Expression beim kolorektalen Karzinom..... | 13 |
| II. ZIELSETZUNG | 16 |
| III. MATERIAL UND METHODEN | 17 |
| 3.1 Material..... | 17 |
| 3.1.1 Zelllinien | 17 |
| 3.1.2 Laborgeräte | 17 |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterialien | 18 |
| 3.1.4 Chemikalien | 20 |
| 3.1.5 Therapeutika..... | 21 |
| 3.1.6 Antikörper..... | 21 |
| 3.1.7 Zusammensetzung von Medien/Lösungen..... | 22 |
| 3.1.8 Software | 23 |
| 3.2 Methoden..... | 23 |
| 3.2.1 Zellkultur..... | 23 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.1.1 | Zellkultivierung | 23 |
| 3.2.1.2 | Ernten/Passagieren der Zellen | 24 |
| 3.2.1.3 | Zellzahlbestimmung | 24 |
| 3.2.1.4 | Zellaussaat | 24 |
| 3.2.1.5 | Behandlung der Zellen | 25 |
| 3.2.1.6 | Kryokonservierung und Reaktivierung..... | 26 |
| 3.2.2 | Sorting von TF ⁺ -Zellen..... | 27 |
| 3.2.3 | Wound Healing Assay | 28 |
| 3.2.4 | Clotting-Assay | 28 |
| 3.2.4.1 | Vorbereitungen | 28 |
| 3.2.4.2 | Herstellung der Zellsuspension | 29 |
| 3.2.4.3 | Durchführung..... | 29 |
| 3.2.5 | Durchflusszytometrische Messungen..... | 29 |
| 3.2.5.1 | TF-Abundanz | 30 |
| 3.2.5.2 | Koabundanz von TF und PS..... | 31 |
| 3.2.5.3 | EMT-Marker | 31 |
| 3.2.6 | Immunfluoreszenzfärbung | 33 |
| 3.2.6.1 | TF und EpCAM..... | 34 |
| 3.2.6.2 | EMT-Marker: Claudin-7, E-Cadherin, N-Cadherin | 34 |
| 3.2.7 | Statistik | 35 |
| IV. | ERGEBNISSE | 36 |
| 4.1 | Einfluss von 5-FU und Gem auf kolorektale Karzinomzelllinien..... | 36 |
| 4.1.1 | Sorting TF ⁺ Zellen & Langzeitkultivierung TF ⁺ -gesorteter HROC173 Zellen | 37 |
| 4.2 | Einfluss von 5-FU, Gem und CDK-Inhibitoren auf die Zellmigration..... | 38 |
| 4.3 | Einfluss von Mono- und Kombinationstherapien auf die TF-Abundanz | 40 |
| 4.4 | Detektion der Ko-Abundanz von TF und Phosphatidylserin | 44 |
| 4.5 | Einfluss von Mono- und Kombinationstherapie auf die Gerinnungszeiten | 45 |
| 4.6 | Einfluss der Monotherapien auf EMT-Marker | 48 |
| 4.6.1 | Immunfluoreszenzfärbungen von Claudin-7, E-Cadherin und N-Cadherin | 48 |
| 4.6.2 | Durchflusszytometrische Bestimmung von EMT-Markern..... | 50 |
| V. | DISKUSSION..... | 52 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 5.1 | Relevanz von TF auf Karzinomzellen nach Mono- und Kombinationstherapien | 53 |
| 5.2 | Einfluss von Kurzzeitbehandlungen auf EMT-Marker bei CRC-Zellen | 56 |
| 5.3 | Nachweis der Ko-Abundanz von TF und PS auf CRC-Zellen..... | 58 |
| VI. ZUSAMMENFASSUNG | | 60 |
| VII. LITERATURVERZEICHNIS..... | | 62 |
| VIII. ANHANG | | 71 |
| 8.1 | Reexposition mit zytostatischen Substanzen von 5-FU- und Gem-behandelten TF ⁺ -gesortete Zellen | 71 |
| 8.2 | Vordaten: Langzeitbeobachtung von EMT-Markern | 72 |
| 8.3 | Lebenslauf | 74 |
| 8.4 | Publikationsliste | 75 |
| 8.5 | Danksagung | 76 |
| IX. THESEN | | 77 |
| X. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG | | 78 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| ABBILDUNG 1: GERINNUNGSKASKADE, NACH TASCHENLEHRBUCH PHYSIOLOGIE, GEKLE ET AL., THIEME, 2015 ⁴ | 2 |
| ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TF-ISOFORMEN ¹ | 3 |
| ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EPITHELIALEN-MESENCHYMALEN TRANSFORMATION (EMT) - BZW. MESENCHYMALEN-EPITHELIALEN TRANSITION (MET)..... | 5 |
| ABBILDUNG 4: PROZENTUALER ANTEIL DER HÄUFIGSTEN TUMORLOKALISATIONEN AN ALLEN KREBSNEUERKRANKUNGEN IN DEUTSCHLAND 2018 (OHNE NICHT-MELANOTISCHEN HAUTKREBS) ³⁵ | 8 |
| ABBILDUNG 5: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG DER WIRKMECHANISMEN VON 5-FU ⁴⁷ | 10 |
| ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER VERWENDETEN CDK-INHIBITOREN, SOWIE DEREN MOLEKULARE ANGRIFFPUNKTE INNERHALB DES ZELLYKLUS, NACH RIESS ET AL ⁵⁶ | 11 |
| ABBILDUNG 7: VERGLEICH DER BASALEN TF-ABUNDANZ VON VERSCHIEDENEN ZELLINIEN | 13 |
| ABBILDUNG 8: VERGLEICH DER GERINNUNGSZEITEN VON VERSCHIEDENEN ZELLINIEN, UNTERSUCHT MIT NORMALPLASMA UND FXII-DEFIZIENTEN PLASMA | 14 |
| ABBILDUNG 9: EINFLUSS VON KURZZEITBEHANDLUNGEN MIT 5-FU UND GEM AUF DIE TF-ABUNDANZ DER KOLOREKTALEN KARZINOMZELLINIEN HROC173 UND HROC257 T0 M1 | 14 |
| ABBILDUNG 10: DARSTELLUNG DES SORTINGVORGANGS TF ⁺ -ZELLEN..... | 27 |
| ABBILDUNG 11: ABLAUF DES CLOTTING-ASSAYS..... | 29 |
| ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DIREKTEN UND INDIREKTEN IMMUNFLUORESCENZ..... | 33 |
| ABBILDUNG 13: IMMUNFLUORESCENZ VON TF UND EPCAM AUF DEN HROC173 ZELLEN NACH ZYTOSTATISCHER THERAPIE MIT 5-FU BZW. GEM..... | 36 |
| ABBILDUNG 14: BEISPIELHAFTE DARSTELLUNG DES ZELLSORTINGVORGANGS | 37 |
| ABBILDUNG 15: MITTLERE FLUORESCENZINTENSITÄT (MFI) ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN NACH SORTING VON HROC173 ZELLEN, DIE ZUVOR MIT 5-FU ODER GEM BEHANDELT WURDEN..... | 38 |
| ABBILDUNG 16: EINFLUSS VON 5-FU UND GEM, SOWIE DER CDK-INHIBITOREN DINACICLIB, ABEMACICLIB UND THZ-1 AUF DEN WOUND HEALING ASSAY ANHAND DER BASALEN HROC173 ZELLEN | 39 |
| ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DER TF-ABUNDANZEN NACH MONOTHERAPIE MIT CDK-INHIBITOREN AN BASALEN UND TF ⁺ -GESORTETEN HROC173 ZELLEN | 40 |
| ABBILDUNG 18: DARSTELLUNG DER TF-ABUNDANZEN NACH SEQUENZIELLER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN | 42 |
| ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DER TF-ABUNDANZEN NACH SIMULTANER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN | 43 |

| | |
|--|---|
| ABBILDUNG 20: DARSTELLUNG DER KO-ABUNDANZ VON TF UND PS AUF HROC173 ZELLEN NACH MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE | 44 |
| ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH MONOTHERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN | 45 |
| ABBILDUNG 22: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH SEQUENZIELLER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN..... | 46 |
| ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH SIMULTANER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN | 47 |
| ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DER IMMUNFLUORESCENZ VON N-CADHERIN, E-CADHERIN UND CLAUDIN-7 AUF BASALEN UND TF ⁺ -GESORTETEN HROC173 ZELLEN (A, B, C)..... | 49 |
| ABBILDUNG 25: QUANTIFIZIERUNG DER IMMUNFLUORESCENZ VON N-CADHERIN, E-CADHERIN UND CLAUDIN-7 | 50 |
| ABBILDUNG 26: AUSWIRKUNG VON MONOTHERAPEUTISCHER UND SIMULTANER BEHANDLUNG MIT 5-FU UND ABEMACICLIB AUF EMT-MARKER | 51 |
| ABBILDUNG 27: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH NEUBEHANDLUNG DER 5-FU BZW. GEM-BEHANDELTEN TF ⁺ -GESORTETEN ZELLEN MIT 5-FU BZW. GEM | 71 |
| ABBILDUNG 28: DARSTELLUNG DER LANGZEITBEOBACHTUNG DER GEN-EXPRESSION VERSCHIEDENER EMT-MARKER VON 5-FU- BZW. GEM- BEHANDELTEN TF ⁺ -GESORTETEN HROC173 ZELLEN | FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT. |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|--|----|
| TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE LABORGERÄTE | 17 |
| TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN..... | 18 |
| TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE CHEMIKALIEN | 20 |
| TABELLE 4: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE THERAPEUTIKA..... | 21 |
| TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE ANTIKÖRPER | 21 |
| TABELLE 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER MEDIEN / LÖSUNGEN | 22 |
| TABELLE 7: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE ZELLVOLUMINA UND PLATTENFORMATE IN DEN DURCHFÜHRTE VERUCHEN..... | 25 |
| TABELLE 8: ÜBERSICHT ÜBER EINGESETZTE SUBSTANZEN UND ABLAUF DER MONOTHERAPIE..... | 25 |
| TABELLE 9: ÜBERSICHT ÜBER EINGESETZTE SUBSTANZEN UND ABLAUF DER KOMBINATIONSTHERAPIEN..... | 25 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| Abkürzung | Bedeutung |
|------------------|---|
| 5-FU | 5-Fluorouracil |
| CDK | <i>cyclin-dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase |
| CDKi | <i>cyclin-dependent kinase inhibitor protein</i> , Cyclin-abhängige Kinaseinhibitor |
| CRC | <i>Colorectal Cancer</i> , Kolorektales Karzinom |
| CSCs | <i>Cancer stem cells</i> , Krebsstammzellen |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DPD | Dihydropyrimidin-Dehydrogenase |
| EZM | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EMT | <i>Epithelial-mesenchymal-transition</i> , Epithelial-mesenchymale Transition |
| FACS | <i>fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie |
| FDA | <i>food and drug administration</i> |
| FISH | Fluoreszenz in situ Hybridisierung |
| FKS | Fetales Kälber Serum |
| Gem | Gemcitabin |
| fV / fVa | Gerinnungsfaktor V / aktivierter Gerinnungsfaktor V |
| fVII / fVIIa | Gerinnungsfaktor VII / aktivierter Gerinnungsfaktor VII |
| fVIII / fVIIIa | Gerinnungsfaktor VIII / aktivierter Gerinnungsfaktor VIII |
| fIX / fIXa | Gerinnungsfaktor IX / aktivierter Gerinnungsfaktor IX |
| fX / fXa | Gerinnungsfaktor X / aktivierter Gerinnungsfaktor X |
| fXIII / fXIIIa | Gerinnungsfaktor XIII / aktivierter Gerinnungsfaktor XIII |
| HDI | Index für menschliche Entwicklung, <i>Human Development Index</i> |

| | |
|------------------|---|
| mCRC | Metastisiertes Kolorektales Karzinom, <i>metastatic Colorectal Cancer</i> |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensität |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PKC α | Protein Kinase C alpha |
| PP-Röhr- chen | Polypropylen-Röhrchen |
| PS | Phosphatidylserin |
| Rb | Retinoblastom-Protein |
| RCT | Radiochemotherapie |
| TF | Tissue Faktor |
| asTF | <i>alternatively spliced Tissue Factor</i> |
| flTF | <i>full-length Tissue Factor</i> |
| TFPI | Tissue Factor Pathway Inhibitor |
| TS | Thymidylat-Synthase |
| VEGF | <i>vascular endothelial growth factor</i> |
| VTE | Venöse Thromboembolie |

I. EINLEITUNG

1.1 ANMERKUNGEN

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten werden dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

1.2 TISSUE FACTOR UND GERINNUNG

Der *Tissue Factor* (auch genannt Thromboplastin beziehungsweise genauer Gewebsthromboplastin, Faktor III oder CD142) ist ein transmembranöses Glykoprotein, das vor allem für seine Funktion als Kofaktor für Faktor VII (fVII) im extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade bekannt ist^{1,2}.

Im Gegensatz zu den restlichen Gerinnungsfaktoren, die konstant im peripheren Blut vorhanden sind, muss *Tissue Factor* (TF) zunächst aus dem umliegenden Gewebe freigesetzt werden, um die exogene Gerinnungskaskade zu initiieren. Diesen Umstand postulierte bereits vor mehr als hundert Jahren Paul Morawitz in seiner damaligen Arbeit zur Theorie der Blutgerinnung^{1,3}. Kommt es zu einer Gewebsverletzung, so kann TF von Faktor VII (fVII) gebunden werden, welches als inertes Zymogen frei im Plasma zirkuliert. Eine Besonderheit von fVII ist zudem, dass er zu einem geringen Teil bereits in seiner aktiven enzymatischen Form, als fVIIa, im Blut vorliegt^{2,4}. Dementsprechend kann die Bildung des an der Zelloberfläche gelegenen TF:VIIa-Komplexes entweder durch die direkte Bindung von fVIIa oder durch die Bindung von fVII und nachfolgender Aktivierung zu fVIIa durch begrenzte Proteolyse erfolgen^{2,5}. Erst durch diese Komplexbildung wird die Aktivität von fVIIa so stark erhöht, dass die nachfolgenden Substrate Faktor IX (fIX) und Faktor X (fX) proteolytisch in ihre enzymatisch aktiven Formen fIXa und fXa umgewandelt werden. Eine entscheidende Rolle kommt hierbei auch negativ geladenen Phospholipiden, speziell Phosphatidylserin zu, welche die Bindung von fIX und fX erst ermöglichen². Im weiteren Verlauf kommt es schließlich zur Zusammenlagerung von fXa mit dem aktivierten Faktor V (fVa) und von fIXa mit der enzymatisch aktiven Form von Faktor VIII (fVIIIa). Dies wiederum bewirkt die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin, welches im Anschluss den Faktor XIII (fXIII) aktiviert, sowie durch Proteolyse zur Entstehung von Fibrinmonomeren führt. Mittels Faktor XIII kommt es im finalen Schritt zu einer kovalenten Quervernetzung zwischen Lysin- und Glutaminresten der Fibrinmonomere und so zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels, was letztlich zum Wundverschluss führt^{2,4}.

Darüber hinaus kommt es durch die bereits zu Beginn stattfindende Aktivierung von Faktor IX frühzeitig auch zur Aktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems, was aufgrund der

Tatsache, dass der exogene Weg durch den *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) schnell zum Erliegen kommt, von besonderer Bedeutung ist. Beim intrinsischen Gerinnungsweg sind anders als beim extrinsischen Weg nicht äußere Einwirkungen, sondern Kontaktaktivierungen durch Fremdoberflächen die Auslöser der Kaskade. Diese bewirken eine Aktivierung von Faktor XII, was wiederum die Aktivierung der Faktoren XI und schließlich IX nach sich zieht. FIXa kann dann, wie bereits erwähnt, über die Komplexbildung mit fVIIIa den weiteren Ablauf der Gerinnungskaskade vorantreiben⁴.

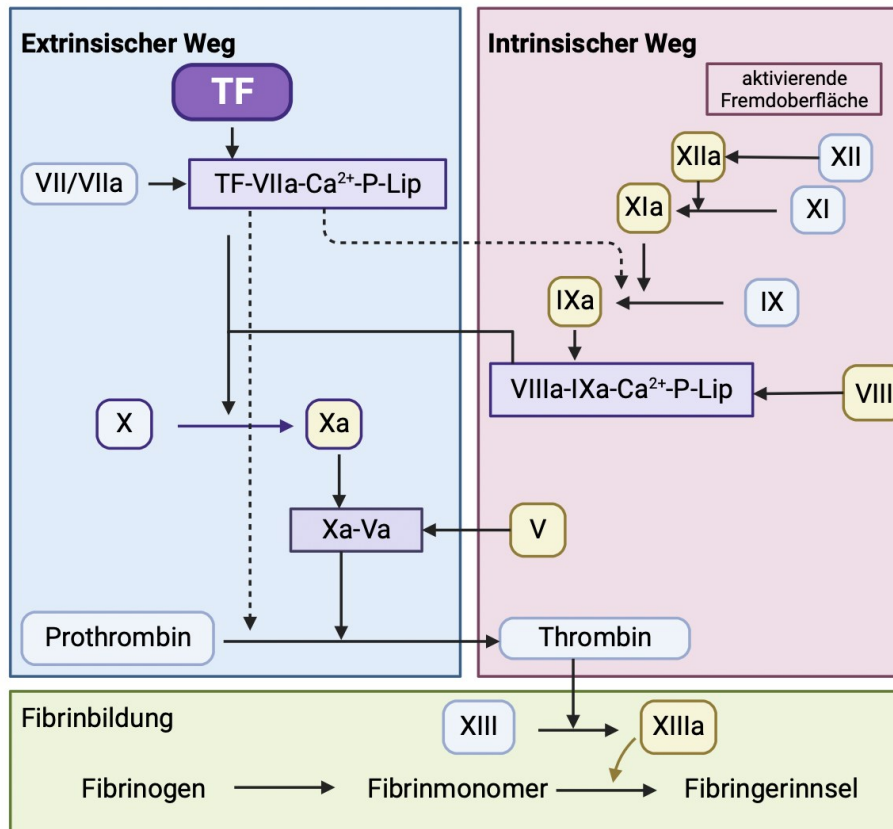


ABBILDUNG 1: GERINNUNGSKASKADE, NACH TASCHENLEHRBUCH PHYSIOLOGIE, GEKLE ET AL., THIEME, 2015⁴

In Anbetracht dieses komplexen und wichtigen Prozesses erscheint es selbstverständlich, dass TF physiologisch nur von Zellen bzw. Geweben exprimiert wird, die sich nicht im direkten Kontakt zum Blut oder Plasma befinden. Periphere Blutzellen und das gefäßauskleidende Endothel besitzen daher kein TF⁶. Besonders hohe TF-Expressionen zeigen sich hingegen an Orten, die stark vaskularisiert sind und an denen massive Blutungen schnell zu lebensgefährlichen Konsequenzen führen können, wie beispielsweise in den Nieren, im Herzen und im Gehirn. Damit wird deutlich, dass der TF vor allem die Funktion einer hämostatischen „Hülle“ einnimmt, welche die vaskuläre Unversehrtheit unseres Organismus sicherstellt^{1,2,6}.

1.2.1 STRUKTUR UND ISOFORMEN

Das für den TF kodierende Gen F3 befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 1, Genlocus 21.3¹. Dieses Gen enthält insgesamt 6 Exons, aus denen zwei verschiedene Protein-Isoformen als Genprodukt entstehen können: der *full-length Tissue factor* (flTF) und durch Herausspleißen von Exon 5 und Fusion der Exons 4 und 6 der *alternatively spliced Tissue Factor* (asTF)^{1,7}. Diese Differenzierung ist von Bedeutung, da sich die Funktionen und die Signalwege, über die beide Isoformen agieren, zum Teil maßgeblich voneinander unterscheiden.

Das flTF-Glykoprotein setzt sich aus 263 Aminosäuren zusammen, die sich in einen extrazellulären (219 Aminosäuren), transmembranösen (23 Aminosäuren) und einen kleinen intrazellulären (21 Aminosäuren) Bereich gliedern. Seine Hauptfunktion besteht in der zuvor bereits beschriebenen Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade^{1,7}. Durch den Prozess des alternativen Spleißens kommt es beim asTF zum Verlust der transmembranösen Domäne und somit auch zur Entstehung eines spezifischen C-terminalen Endes. Dieser Verlust sorgt dafür, dass asTF nicht mehr in der Membran verankert ist, sondern im Gegensatz zum flTF löslich vorliegt. Anders als beim flTF ist auch die gerinnungsfördernde Aktivität bei dieser Isoform eher fraglich. Zwar ist eine Bindungsstelle zur Komplexbildung mit dem essenziellen Faktor VII vorhanden, doch für die Substrate fIX und fX fehlen diese vollständig^{1,7,8}. AsTF wird stattdessen vor allem mit Einfluss auf Angiogenese und Zellwachstum in Verbindung gebracht^{1,7}.

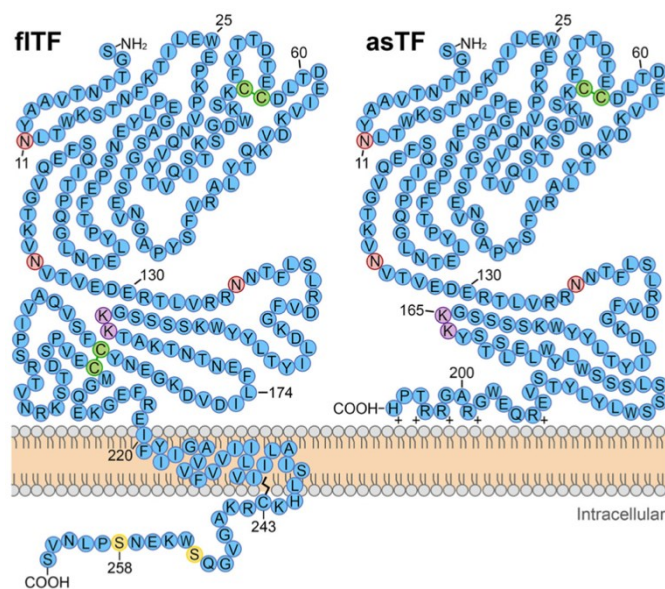


ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TF-ISOFORMEN¹

1.2.2 DIE ROLLE VON TISSUE FACTOR BEI KREBSERKRANKUNGEN

Bei vielen Krebsarten wird TF deutlich überexprimiert. Diese Überexpression ist häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert^{9,10}. Zusätzlich haben Krebspatienten im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein etwa 6-fach erhöhtes Risiko venöse Thromboembolien (VTE) zu entwickeln. Dabei kommt es jedoch auch maßgeblich auf die Art der Krebserkrankung an. Während Brust- und Prostatakrebs beispielsweise nur ein verhältnismäßig niedriges Risiko aufweisen, zählen Karzinome des Pankreas und Ovars, Gehirntumoren, sowie hämatologische Neoplasien zur Hochrisikogruppe. Kolonkarzinome ordnen sich im intermediären Risikosegment ein^{1,11}. Dieses paraneoplastische Ereignis ist allgemein als „*Trousseau Syndrom*“ bekannt und geht auf den französischen Arzt Armand Trousseau zurück, der schon im 19. Jahrhundert einen Zusammenhang zwischen malignen Erkrankungen und dem Auftreten von Thrombosen beschrieb. Trousseau entwickelte nur zwei Jahre nach seiner Erstbeschreibung selbst eine VTE und diagnostizierte sich daraufhin korrekterweise mit Magenkrebs, an dem er schließlich nach kurzer Zeit auch verstarb. Grundlage dieses Syndroms ist eine Vielfalt an pathologischen Prozessen, von denen die übermäßige TF-Expression nur einen Teil darstellt^{1,12}.

Mittlerweile sind einige Mechanismen beschrieben, über welche die Expression von TF in Tumoren hochreguliert wird. Bei Kolonkarzinomen scheinen vor allem das Onkogen *K-ras* sowie das als Tumorsuppressor fungierende p53-Protein von Bedeutung zu sein. Mutationen in diesen beiden Genen führen zur Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalwegs, welche wiederum die TF-Expression deutlich erhöhen^{9,13}. Auch durch Hypoxie induzierte Prozesse spielen bei vielen Tumoren eine Rolle, beispielsweise über den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1- α ¹. Von großer Relevanz ist darüber hinaus auch die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) von Krebszellen. Diese beschreibt den biologischen Prozess, bei dem ein Wandel von epithelialen Zellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften erfolgt. Beschrieben wurde dieses Phänomen, damals noch als „epitheliale-mesenchymale Transformation“, erstmals in den 1980er Jahren von der amerikanischen Biologin Elizabeth Hay¹⁴. Innerhalb dieses Vorgangs verlieren epitheliale Zellen durch komplexe biochemische Prozesse ihre klassischen Charakteristika, wie beispielsweise Zell-Zell-Verbindungen und apikobasale Polarität und nehmen stattdessen einen mesenchymalen Phänotyp an (siehe Abbildung 3). Dieser ermöglicht durch Polaritätsverlust sowie veränderte Morphologie eine erhöhte Motilität und Invasivität. Hierbei handelt es sich jedoch um einen reversiblen Prozess, sodass sich der Begriff „Transition“ etabliert hat. Läuft der Vorgang in die konträre Richtung ab, wird er als mesenchymale-epitheliale Transition (MET) bezeichnet¹⁵⁻¹⁷.

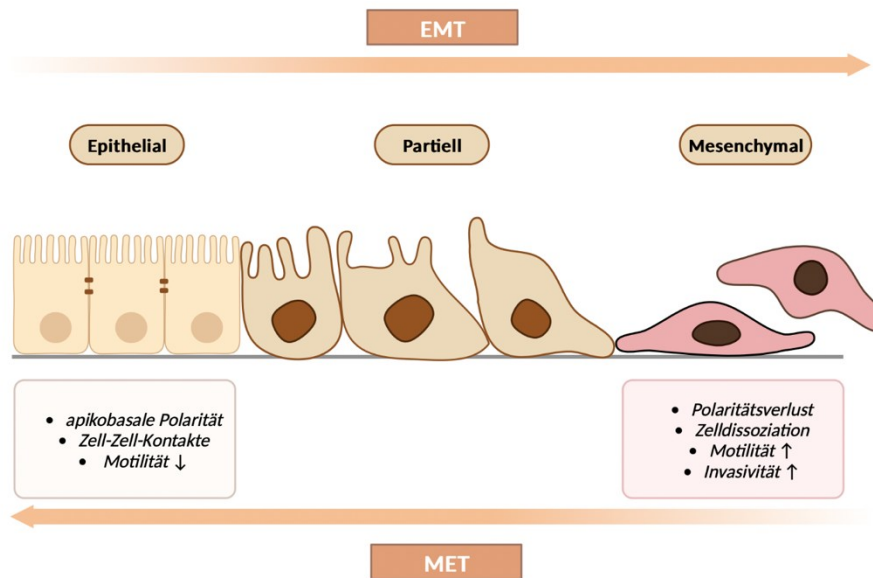


ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER EPITHELIALEN-MESENCHYMALEN TRANSFORMATION (EMT) - BZW. MESENCHYMALEN-EPITHELIALEN TRANSITION (MET)

Mittlerweile hat sich eine Vielzahl von Biomarkern etabliert, mit deren Hilfe EMT zuverlässig detektiert werden kann. Ein häufig genutzter Zelloberflächenmarker ist E-Cadherin. Insbesondere der Cadherin-Switch, der eine Herunterregulierung von E-Cadherin bei gleichzeitiger Hochregulierung von N-Cadherin beschreibt, wird häufig zur Beobachtung von EMT-Prozessen genutzt^{18,19}. Auch Integrine können hierbei nützliche Marker darstellen. Beim CRC konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass EMT zu einer Überexpression des Integrins $\alpha\beta 6$ führt, welches als prognostischer Marker fungiert^{18,20}. Darüber hinaus können auch Marker des Zytoskeletts zur EMT-Detektion genutzt werden. Einen Vertreter dieser Gruppe stellt das Intermediärfilament Vimentin dar, welches vor allem für die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und Regulierung wichtiger Zellfunktionen von Bedeutung ist^{18,21,22}. Beim CRC korreliert eine Überexpression von Vimentin mit fortgeschrittenem TNM-Stadium, Lymphknotenmetastasen, reduziertem krankheitsfreiem Überleben sowie auch mit dem Gesamtüberleben. Häufig werden auch Transkriptionsfaktoren zum Nachweis genutzt, wie beispielsweise ZEB1, ZEB2 (*Zinc finger E-box-binding homebox factors*) und SNAIL (auch SNAI1). Letzteres übt einen sehr umfassenden Einfluss auf verschiedenste Aspekte des EMT-Phänotyps aus^{16,18}.

Bislang nur wenig untersucht ist der Zusammenhang zwischen EMT und TF-Expression. In einer Studie von Mislom *et al.* konnte gezeigt werden, dass die Blockade von E-Cadherin zur Hochregulation von Vimentin führt und somit einen EMT-Phänotyp hervorruft. Darüber hinaus wiesen die Zellen, die neben einem stark metastatischen Phänotyp auch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Stimulation mit FVIIa zeigten, eine erhöhte TF-Expression auf. Dies legt die Möglichkeit nahe, dass der EMT-assoziierte Verlust von E-Cadherin prokoagulante Eigen-

schaften fördert. Aber auch für TF/FVIIa-vermittelte angiogene Effekte könnten solche zellulären Subpopulationen besonders anfällig sein²³. Einen direkten Zusammenhang zwischen EMT und TF-Überexpression legen auch die Daten aus der Studie von Bourcy *et al.* nahe. Hier wurde an drei Zellkulturmodellen eine deutliche TF-Erhöhung gezeigt, nachdem die Zellen eine Wachstumsfaktor-induzierte EMT-Induktion aufwiesen. Weiterhin bestätigte sich, dass auch EMT-Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die TF-Expression und damit auf die prokoagulative Aktivität von Zellen haben²⁴.

Auch eine Herunterregulierung der TF-Expression in Tumorzellen ist jedoch möglich. Studien zeigten z.B. das miRNA's, wie z.B. miR-181b, miR-19, miR-20a, miR-93/106b und miR-520g in der Lage sind, das F3-Gen zu binden und so für eine verminderte Translation zu sorgen^{1,10}. Zusammengefasst sind also vor allem mutationsbedingte Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, EMT sowie hypoxische Prozesse in der Lage, die TF-Expression in Tumoren zu modulieren^{9,10}.

Auch wenn TF essenzielle Funktionen innerhalb der Hämostase erfüllt, können beide TF-Isoformen über diverse Mechanismen auch die Malignität von Krebszellen entscheidend beeinflussen. Zu diesen zählen u.a. Angiogenese, Zellüberleben, Metastasierung, Zytoskelettveränderungen und Tumorstammzelleigenschaften^{1,9}. Eingeordnet wird der TF zwar in die Klasse-II-Zytokinrezeptoren, die von ihm genutzten Signalwege unterscheiden sich allerdings erheblich von anderen Rezeptoren dieser Familie und auch die beiden Isoformen fungieren zumeist über unterschiedliche Mechanismen¹. Der fITF:VIIa-Komplex, welcher eine kritische Funktion in der extrinsischen Gerinnungskaskade einnimmt, ist auch in der Lage, eine PAR2 (*protease-activated receptor 2*) getriggerte Signalgebung zu aktivieren^{1,9}. PAR's werden durch proteolytische Spaltung aktiviert und binden daraufhin heterotrimere G-Proteine. Diese initiieren weitere Prozesse, z.B. die Synthese proangiogener Faktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*), CXCL1 und IL8, aber auch von Immunmodulatoren wie GM-CSF (bzw. CSF2) und M-CSF (bzw. CSF1)^{1,9,25}. Im Gegensatz zum fITF kann asTF ganz unabhängig von Faktor VIIa mittels Bindung von Integrinen die Expression proangiogener Gene (z.B. VEGF, AREG, EFEMP1) erreichen. So wird z.B. über die Bindung ans $\alpha\beta3$ -Integrin auf endothelialen Zellen deren Zellmigration gefördert und über $\alpha\beta1$ -Integrin auf Kapillarisierungsprozesse Einfluss genommen^{1,26,27}. Auch Proliferation und Zellüberleben werden von fITF und asTF mitgesteuert. So konnte am Beispiel kolorektaler Karzinomzellen gezeigt werden, dass der fITF:VIIa-Komplex über PAR2 auch Protein kinase C alpha (PKC α) aktiviert, was wiederum durch eine erhöhte Aktivität der ERK1/2 und NF- κ B-Signalwege positive Auswirkungen auf Proliferation und Überleben dieser Zellen nimmt^{1,28}.

Ein weiterer malignitätsfördernder und auch gefährlicher Aspekt von Krebserkrankungen ist die Metastasenbildung, welche die Prognose stark negativ beeinflusst. Das Wort Metastase

entstammt dem griechischen „metástasis“ und bedeutet „Wanderung“. Es beschreibt vom Ursprungsort entfernt liegende Tochtergeschwülste eines Tumors²⁹. Beim flTF scheint vor allem die zytoplasmatische Domäne hinsichtlich der Metastasenbildung von Relevanz zu sein. Diese fördert die Invasivität von Tumorzellen über die GTPase Rac1 und p38 MAPK, die wiederum über Interaktionen mit Aktinfilamenten Veränderungen des Zytoskeletts hervorrufen^{1,30}. Tumore setzen jedoch auch extrazelluläre flTF-Vesikel frei, um über parakrine Signalwege sowohl in ihrer unmittelbaren Mikroumgebung als auch an distal gelegenen Orten zu wirken. Diese Vesikel sind beispielsweise in der Lage an endothelialen Zellen eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen herbeizuführen, proinflammatorische Wirkungen zu verstärken und hierüber, sowie über weitere Mechanismen, eine geeignete Umgebung für zirkulierende Tumorzellen zu schaffen^{1,31}. Besonders eindrucksvoll ist zudem, dass Tumormetastasen im Vergleich zu nicht-metastatischen Zellen bis zu 1000-fach höhere TF-Spiegel aufweisen^{32,33}. Dies verdeutlicht die Relevanz von TF bei der Entstehung von Metastasen und macht ihn zudem zu einem interessanten therapeutischen Target.

In den letzten Jahren gab es bereits verschiedene Ansätze, TF als Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien zu nutzen. Ein großer Vorteil vom zielgerichteten Targeting ist, dass die systemischen Nebenwirkungen, anders als beim Einsatz klassischer Chemotherapeutika, deutlich geringer sind. Ein hohes Risiko beim gezielten Angreifen des TF besteht jedoch in der Erhöhung des Blutungsrisikos durch Beeinträchtigung seiner fundamentalen Funktion im Prozess der Hämostase. Dennoch gibt es auch die Möglichkeit, nur spezielle durch TF getriggerte Signalwege zu blockieren, oder auch asTF zu nutzen, dem nur eine untergeordnete Relevanz im Bereich der Blutgerinnung zuzukommen scheint.^{1,10}

Auf diesen speziellen Punkt und insbesondere auf vielversprechende Therapieversuche sowie derzeit in der Erprobung befindliche Medikamente wird im späteren Verlauf der Arbeit noch ausführlicher eingegangen.

1.3 KOLOREKTALES KARZINOM

1.3.1 EPIDEMIOLOGIE UND ÄTIOLOGIE

Kolorektale Karzinome (*Colorectal Cancer, CRC*) bezeichnen maligne Neoplasien des Dickdarms und Rektums und gehören weltweit zu den häufigsten Krebserkrankungen. Nach Daten der GLOBOCAN aus dem Jahr 2020 belegt Darmkrebs global den 3. Platz unter den Krebsneuerkrankungen und nimmt hinsichtlich der Mortalität sogar den 2. Platz ein³⁴. In Deutschland liegen CRCs auf Platz 2 bei Frauen bzw. 3 bei Männern aller Krebsneuerkrankungen³⁵. Insgesamt erkranken mehr Männer als Frauen³⁶.

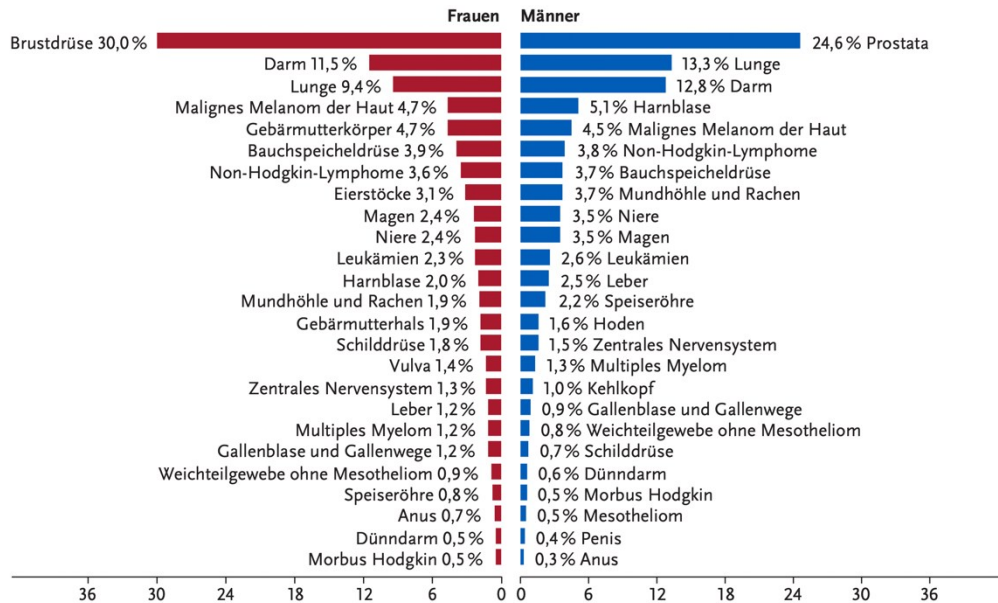


ABBILDUNG 4: PROZENTUALER ANTEIL DER HÄUFIGSTEN TUMORLOKALISATIONEN AN ALLEN KREBSNEUERKRANKUNGEN IN DEUTSCHLAND 2018 (OHNE NICHT-MELANOTISCHEN HAUTKREBS)³⁵

Auch regionale Unterschiede lassen sich hinsichtlich der Inzidenz nachweisen. Besonders Industrienationen zeigen hohe Neuerkrankungsraten, obwohl auch in Entwicklungsländern mit steigendem HDI (Human Development Index) CRC-Inzidenzraten ansteigen.

Das Risiko zu erkranken, erhöht sich mit zunehmendem Alter, wobei Darmkrebs mit durchschnittlich 75 Jahren (Frauen) bzw. 72 Jahren (Männern) ein recht hohes mittleres Erkrankungsalter aufweist, verglichen mit anderen Tumorentitäten³⁵. US-amerikanische Daten zeigen jedoch auch, dass gerade in jungen Altersgruppen (20-49) über die letzten Jahrzehnte ein deutlicher Zuwachs an Neuerkrankungen zu verzeichnen war, während in den Altersgruppen ab 50 Jahren die Inzidenz stetig abnahm³⁶. Folglich spielen neben dem Alter auch noch andere Risikofaktoren eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung eines CRCs. Insbesondere genetische Dispositionen können das Erkrankungsrisiko drastisch erhöhen und sind typischerweise mit einem deutlich jüngeren Erkrankungsalter verbunden. Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, hierbei vor allem die Colitis ulcerosa, tragen zur Risikoerhöhung mit bei. Darüber hinaus werden zahlreiche modifizierbare Faktoren, wie Übergewicht, Bewegungsmangel, Tabakkonsum, häufiger Verzehr von rotem und verarbeitetem Fleisch sowie regelmäßiger Alkoholkonsum mit der Entstehung von Darmkrebs assoziiert^{35,37}. Auch der Einfluss von Infektionen durch Erreger wie beispielsweise *Helicobacter pylori* oder *Fusobacterium spp.* wird wissenschaftlich zunehmend diskutiert^{38,39}.

Die CRC-Klassifikation erfolgt anhand des TNM-Systems. Hierbei beschreibt T (*Primary Tumor*) die Invasionstiefe des Primarius, N (*Regional Lymph Nodes*) das Vorhandensein und

Ausmaß regionaler Lymphknotenmetastasen und M (*Distant Metastasis*) die Ab- oder Anwesenheit von Fernmetastasen. Anhand dieser Kriterien erfolgt eine Einteilung in Stadien (0 – IV), welche die Grundlage für weitere Therapieentscheidungen bilden⁴⁰.

1.3.2 SYSTEMISCHE THERAPIEN

In der klinischen Praxis werden verschiedene Chemotherapie-Regime zur systemischen Behandlung des CRCs verwendet. Vorwiegend kommen dabei 5-FU, Capecitabin, Oxaliplatin und Irinotecan als zytostatische Substanzen zum Einsatz⁴¹. Der Stellenwert von 5-FU in der Therapie des CRCs ist dementsprechend groß.

5-FU gehört zur Gruppe der Fluoropyrimidine und damit zu einer Medikamentenklasse, die bereits vor vielen Jahren entwickelt wurde⁴². Strukturell handelt es sich bei 5-FU um ein fluoriertes Uracil-Analogon, das als Antimetabolit gleich über mehrere Wirkmechanismen seinen zytotoxischen Effekt entfaltet. Den Hauptmechanismus stellt hierbei die Hemmung des Enzyms Thymidilat-Synthase (TS) dar. Dies geschieht über den Metaboliten Fluordesoxyuridinmonophosphat (FdUMP), der nach Aufnahme von 5-FU in die Zelle entsteht. FdUMP bildet einen ternären Komplex mit dem Enzym TS sowie seinem Kofaktor und verdrängt damit Desoxyuridinmonophosphat (dUMP), das eigentliche Substrat von TS. Dadurch kann dUMP schließlich nicht mehr zu Desoxythymidinmonophosphat (dTMP) umgewandelt werden^{42–44}. Folglich unterbleibt auch die Synthese von Desoxythymidintriphosphat (dTTP), einem essenziellen Bestandteil für die DNA-Replikation und Reparaturprozesse. Dieses Phänomen wird auch als „thyminloser Tod“ bezeichnet⁴². Die Hemmung von TS kann zudem noch über die Applikation von Leucovorin, ein Tetrahydrofolsäurederivat, verstärkt werden. Dieses stellt 5-10-Methylen-Tetrahydrofolat bereit und trägt so zur Stabilität des Komplexes aus FdUMP und TS bei^{44,45}. Darüber hinaus kommt es durch die Inhibierung von TS auch zur Akkumulation von dUMP, welches zusammen mit Fluordesoxyuridintriphosphat (FdUTP), eine Verbindung, die bei der weiteren Metabolisierung von FdUMP entsteht, an die DNA binden und so die Ausbildung von DNA-Strangbrüchen bewirken kann. Zusätzlich gibt es auch noch die Möglichkeit das Fluoruridintriphosphat (FUTP), ein weiterer 5-FU Metabolit, in die RNA eingebaut wird und hierüber die regelrechte Prozessierung und Funktion dieser behindert^{43,44}. Abgebaut wird 5-FU hauptsächlich in der Leber, wobei vor allem das Enzym Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) eine entscheidende Rolle spielt. Hier können genetische Polymorphismen im DPYD-Gen dazu führen, dass Enzyme mit deutlich eingeschränkter oder sogar vollständig fehlender Funktionalität entstehen. Sind Patienten davon betroffen, besteht bei ihnen ein gravierendes akutes Toxizitätsrisiko. Bei komplettem Fehlen der Enzymfunktion verläuft eine Therapie mit 5-FU sogar oftmals letal^{43,46}.

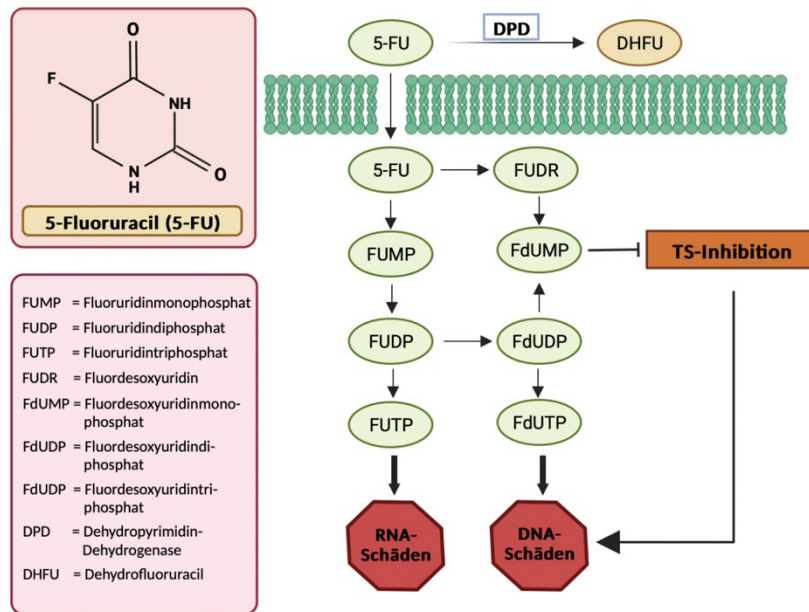


ABBILDUNG 5: BEISPIELHAFTER DARSTELLUNG DER WIRKMECHANISMEN VON 5-FU⁴⁷

Trotz dieser therapeutischen Möglichkeiten blieb die 5-Jahresüberlebensrate für Patienten mit metastasiertem CRC (mCRC) *bis dato* schlecht (< 20%)⁴⁸. Daher besteht auch weiterhin die Notwendigkeit für die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten. So haben in den letzten Jahren vor allem immunmodulatorische und zielgerichtete Substanzen große Bedeutung in der Therapie erhalten. Zu diesen zählen auch Cyclin-abhängiger-Kinase Inhibitoren (CDKi), auf die im folgenden Abschnitt näher eingegangen wird.

1.3.3 PRÄKLINISCHE ANSÄTZE

Dysregulationen des Zellzyklus sind ein wesentliches Charakteristikum von Tumoren, u.a. auch beim CRC. Häufig liegen Mutationen oder Amplifikationen in spezifischen Cyclin-abhängigen Kinasen (*Cyclin dependent Kinase*, CDK) vor, die zu einer Fehlregulierung wichtiger Zellzyklusregulatoren führen⁴⁹. Neben den Cyclinen, die aktivierend wirken, spielen aber auch Cyclin-abhängige Kinase Inhibitoren (*Cyclin dependent Kinase Inhibitors*, CDKi) eine wichtige Rolle, deren Aktivität wiederum auch vom Phosphorylierungsstatus abhängig ist. Häufige tumorassoziierte Veränderungen sind beispielsweise der Verlust der CDKi- und Retinoblastom-Protein-Expression (Rb-Expression) sowie Überexpressionen von Cyclinen (insbesondere D1 und E1) und CDKs (vor allem CDK4 und CDK6)⁵⁰.

Auch beim CRC konnte die Überexpression von CDKs nachgewiesen werden. So zeigten einige Studien, dass diese beispielsweise mit einer Resistenzentwicklung gegen 5-FU

(CDK1), Rb-Hyperphosphorylierung (CDK2/4/6), Tumorzellproliferation (CDK4/6), Metastasenabsiedlung sowie EMT-Induktion (CDK3) und Abbau des Zellzyklusinhibitors p21 (CDK5) einhergehen^{51–55}.

Aus diesem Grund wurden CDKs in den letzten Jahren zunehmend als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt für Patienten mit verschiedensten Tumorentitäten untersucht. Mehrere Substanzen befinden sich derzeit noch in der präklinischen Testung, doch für einige CDKis existieren mittlerweile Zulassungen von der FDA bzw. EMA, sodass diese bereits in der Klinik eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden drei verschiedene CDKis verwendet: Dinaciclib, Abemaciclib und THZ-1.

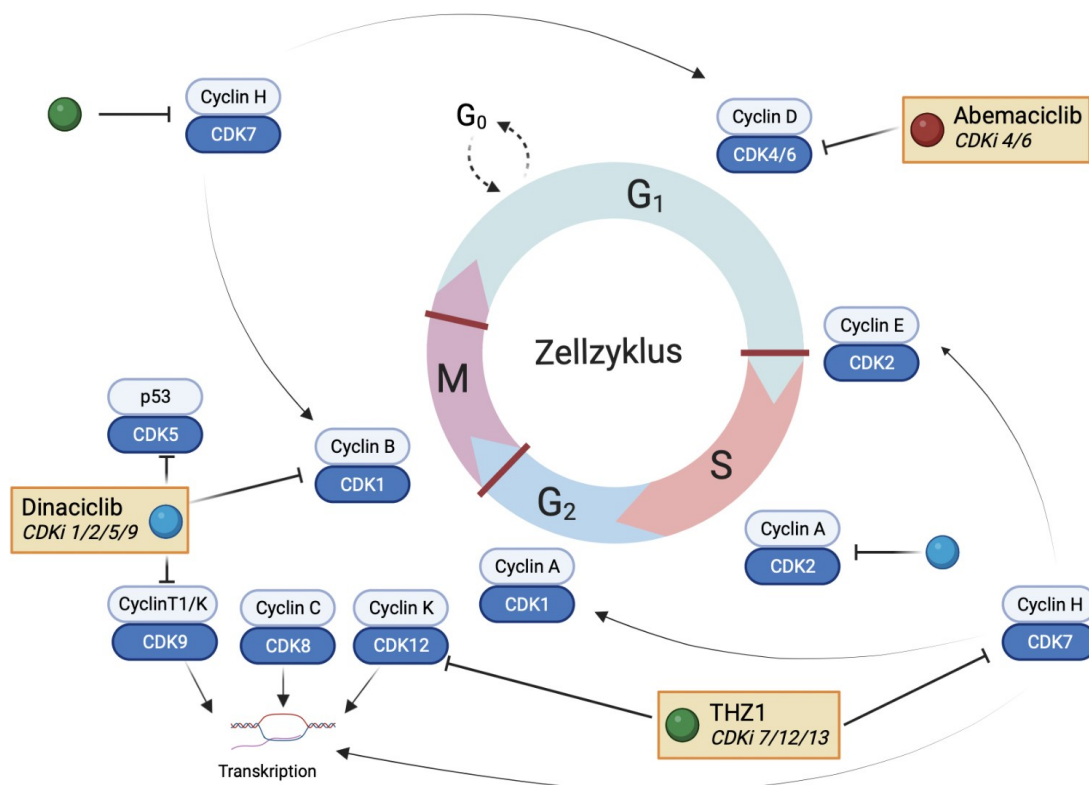


ABBILDUNG 6: DARSTELLUNG DER VERWENDETEN CDK-INHIBITOREN, SOWIE DEREN MOLEKULARE ANGRIFFSPUNKTE INNERHALB DES ZELLYKLUSS, NACH RIESS ET AL⁵⁶

Dinaciclib ist ein globaler CDK-Inhibitor, der gegen die CDKs 1, 2, 5, 9 und 12 gerichtet ist^{57,58}. Durch die multiplen Ansatzpunkte wirkt Dinaciclib über mehrere Mechanismen. Besonders relevant ist die Zellzyklusinhibition über die kombinierte Hemmung von CDK1 und 2 sowie die Auswirkungen auf die Expression von MCL1, ein anti-apoptotisches Protein^{59–61}. Insbesondere bei hämatologischen Neoplasien zeigte Dinaciclib in verschiedenen Studien, darunter auch eine Phase-III-Studie, seine klinische Wirksamkeit (*Clinicaltrials.gov identifier NCT01096342, NCT01580228*). Auch bei Patienten mit fortgeschrittenem Mammakarzinom bzw. nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom wurde die Wirkung von Dinaciclib untersucht,

konnte aber in beiden Fällen als Monotherapie keine Überlegenheit gegenüber bereits etablierten Therapieoptionen zeigen^{62,63}.

Abemaciclib ist ein selektiver CDK4/6-Inhibitor, zeigt jedoch eine größere Selektivität gegenüber CDK4. Durch die Inhibition von CDK4 und 6 wird die Rb-Phosphorylierung unterbunden. Dies führt zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und hemmt die Zellproliferation^{64,65}. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Abemaciclib auch in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und wirksame Konzentrationen innerhalb des ZNS zu erzielen, was es auch zu einer potentiell interessanten Substanz hinsichtlich der Behandlung von Hirntumoren sowie ZNS-Metastasen macht⁶⁶. Abemaciclib ist unter den hier verwendeten Substanzen der einzige CDKi, der bereits in Europa zugelassen ist. Zunächst erfolgte die Zulassung nur bei Frauen mit Hormonrezeptor (HR)-positiven, humanem epidermalem Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER2)-negativem lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Brustkrebs. Im Jahre 2022 wurde aufgrund der Ergebnisse der Phase-III-Studie monarchE (NCT03155997) die Zulassung auf die adjuvante Behandlung von Patienten im frühen Stadium mit HR+, HER2-, nodal-positivem Brustkrebs und hohem Rezidivrisiko ausgeweitet⁶⁷. Auch die Wirkung bei anderen Tumorentitäten wird derzeit in einer Vielzahl von Studien überprüft, darunter auch eine Phase-I sowie eine Phase-Ib/II Studie zum CRC (*Clinicaltrials.gov identifier NCT02857270, NCT04616183*). Trilaciclib, ein weiterer CDK4/6-Inhibitor, wird derzeit sogar in einer Phase-III Studie an Patienten mit metastasiertem CRC unter FOLFOXIRI/Bevacizumab-Therapie getestet (*Clinicaltrials.gov identifier NCT04607668*).

THZ1 hingegen ist ein selektiver CDK7 Inhibitor, der in höheren Dosen auch CDK12 und 13 hemmen kann. Vielversprechend an dieser Substanz ist vor allem, dass es im präklinischen Setting trotz effektiver antiproliferativer Wirkung auf verschiedene Karzinomzelllinien nur ein geringes Toxizitätsprofil aufzeigte⁶⁸. Auch bei CRC-Zellen verringert THZ1 die Zellproliferation, verhindert jedoch nicht die Metastasierung. Molekular beruht dies auf einer vermehrten Snail-Expression und damit Förderung von epithelialer mesenchymaler Transition⁶⁹. Mehrere selektive CDK7-Inhibitoren werden derzeit in klinischen Studien untersucht, darunter auch SY-1365, ein von THZ1 abgeleiteter und verbesserter CDK7-Inhibitor (NCT03134638)⁷⁰.

Insgesamt stellt der Einsatz von CDKis einen vielversprechenden und innovativen Ansatz in der Therapie von Tumorpatienten dar, der innerhalb der nächsten Jahre zunehmend an Bedeutung gewinnen könnte.

1.4 VORARBEITEN DER ARBEITSGRUPPE ZUR TISSUE FACTOR EXPRESSION BEIM KOLOREKTALLEN KARZINOM

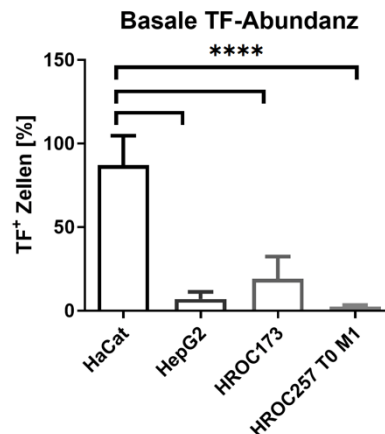


ABBILDUNG 7: VERGLEICH DER BASALEN TF-ABUNDANZ VON VERSCHIEDENEN ZELLINIEN

Die Ergebnisse zeigen Daten aus drei unabhängigen Experimenten. **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test).

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde erstmals die TF-Abundanz von CRC-Zellen im Vergleich zu humanen Keratinozyten (HaCat) und hepatozellulären Karzinomzellen (HepG2) erfasst. Hierzu wurden zwei verschiedene von Patienten-abgeleitete CRC-Zelllinien (HROC173 und HROC257 T0 M1) betrachtet. Die beiden CRC-Zelllinien wurden aus sporadischen CRCs mit chromosomaler Instabilität (=HROC173, $KRAS^{mut}$) oder Mikrosatelliteninstabilität (=HROC257 T0 M1, $KRAS^{wt}$) etabliert und stellen damit die beiden wichtigsten molekularen Subtypen dieser Krankheit dar. Es zeigte sich, dass die TF-Abundanz deutlich geringer ist als auf Keratinozyten, jedoch vergleichbar mit anderen Tumorzellen (HepG2) (siehe Abbildung 7)

Ergänzend wurde die Gerinnungsfähigkeit in Normalplasma und FXII-defizienten Plasma untersucht (siehe Abbildung 8). Der Einsatz von FXII-defizientem Plasma ermöglicht eine separate Betrachtung des extrinsischen Gerinnungsweges, da über das Fehlen von FXII die intrinsische Kaskade nicht ablaufen kann. Hierbei wurden für beide HROC-Zelllinien tendenziell längere Gerinnungszeiten, verglichen mit den HaCat- und den HepG2-Zellen (HROC257 T0 M1 > HROC173), festgestellt. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch bei den Versuchen mit FXII-defizientem Plasma, sodass der intrinsischen Kaskade unter basalen (= unbehandelten) Bedingungen eine eher untergeordnete Rolle zuzukommen scheint. Insgesamt zeigte die HROC173-Zelllinie einen etwas stärker ausgeprägten prokoagulantem Phänotyp als die HROC257 T0 M1-Zelllinie.

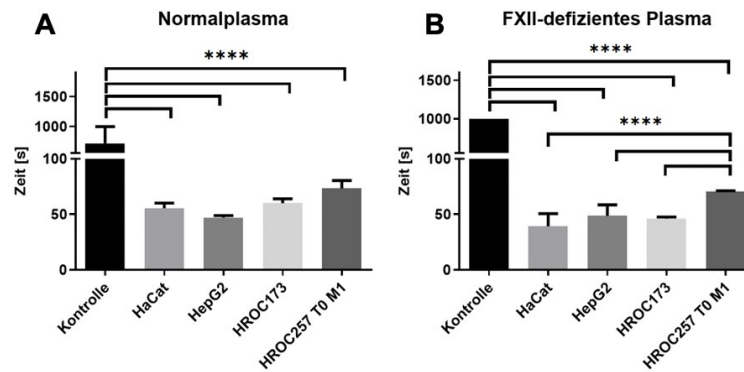


ABBILDUNG 8: VERGLEICH DER GERINNUNGSZEITEN VON VERSCHIEDENEN ZELLINIEN, UNTERSUCHT MIT NORMALPLASMA UND FXII-DEFIZIENTEN PLASMA

Dargestellt sind die gemessenen Gerinnungszeiten mit (A) Normalplasma und (B) F12-defizienten Plasma. Alle Messungen erfolgten in einer Dreifachbestimmung und wurden 2–3-mal wiederholt. Zu sehen sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichungen. **** $p < 0.0001$; one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test).

Im Anschluss wurden die beiden CRC-Zelllinien (HROC173 und HROC257 T0 M1) mit subtherapeutischen Dosen der zytostatischen Substanzen 5-FU ($1 \mu\text{M}$) und Gemcitabin (Gem) ($0,15 \mu\text{M}$) über 48 oder 72 Stunden behandelt. Ziel war es einen möglichen Einfluss von zytostatischen Kurzzeitbehandlungen auf die TF-Expression zu untersuchen. In beiden Zelllinien konnte zeitabhängig eine signifikante TF-Hochregulierung festgestellt werden, die nicht auf eine direkte Chemotherapie-induzierte Zytotoxizität zurückzuführen war (siehe 4.2). Auch hier waren zelllinienspezifische Unterschiede zu verzeichnen. Gem führte bei beiden Zelllinien und beiden Behandlungsintervallen zu einer deutlichen Zunahme der TF⁺-Zellen.

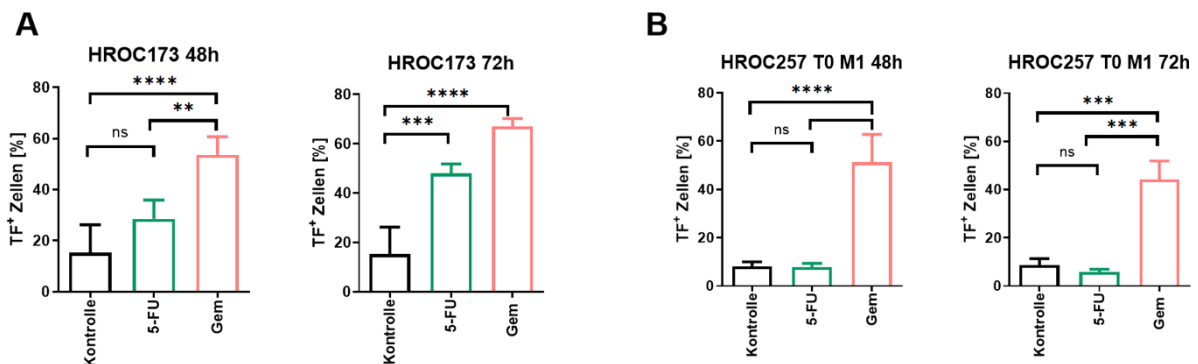


ABBILDUNG 9: EINFLUSS VON KURZZEITBEHANDLUNGEN MIT 5-FU UND GEM AUF DIE TF-ABUNDANZ DER KOLOREKTALEN KARZINOMZELLINIEN HROC173 UND HROC257 T0 M1

(A, B) Die Tumorzellen wurden 48 oder 72 Stunden lang mit $1 \mu\text{M}$ 5-FU oder $0,15 \mu\text{M}$ Gemcitabin (Gem) behandelt. Im Anschluss wurden die Tumorzellen geerntet, mit einem FITC-markierten Anti-TF-Antikörper angefärbt und die Anzahl der positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dargestellt ist die Anzahl der positiven Zellen \pm SD, die sich aus 20.000 Ereignissen ergibt. Die Ergebnisse zeigen Daten von drei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test).

Demgegenüber konnte unter 5-FU Behandlung nur bei der HROC173-Linie eine TF-Hochregulation detektiert werden. Generell ließ sich bei den HROC173 Zellen eine stärkere Hochregulierung von TF, sowohl nach 5-FU- als auch nach Gem-Behandlung nachweisen.

In Zusammenschau der Daten zeigt sich, dass die TF-Abundanz ein sehr individueller Parameter ist, der zwischen verschiedenen Tumorzelllinien erheblich variiert. Subtherapeutische Dosen zytostatischer Substanzen waren zum Teil in der Lage hochsignifikante TF-Hochregulationen hervorzurufen. Trotz der Kenntnis, dass TF bei vielen Krebserkrankungen deutlich überexprimiert wird, ist der Einfluss von zytostatischen und zielgerichteten Substanzen auf die TF-Abundanz kaum untersucht. Aus diesem Grund bedarf es präklinischer Forschungsansätze, um diese Sachverhalte und die Mechanismen dahinter genauer zu untersuchen. Nur so ist es möglich, die Relevanz des TF bei der Entstehung thromboembolischer Ereignisse und auch seine Bedeutung außerhalb der hämostatischen Funktion besser zu verstehen.

II. ZIELSETZUNG

Eine Überexpression von TF ist charakteristisch für Tumoren. Immer noch wenig Kenntnisse gibt es jedoch darüber, welchen direkten Effekt der Einsatz zytostatischer und zielgerichteter Therapien auf die TF-Abundanz und die Gerinnung hat.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu einem besseren Verständnis der Therapie-assoziierten Hochregulation von TF auf Tumorzellen beizutragen. Aus dieser Motivation heraus wurde anhand kolorektaler Karzinomzellen (HROC173) untersucht, welche Auswirkungen Kurzzeittherapien mit zytostatischen Substanzen auf die TF-Abundanz und die prokoagulante Aktivität der Zellen haben. Auch der Einsatz von zielgerichteten Therapien hält immer mehr Einzug in die moderne Tumorthherapie. Aus diesem Grund wurden neben klassischen zytostatischen Substanzen auch drei verschiedene CDK-Inhibitoren in die Untersuchungen eingeschlossen.

Aufgrund der Assoziation zwischen TF und EMT sollte zudem ein möglicher Einfluss von Kurzzeitbehandlungen auf gängige EMT-Marker betrachtet werden.

Mit zunehmendem Wissen über die verschiedenen Faktoren, die eine Rolle bei der TF-Überexpression spielen, können zukünftig bessere Ansätze zur Thromboseprophylaxe entwickelt werden. Darüber hinaus werden auch multiple prokarzinogene Effekte mit TF in Verbindung gebracht. Diese Eigenschaften bestätigen die Relevanz von TF nicht nur bei der Entstehung thromboembolischer Ereignisse, sondern auch bei der Entwicklung neuer innovativer Therapiestrategien, um TF gezielt zu hemmen.

Letztlich sollen mit dieser Arbeit neue Erkenntnisse zum Einfluss von zytostatischen und zielgerichteten Therapien auf den TF und die damit zusammenhängenden Gerinnungseigenschaften der Zellen erzielt und potenzielle neue Therapiestrategien diskutiert werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIAL

3.1.1 ZELLINIEN

In den durchgeführten Versuchen wurde die kolorektale Karzinomzelllinie HROC173 (Cell line services, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

3.1.2 LABORGERÄTE

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE LABORGERÄTE

| <i>Laborgerät</i> | <i>Hersteller</i> | <i>Hauptsitz</i> |
|---|-------------------------------|---------------------------------------|
| Accu-Jet™ pro | Brand | Wertheim, Deutschland |
| Brutschrank | Heraeus instruments | Hanau, Deutschland |
| Brutschrank CB 170 | Binder | Tuttlingen, Deutschland |
| Cytek™ Aurora | Cytek | Fremont, USA |
| FACSCalibur | BD Biosciences | New Jersey, USA |
| Flockeneisbereiter AF 80 | Scotsman | Mailand, Italien |
| Freezing Container, Nalgene™ Mr. Frosty™ | ThermoFisher Scientific | Waltham, USA |
| Gefrierschrank -80°C | Liebherr Deutschland | Bulle, Schweiz |
| Invitrogen™ EVOS™ XL Core Imaging System | ThermoFisher Scientific | Waltham, USA |
| Koagulometer | MC Plus | MERLINmedical (Lemgo, Deutschland) |
| Kühlschrank 4°C / Gefrierschrank -20°C | Liebherr | Bulle, Schweiz |
| Kühlschrank Siemens | Siemens | München, Deutschland |
| Laser-Scanning Mikroskop LSM 780 | Carl Zeiss Microscopy GmbH | Jena, Deutschland |
| Lichtmikroskop Eclipse™ TE200 | Nikon | Tokio, Japan |

| | | |
|--|--------------------------------------|-----------------------------------|
| Neubauer Zählkammer | Marienfeld | Lauda Königshofen, Deutschland |
| Pipetboy | Integra Biosciences | Biebertal, Deutschland |
| Pipetten (2,5 µl; 10 µl; 100 µl; 200 µl; 1000 µl) | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Reax top™ Vortex- Gerät | Heidolph | Schwabach, Deutschland |
| Stickstofflagerbehälter Apollo™ | Cryotherm GmbH | Kirchen, Deutschland |
| Transport-Dewargefäß Typ B | KGW Isotherm | Karlsruhe, Deutschland |
| Vakuumpumpe Vacusafe | Integra Biosciences, | Biebertal, Deutschland |
| Wasserbad | Gesellschaft für Labortechnik mbH | Burgwedel, Deutschland |
| Werkbank Herasafe™ | ThermoFisher Scientific | Waltham, USA |
| Zentrifuge Rotina 35R | Hettich | Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge Rotina 38R | Hettich | Tuttlingen, Deutschland |
| Zentrifuge Rotina 420 | Hettich | Tuttlingen, Deutschland |

3.1.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN

| <i>Verbrauchsmaterialien</i> | <i>Hersteller</i> | <i>Hauptsitz</i> |
|---|--------------------------|-----------------------------|
| Alu-Folie 20 µm Stärke | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Cell Strainer, 40 µm Nylon | Falcon | Durham, USA |
| CellStar 24-Well Multiwell- Platten, Polystyrol | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| CellStar 6-Well Multiwell- Platten, Polystyrol | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| CellStar 96-Well Multiwell- Platten, F-Boden, Polystyrol | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Citrat-Röhrchen | Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |

| | | |
|---|-------------------------|-----------------------------|
| Combitips advanced, unsteril (2 ml; 5 ml; 10 ml) | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Deckgläser (24 x 32 mm) | iDL | Nidderau, Deutschland |
| Multipette M4 | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Nunc™ 96-Well Polystyrene Conical Bottom MicroWell™ Plates | ThermoFisher Scientific | Waltham, USA |
| Nunc™ CryoTube Vials | ThermoFisher Scientific | Waltham, USA |
| Peha-soft nitrile fino puderfrei Handschuh, unsteril | Paul Hartmann AG | Heidenheim, Deutschland |
| Pipettenspitzen | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Polypropylen (PP) Röhrchen, steril, 15 ml | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Polypropylen (PP) Röhrchen, steril, 50 ml | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Probenröhren 75 x 12 mm, 5 ml | Sarstedt | Nümbrecht, Deutschland |
| Reaktionsgefäße, safe-lock (0,5ml, 1,5ml, 2ml) | Eppendorf | Hamburg, Deutschland |
| Serologische Pipetten, 25 ml | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Serologische Pipetten, 10 ml | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Serologische Pipetten, 2 ml | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Serologische Pipetten, 5 ml | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| Zellkulturflaschen | Greiner Bio One | Kremsmünster, Österreich |
| µ-Slide 8 Well / 18-Well | ibidi GmbH | Martinsried, Deutschland |

3.1.4 CHEMIKALIEN

TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE CHEMIKALIEN

| Chemikalien | Hersteller | Hauptsitz |
|--|--------------------------|----------------------------|
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) | Biomol | Hamburg, Deutschland |
| 5-FU | VEZ Universität Rostock | Rostock, Deutschland |
| 96% Ethanol | Walter CMP | Kiel, Deutschland |
| Abemaciclib | Selleckchem | München, Deutschland |
| Aqua dest. | SGWater – Analge | Barsbüttel, Deutschland |
| Bacillol AF | Hartmann | Heidenheim, Deutschland |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | PAN-Biotech GmbH | Aidenbach, Deutschland |
| Calciumchlorid (CaCl₂) | Roth | Karlsruhe, Deutschland |
| Calcein AM | ThermoFisher Scientific | Waltham, USA |
| Dinaciclib | Selleckchem | München, Deutschland |
| DMEM/Ham's F12 (1:1) | Pan-Biotech | Aidenbach, Deutschland |
| DMSO (dimethyl sulfoxide) | AppliChem | Darmstadt, Deutschland |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,5 M in H₂O | Sigma-Aldrich | St. Louis, USA |
| Fetales Kälberserum (FKS) | Pan-Biotech | Aidenbach, Deutschland |
| L-Glutamin 200 mM | Pan-Biotech | Aidenbach, Deutschland |
| Paraformaldehyd (PFA) 16 % w/o Methanol | Thermo Fisher Scientific | Waltham, USA |
| Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml | Biochrom GmbH | Berlin, Deutschland |
| Phosphat buffered saline (PBS; pH 7,4) | Pan-Biotech | Aidenbach, Deutschland |

| | | |
|--|---------------|-----------------------------|
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Serva | Heidelberg, Deutschland |
| THZ1 | Hycultec | Beutelsbach, Deutschland |
| Trypsin 0,05% / EDTA 0,02% in PBS | Pan-Biotech | Aidenbach, Deutschland |
| Triton-X-100 | Sigma-Aldrich | St. Louis, USA |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich | St. Louis, USA |

3.1.5 THERAPEUTIKA

TABELLE 4: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE THERAPEUTIKA

| Chemikalien | Stockkonzentration | Hersteller |
|-----------------------|---------------------------|---|
| 5-Fluorouracil | 384 mM | VEZ Universität Rostock, Deutschland |
| Abemaciclib | 10 mM | Selleckchem, München, Deutschland |
| Dinaciclib | 10 mM | Selleckchem, München, Deutschland |
| THZ-1 | 10 mM | Hycultec, Beutelsbach, Deutschland |

3.1.6 ANTIKÖRPER

TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE ANTIKÖRPER

| Antikörper | Konjugat | Spezifität | Klon | Hersteller |
|----------------------|--------------------|-------------------|-------------|--|
| anti-CalR | Alexa Fluor 405 | human | 681233 | R&D systems, Minne- apolis, USA |
| Sekundärer AK | Alexa Fluor 488 | rabbit | | ThermoFisher Scien- tific, Waltham, USA |
| anti-GLUT1 | Alexa Fluor 647 | human | 202915 | BD, Franklin Lakes, USA |
| anti-GLUT4 | Alexa Fluor 700 | human | | R&D systems, Minneapolis, USA |
| anti-CD142 | PE | human | NY2 | BioLegend, San Diego, USA |

| | | | | |
|----------------------------------|--------------------|-------|----------|---------------------------------------|
| anti-Claudin-7 | unconjugated | human | | Invitrogen, Waltham, USA |
| anti-E-Cadherin | unconjugated | human | | Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA |
| anti-SNAI2/Slug | PE | human | S43-1259 | BD, Franklin Lakes, USA |
| anti-CD274 (B7-H1, PD-L1) | PerCP / Cy-nine5.5 | human | 29E.2A3 | BioLegend, San Diego, USA |
| anti-CD324 (E-Cadherin) | APC-Vio 770 | human | 67A4 | Miltenyi Biotec |
| anti-CD325 (N-Cadherin) | PE / Cyanine7 | human | 8C11 | BioLegend, San Diego, USA |
| anti-CD326 (EpCAM) | FITC | human | 9C4 | BioLegend, San Diego, USA |
| anti-Vimentin | Vio B515 | human | REA409 | Miltenyi Biotec |

3.1.7 ZUSAMMENSETZUNG VON MEDIEN/LÖSUNGEN

TABELLE 6: ÜBERSICHT ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG VERWENDETER MEDIEN / LÖSUNGEN

| Produkt | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|--|
| 0,5 % Triton-X-100 | 0,5 ml in 100 ml 1x PBS |
| 2% BSA in PBS | 2 g BSA in 100 ml PBS |
| 2 % PFA/PBS aus 16 %igen PFA | 1 ml in 7 ml 1x PBS |
| 70% Ethanol | 36 ml Ethanol (96%) 15 ml Aqua dest. |
| Antibody Blocking Solution | 1x PBS 1% BSA 0,5% Triton X-100 |
| Freezing Medium | 45 ml FKS (90% final) 5 ml DMSO (10% final) |
| PBS | 80 g NaCl 2 g KCl 18 g Na ₂ HPO ₄ 2x H ₂ O |

| | |
|-----------------------------------|--|
| | 2 g K ₂ HPO ₄ ad 1000 ml Aqua dest. |
| Standardmedium | 500 ml DMEM/Ham's F12 (1:1) 50 ml FKS (final 10%) 6 - 8 ml L-Glutamin (final: 20 mM) 1 % Penicillin-Streptomycin |
| Trypanblau-Lösung (pH 7,4) | 0,16% (W/V) Trypanblau 150 nM NaCl |
| Vollmedium | 400 ml DMEM/Ham's F12 (1:1) 100 ml FKS (final 20%) 6 - 8 ml L-Glutamin (final: 20 mM) 1 % Penicillin-Streptomycin |

3.1.8 SOFTWARE

Für die Anfertigung dieser wissenschaftlichen Arbeit sowie zur Erstellung des Abbildungs- und Tabellenverzeichnisses wurde Microsoft Office Word™ 2021 verwendet. Das Literaturverzeichnis wurde mit der Software Zotero, Version 6.0.13 erstellt. Mittels GraphPad™ Prism Version 8.0.2 erfolgte die Erstellung von Graphen sowie die Durchführung sämtlicher statistischer Analysen. Die durchflusszytometrischen Daten wurden mit CellQuest Pro 4.0.2 (FACSCalibur™) bzw. SpectroFlow™ Version 2.2.0.3 (Cytek™ Aurora) und Flow Jo 8.0.1. ausgewertet. Über ImageJ Version 1.53 wurde die Integrated Density der immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dargestellt. Illustrationen wurden zum Teil über www.biorender.com erstellt. Weiterhin fand für die Literaturrecherche folgende Internet-Ressource Verwendung: Pubmed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.2 METHODEN

3.2.1 ZELLKULTUR

3.2.1.1 ZELLKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei konstanter Temperatur von 37° C und stabiler CO₂-Sättigung von 5% unter sterilen Bedingungen im Brutschrank. Als Standardzellkulturmedium wurde DMEM/Hams F12 mit 3 mM Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 10 % FKS verwendet (Standardmedium). Zum Sorting von TF⁺-Zellen wurde DMEM/Hams F12 Medium mit 20 % FKS-Anteil (Vollmedium) eingesetzt.

3.2.1.2 ERNTEN/PASSAGIEREN DER ZELLEN

Zunächst erfolgte stets eine visuelle Kontrolle der Zellen mittels Lichtmikroskopie, um eine ausreichende Konfluenz sicherzustellen. Zur Zellernte wurden das Zellkulturmedium abgesaugt, die Flasche mit 5 ml PBS gespült und mit Trypsin-/Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 10-15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Medium abgestoppt. Der Zellboden wurde mehrmals mit Medium gespült und die Zellsuspension daraufhin in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt und die Zellen entweder für nachfolgende Versuche ausgesät oder passagiert. Zuletzt wurden immer mindestens 3 ml der Zellsuspension zurück in die Zellkulturflasche überführt und entsprechend der Flaschengröße mit Standardmedium auf 10 ml (T75) bzw. 20 ml (T175) aufgefüllt.

3.2.1.3 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Für die Zellzahlbestimmung wurden 50 µl Zellsuspension entnommen und in eine unsterile 96-well Platte gegeben. Nach Zugabe von weiteren 50 µl Trypanblau wurden 10 µl Suspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Am Mikroskop wurden entweder zwei gegenüberliegende oder alle vier Großquadrate der Zählkammer mäanderförmig ausgezählt. Vitale Zellen wurden durch Ausschluss von Trypanblau detektiert. Schließlich wurde anhand folgender Gleichung die Zellzahl pro ml bestimmt:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der gezählten lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnung}(2) \times \text{Kammerfaktor}(10^4)$$

3.2.1.4 ZELLAUSSAAT

Für die Zellaussaat wurde zunächst das benötigte Gesamtvolumen mit der gewünschten Zellzahl/ml in einem geeigneten PP-Röhrchen angesetzt. Das dafür nötige Volumen der Zellsuspension sowie die benötigte Menge des Standardmediums konnten mithilfe der folgenden Rechnung ermittelt werden:

$$\frac{\text{gewünschte Zellzahl/ml}}{\text{errechnete Zellzahl/ml}} \times \text{Gesamtvolumen} = \text{einzusetzende Zellsuspensionsmenge}$$

$$\text{Gesamtvolumen} - \text{einzusetzende Zellsuspensionsmenge} = \text{Menge des Standardmediums}$$

Das benötigte Gesamtvolumen, das sich auch aus der einzusetzenden Zellsuspensionsmenge und der benötigten Menge des Standardmediums ergab, wurde schließlich in einem passenden PP-Röhrchen vorgelegt und für die Aussaat verwendet. Die nachfolgende Tabelle verschafft einen Überblick über die eingesetzten Zellvolumina sowie Plattenformate.

TABELLE 7: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE ZELLVOLUMINA UND PLATTENFORMATE IN DEN DURCHFÜHRTEN VERSUCHEN

| Versuch | Zellzahl [Zellen/ml] | Plattenformat |
|------------------------|----------------------|-----------------|
| Durchflusszytometrie | 1 x 10 ⁵ | 6-Well |
| Wound Healing Assay | 1 x 10 ⁵ | 6-Well |
| Clotting-Assay | 1 x 10 ⁵ | 6- und 12-Well |
| Immunfluoreszenz | | |
| - Claudin-7/E-Cadherin | 1 x 10 ⁴ | 18-Well µ-Slide |
| - N-Cadherin | 1 x 10 ⁴ | 18-Well µ-Slide |
| - TF/EpCam | 1 x 10 ⁴ | 18-Well µ-Slide |

3.2.1.5 BEHANDLUNG DER ZELLEN

An die Aussaat der Zellen, die nach dem im Punkt 3.2.1.4 beschriebenen Schema erfolgte, schloss sich eine 24-stündige Inkubation der Zellen an, um ausreichend Adhäsionszeit zu gewährleisten. Die Behandlung erfolgte danach als Monotherapie, sequenzielle oder simultane Kombinationstherapie. In den beiden nachfolgenden Tabellen findet sich eine Übersicht über die eingesetzten Therapeutika sowie Zielkonzentrationen und Behandlungszyklen.

TABELLE 8: ÜBERSICHT ÜBER EINGESETZTE SUBSTANZEN UND ABLAUF DER MONOTHERAPIE

| Therapeutikum | Zielkonzentration in µM | Behandlungszyklus |
|------------------|-------------------------|-------------------|
| 5-FU | 1,00 | 48 h |
| Gemcitabin (Gem) | 0,0012 | 48 h |
| Dinaciclib | 0,01 | 48 h |
| Abemaciclib | 1,00 | 48 h |
| THZ-1 | 0,03 | 48 h |

TABELLE 9: ÜBERSICHT ÜBER EINGESETZTE SUBSTANZEN UND ABLAUF DER KOMBINATIONSTHERAPIEN

| Therapeutikum | Zielkonzentration in µM | Behandlungszyklus |
|--|-------------------------|--------------------------|
| Sequenzielle Kombinationstherapie | | |
| - 5-FU | 1,00 | 1. 48 h |
| - Dinaciclib | 0,01 | 2. 48 h |
| | | <i>Gesamtdauer: 96 h</i> |
| - 5-FU | 1,00 | 1. 48 h |
| - Abemaciclib | 1,00 | 2. 48 h |
| | | <i>Gesamtdauer: 96 h</i> |
| - 5-FU | 1,00 | 1. 48 h |

| | | |
|---------------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| - THZ-1 | 0,03 | 2. 48 h <i>Gesamtdauer: 96 h</i> |
| Simultane Kombinationstherapie | | |
| - 5-FU/Dinaciclib | 1,00/0,01 | 1. 48 h <i>Gesamtdauer: 48 h</i> |
| - 5-FU/Abemaciclib | 1,00/1,00 | 1. 48 h <i>Gesamtdauer: 48 h</i> |
| - 5-FU/THZ-1 | 1,00/0,03 | 1. 48 h <i>Gesamtdauer: 48 h</i> |

3.2.1.6 KRYOKONSERVIERUNG UND REKULTIVIERUNG

Für die Langzeitasservierung wurden die Zellen zunächst unter sterilen Bedingungen geerntet und gezählt. Danach wurde ein definiertes Volumen mit der gewünschten Zellzahl zentrifugiert, das überschüssige Medium abgesaugt und das entstandene Pellet in einem zuvor angesetzten Freezing-Medium (90% FKS + 10% DMSO) aufgenommen. Im Anschluss daran wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension in ein Kryo-Tube überführt und diese mittels eines Freezing-Containers bei -80°C gelagert. Hierdurch wurde eine ideale Kühlungsgeschwindigkeit von -1°C pro Minute für die Konservierung der Zellen erreicht. Die dauerhafte Lagerung erfolgte schließlich bei -190°C im Flüssigstickstoff.

Für die Rekultivierung der Zellen wurden die Kryo-Tubes bei Raumtemperatur langsam aufgetaut. Der Inhalt wurde unter sterilen Bedingungen in ein 10 ml PP-Röhrchen überführt, in dem bereits 5 ml Standardmedium vorgelegt worden waren. Hiernach erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 300xg für 5 Minuten. Das überschüssige Medium wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml Standardmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine T75-Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank kultiviert.

3.2.2 SORTING VON TF⁺-ZELLEN

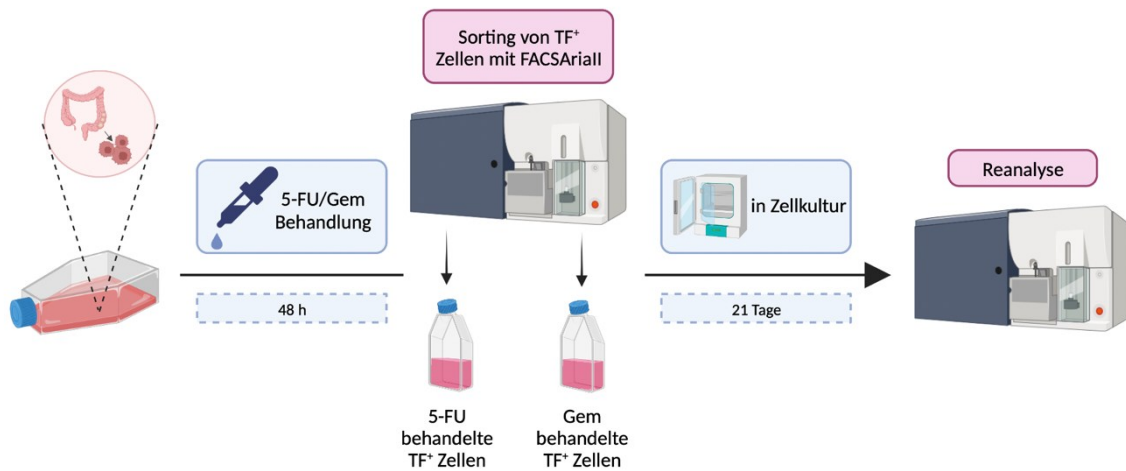


ABBILDUNG 10: DARSTELLUNG DES SORTINGVORGANGS TF⁺-ZELLEN

Die Zellen wurden über 48 h mit 5-FU oder Gemcitabin behandelt. Anschließend wurde nach TF⁺-Zellen gesortet. Die gesorteten Zellen befanden sich über 21 Tage in Rekultur. Nach dieser Zeit wurde mittels Durchflusszytometrie eine Reanalyse durchgeführt, um eine stabile Hochregulation des TF zu verifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die durchgeführten Untersuchungen nicht nur an den basalen Zellen der HROC173-Zelllinie, sondern auch gezielt an TF⁺-gesorteten Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurden zunächst die parentalen Zellen der Linie HROC173 geerntet. Anschließend wurde ein definiertes Volumen von $1,5 \cdot 10^7$ Zellen / 20 ml Standardmedium in eine T175 Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden Adhäsionszeit erfolgte die Behandlung mit 1,2 nM Gem bzw. 1 μ M 5-FU in Standardmedium über 48 Stunden. Im Anschluss an die Behandlungszeit wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen für die Sortierung vorbereitet. Hierbei wurde zunächst das Medium abgenommen, die Zellen geerntet und in ein 10 ml PP-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 300xg für 5 Minuten wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 10 ml 1xPBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt, das Pellet in 1 ml 1xPBS aufgenommen und in ein FACS-Röhrchen überführt. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 50 μ l anti-CD142 Antikörper und anschließend die Inkubation über 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit Zugabe von 500 μ l 1xPBS abgestoppt und Zellen erneut zentrifugiert (5 min, 300xg). Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1 ml FACS-Puffer, bestehend aus 1xPBS + 2% FKS + 2mM EDTA, aufgenommen. Anschließend erfolgte das Sorting nach TF-positiven Zellen (wobei das Gate auf die oberen 20% gesetzt wurde) mit dem FACS Aria II. Das Sorting erfolgte in 15 ml PP-Röhrchen, in denen bereits 2 ml Vollmedium (20%ig) vorgelegt worden waren. Direkt im Anschluss wurden die Zellen in eine 6-Well Platte überführt und über 21 Tage kultiviert. Schließlich erfolgte nach 21 Tagen die Reanalyse der Zellen, um

die Positivität der Zellen für TF erneut zu verifizieren. Erst im Nachhinein wurden die Zellen für die beschriebenen Experimente verwendet.

3.2.3 WOUND HEALING ASSAY

Der Wound Healing Assay stellt eine einfache und etablierte Methode zur in vitro Untersuchung der Zellmigration dar. Zur Durchführung wurden die Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu 100 % Konfluenz kultiviert. Mit einer 20- μ l-Pipettenspitze wurde auf den Monolayer-Zellen ein „Scratch“ gesetzt, um eine Wunde zu erzeugen. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen, wie in Punkt 3.2.1.5 beschrieben, und die Dokumentation der Wundränder mit einem inversen Zeiss-Mikroskop bei 20-facher Vergrößerung. Die Bilder wurden täglich über einen Zeitraum von 48 Stunden mit einem $\times 10$ Objektiv aufgenommen.

3.2.4 CLOTTING-ASSAY

Der durchgeführte Clotting-Assay basierte auf der Messung der Prothrombinzeit, die ein Maß für den extrinsischen Teil der plasmatischen Gerinnung darstellt. Durch Messung der Clotting-Zeit von Zellsuspensionen der HROC173 Zellen konnte der Einfluss von verschiedenen Behandlungen auf die Gerinnungszeit evaluiert und im Zusammenhang mit der TF-Expression betrachtet werden.

3.2.4.1 VORBEREITUNGEN

Vor Durchführung des Clotting-Assays musste zunächst plättchenarmes Plasma gewonnen werden. Hierfür wurden immer mindestens fünf verschiedenen Spendern 2-3 Citrat-Röhrchen venöses Vollblut entnommen. Das in den Citrat-Röhrchen enthaltene Natriumcitrat inhibiert durch die Bindung der Calcium-Ionen im Blut die Gerinnung und ermöglicht so die anschließende Plasmagewinnung.

Die Röhrchen wurden direkt nach der Abnahme kurz geschwenkt und dann über 10 Minuten bei 2000 g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Plasmaanteil mittels Pipette vorsichtig in ein 50 ml PP-Röhrchen überführt und so das Plasma der verschiedenen Spender gepoolt. Zur besseren Aufbewahrung wurden jeweils 1 ml Aliquots des Plasmagemisch erstellt und dann bei -80°C gelagert.

3.2.4.2 HERSTELLUNG DER ZELLSUSPENSION

Im ersten Schritt erfolgte das Ernten der Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit. Hierfür wurde zunächst das überschüssige Medium verworfen und die Zellen mit 500 μl 1x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte das Ablösen der Zellen durch Zusatz von 250 μl Trypsin. Nach 5-10 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion mit Zugabe von 500 μl 1 x PBS abgestoppt und die Zellen in ein Eppendorfgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 350 g über 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen erneut mit 500 μl 1 x PBS gewaschen und wiederholt zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde verworfen und die Zellen anschließend in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Es erfolgte die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer und final die Einstellung auf 1×10^4 Zellen/ml in 1 x PBS.

3.2.4.3 DURCHFÜHRUNG

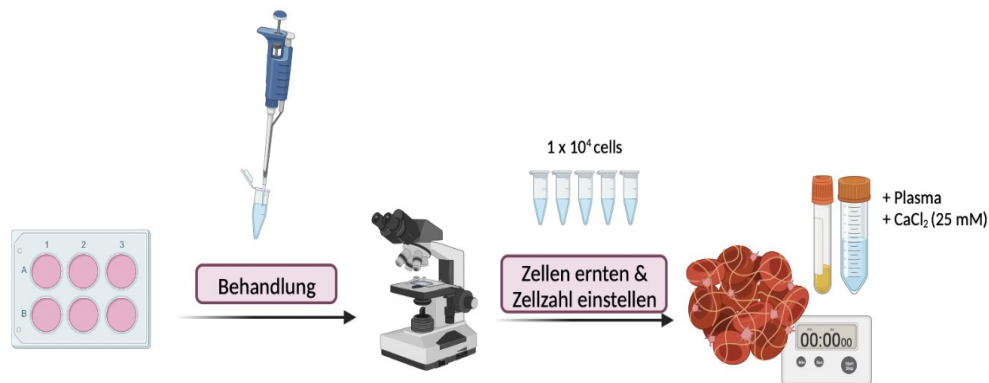


ABBILDUNG 11: ABLAUF DES CLOTTING-ASSAYS

Für die Durchführung des Clotting-Assay wurde zunächst die benötigte Menge Plasma bei Raumtemperatur aufgetaut und das Koagulometer zum Vorwärmen auf 37°C in Betrieb genommen. Nach Auswahl des entsprechenden Programms konnten die Messungen erfolgen. Hierfür wurden zunächst 100 μl Plasma in das Koagulometer gegeben und für 1 Minute inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 μl der Zellsuspension und eine erneute Inkubation. Im Anschluss daran wurden 100 μl CaCl_2 (25 mM) hinzugegeben, um die Gerinnung zu ermöglichen, und die Messung direkt nach Zugabe gestartet. Die Messungen erfolgten dabei für jede durchgeführte Behandlung in Triplets.

3.2.5 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNGEN

Die Durchflusszytometrie beschreibt eine Methode, in der mittels Lasertechnologie eine zielgerichtete Analyse von Zellen ermöglicht wird. Die zu untersuchenden Zellen befinden sich hierbei in einer Suspension und werden für die Messung mit hoher Geschwindigkeit durch eine

schmale Messkammer, auch Flusszelle genannt, geleitet. Dort werden die Zellen durch Laserbestrahlung auf ihre sichtbare Lichtstreuung und falls erforderlich auch auf Fluoreszenzparameter untersucht. Hinsichtlich der Lichtstreuung wird zwischen zwei verschiedenen Richtungen unterschieden: der Vorwärtsrichtung (*Forward Scatter*, FSC), mit welcher auf die relative Zellgröße geschlossen werden kann, und die im 90°-Winkel zum Laser gemessene Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, SSC), die Aussagen hinsichtlich der intrazellulären Granularität der Zelle ermöglicht. Die Fluoreszenzmessung erfolgt dabei unabhängig von der Lichtstreuung. Hierfür werden die Zellen in der Regel mittels Färbung durch Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzkonjugierte Antikörper vorbereitet⁷¹.

In der vorliegenden Arbeit wurde der BD FACSCalibur™ (Messung TF-Abundanz) und der Cytek™ Aurora (Nachweis von TF/PS und EMT-Markern) eingesetzt. Der BD FACSCalibur™ ist ein mit 2 Lasern ausgestattetes Gerät, blau (488 nm) und rot (633 nm), das zur durchflusszytometrischen Analyse von Zellen und Partikeln eingesetzt werden kann. Mittels dieser können bis zu 6 Parameter (FSC, SSC und bis zu vier Fluoreszenzfarbstoffe) simultan analysiert werden. Eine Aufnahme von maximal 20.000 Ereignissen pro Sekunde ist möglich. Als Akquisitions- und Analyse-Software wurde hierbei CellQuest Pro 4.0.2. verwendet⁷². Beim Cytek™ Aurora handelt es sich um ein spektrales Durchflusszytometer, das durch seine Ausstattung mit drei verschiedenen Lasern, blau (488 nm), violett (405 nm) und rot (640 nm), sogar die parallele Messung von bis zu 24 Fluoreszenzfarbstoffen über 41 Kanäle möglich macht. Auch Farbstoffe mit sehr ähnlichen Emissionsmaxima können miteinander kombiniert werden, da der Cytek™ Aurora sowohl das gesamte Spektrum eines fluoreszierenden Farbstoffs als auch seine spezifische Signatur erkennt. Insgesamt können hier mehr als 35.000 Ereignisse pro Sekunde aufgenommen werden. Der zugrunde liegende Messmechanismus basiert hierbei auf einem Vakuum-basierten Flüssigkeitssystem. Die Akquisition und Analyse der Daten erfolgte mittels der Software SpectroFlow™ Version 2.2.0.3⁷³.

3.2.5.1 TF-ABUNDANZ

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte das Ernten der Zellen. Hierfür wurde das überschüssige Medium abgesaugt, die Zellen mit 500 µl 1 x PBS gewaschen und das Ablösen der Zellen durch Zugabe von 250 µl Trypsin/EDTA initiiert. Nach 5-10 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 x PBS abgestoppt. Die Zellsuspensionen wurden mehrmals auf- und abpipettiert und schließlich in FACS-Tubes überführt. Sofern sich noch Zellüberstand in den Wells befand, wurde erneut mit 1 x PBS gespült und auch der verbliebene Inhalt in die entsprechenden FACS-Tubes gegeben. Hiernach erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 500 x g für 5 Minuten. Nach Verwerfung des Überstands wurden die

verbliebenen Pellets in 200 µl Färbelösung resuspendiert. Die hierbei verwendete Färbelösung setzte sich aus 1 x PBS, 2% BSA und 2 mM EDTA zusammen. Pro Probe wurden dabei 40 µl 1x PBS, 80 µl 2%iges BSA und 80 µl 2 mM EDTA verwendet. Jeweils 100 µl dieser Zellsuspension wurden in ein zweites FACS-Tube überführt. So erhielt man die für die spätere Messung benötigten 2 Färbeansätze pro Behandlung:

1. Ungefärbt (nur PBS)
2. Anti-TF Antikörper PE (1:100)

In die gefärbten Ansätze wurde nun zusätzlich 1 µl TF-Antikörper zur Zellsuspension gegeben, während für die ungefärbten Ansätze nur 1 x PBS verwendet wurde. Alle Proben wurden daraufhin gevortext und danach bei 4°C im Dunkeln für 30 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden in jedes FACS-Tube 300 µl 1 x PBS zum Abstoppen der Reaktion gegeben und erneut zentrifugiert (bei 500 x g für 5 Minuten). Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in 400 µl 1 x PBS resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Messung der Proben am FACSCalibur™.

3.2.5.2 KOABUNDANZ VON TF UND PS

Auch hier wurden nach der abgeschlossenen Inkubation die Zellen zunächst standardmäßig geerntet. Dafür wurde das Medium verworfen, mit 1 x PBS gewaschen und anschließend die Zellen durch Zugabe von je 250 µl Trypsin/EDTA abgelöst. Nach 5-10 Minuten im Brutschrank wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 x PBS abgestoppt. Die Zellsuspensionen wurden daraufhin in FACS-Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (300 x g über 5 Minuten) pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und die Pellets in je 200 µl einer Färbelösung resuspendiert. Die Färbelösung wurde dabei genauso angesetzt, wie schon im Punkt 3.2.5.1 beschrieben. 100 µl der Zellsuspensionen wurden dann jeweils in ein 2. FACS-Röhrchen überführt, sodass ein Ansatz gefärbt werden konnte und einer als ungefärbte Kontrolle verblieb. In die gefärbten Ansätze konnte anschließend der Anti-TF Antikörper im Verhältnis 1:200 und Apotracker im Verhältnis 1:400 zugegeben werden. Der Rest der Färbung erfolgte analog zum im vorherigen Punkt 3.2.5.1 beschriebenen Procedere. Die Messungen der Proben wurden hier am Cytex™ Aurora durchgeführt.

3.2.5.3 EMT-MARKER

Diese Färbung ermöglichte den Nachweis multipler EMT-Marker auf den Tumorzellen, darunter Calreticulin, N-Cadherin, E-Cadherin, PD-L2, Glut1, Glut4, Vimentin und SNAI2/Slug. Vor Beginn der Färbung musste zunächst der FACS Staining Buffer und das BD Transcription Factor Buffer Set angesetzt werden, wie hier aufgeführt:

1. FACS Staining Buffer:

- 2% BSA + 2 mM EDTA in PBS
- 8 ml 5 mM EDTA + 8 ml 5% BSA + 4 ml PBS (ggf. erfolgten Anpassungen an die Anzahl der Proben)

2. BD Transcription Factor Buffer Set:

- 1x Fix/Perm Working solution: 1 Teil 4x Fix/Perm Buffer + 3 Teile TF Diluent Buffer
- 1x Perm/Wash Buffer Working solution: 1 Teil 10x Perm/Wash Buffer + 9 Teile Wasser

Nach abgeschlossener Vorbereitung wurden die Zellen standardmäßig geerntet. Hierbei wurde zunächst das überschüssige Medium abgesaugt, die Zellen mit 500 µl 1 x PBS gewaschen und nach Zugabe von 250 µl Trypsin/EDTA für 5-10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 500 µl 1 x PBS abgestoppt und die Zellsuspensionen in FACS-Tubes überführt. Um Zellpellets zu erhalten, wurde bei 500 x g für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände verworfen. Danach erfolgte zunächst die extrazelluläre Färbung. Hierfür wurde im ersten Schritt ein Antikörper-Mix erstellt, indem die benötigten Antikörper, im entsprechenden Verdünnungsverhältnis, dem FACS Staining Buffer zugesetzt wurden. Gerechnet wurde dabei mit 100 µl Antikörper-Mix pro Probe. Eingesetzt wurden die folgenden Antikörper im angegebenen Verdünnungsverhältnis:

- Alexa Fluor 405 mouse anti-human CalR: 1:50
- PE/Cyanine7 mouse anti-human CD325 (N-Cadherin): 1:25
- APC-Vio 770 mouse anti-human CD324 (E-Cadherin): 1:15
- PerCP/Cyanine5.5 anti-human CD274 (PD-L1): 1:62,5

Nach Zugabe von jeweils 100 µl Antikörper-Mix folgte eine Inkubation der Proben bei Raumtemperatur über 20 Minuten. Durch Zugabe von 250 µl 1 x PBS wurde nach Ablauf der Inkubationszeit die Reaktion abgestoppt und bei 350 x g über 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Zellen erneut mit 250 µl 1 x PBS gewaschen, bei 350 x g über 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände entfernt.

Im nächsten Schritt erfolgte dann die intrazelluläre Färbung. Hierfür wurden zunächst je 500 µl 1x Fix/Perm Working solution auf die Zellpellets gegeben und die Proben gevortext. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Dunkeln bei 4°C über 45 Minuten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 400 µl des 1x Perm/Wash Buffer zu den Proben gegeben und diese dann über 5 Minuten bei 350 x g zentrifugiert. Im folgenden Schritt wurde der Antikörper-Mix für die intrazelluläre Färbung vorbereitet. Hierfür wurden die Antikörper diesmal im entsprechenden Verdünnungsverhältnis dem 1x Perm/Wash Buffer hinzugefügt. Gerechnet

wurde dabei wieder mit 100 µl Antikörper-Mix pro Probe. Im Folgenden finden sich die Angaben zu den verwendeten Antikörpern mit den entsprechenden Verdünnungen:

- Alexa Fluor 647 mouse anti-human Glut1: 1:500
- Alexa Fluor 700 mouse anti-human Glut4: 1:100
- Vio B515 REA anti-human Vimentin: 1:62,5
- PE mouse anti-human SNAI2/Slug: 1:100

Nach Zugabe von je 100 µl Antikörper-Mix zu den Proben, wurden diese gevortext und über 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 1x Perm/Wash Buffer hinzugegeben und erneut gevortext. Hiernach wurde bei 350 x g über 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der vorherige Schritt (400 µl 1x Perm/Wash Buffer, vortexen, zentrifugieren, Überstand verworfen) wurde noch einmal wiederholt und das Pellet schließlich final in 350 µl FACS Staining Buffer aufgenommen. Die Messungen erfolgten dann am Cytex™ Aurora.

3.2.6 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG

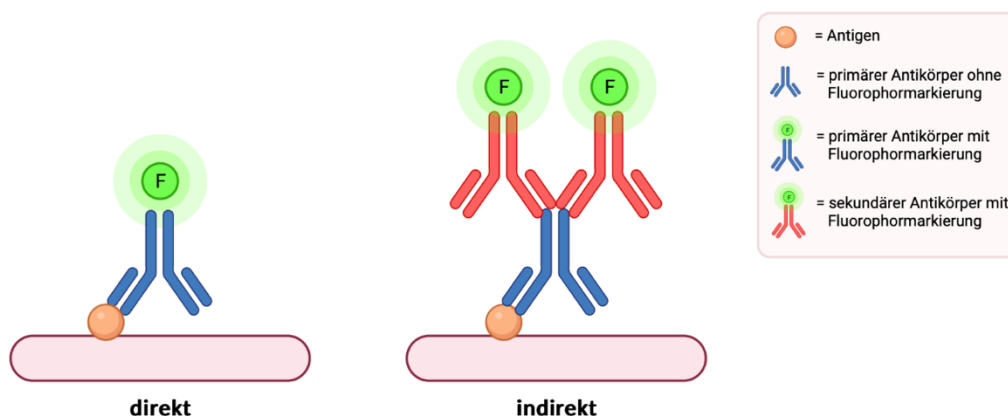


ABBILDUNG 12: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DIREKTEN UND INDIREKTEN IMMUNFLUORESCENZ

Die Immunfluoreszenz stellt ein Verfahren mit breitem Anwendungsspektrum dar, mit dessen Hilfe verschiedenste Probenotypen auf intrazelluläre und/oder oberflächlich-gebundene Antigene untersucht werden können. Eingesetzt werden dafür mit Fluorophoren markierte Antikörper. Prinzipiell können zwei verschiedene Verfahren bei der Immunfluoreszenzfärbung unterschieden werden: die direkte (primäre) oder indirekte (sekundäre) Variante. Während bei der direkten Methode der primäre Antikörper, der an das Zielepitop binden soll, mit der Fluorophormarkierung ausgestattet ist, findet bei der indirekten Vorgehensweise ein zweistufiger Prozess statt. In dem Fall bindet ein primärer Antikörper an das Zielepitop und ein zweiter Fluorophor-markierter Antikörper im nächsten Schritt an den primären. Die indirekte Variante erfordert zwar ein höheres Materialaufkommen und Zeitpensum, bietet aber eine verbesserte

Empfindlichkeit, Signalamplifikation sowie die Möglichkeit multiple Moleküle in derselben Probe nachzuweisen. Daher findet dieses Verfahren in der Regel auch vermehrt Anwendung. Bei beiden Methoden wird schließlich der fluoreszierende Farbstoff bei der Mikroskopie mit Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt. Dies führt dazu, dass die Fluorochrome wiederum Licht emittieren, das detektiert werden kann. Das detektierte Signal verhält sich proportional zur Antigenmenge und erlaubt so Aussagen über diese^{74,75}.

3.2.6.1 TF UND EPCAM

Im ersten Schritt wurde das Medium vorsichtig aus den Slides abgesaugt und die Zellen mit 100 µl 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von je 100 µl 2%igem PFA/PBS über 15 Minuten bei Raumtemperatur. Hiernach wurde erneut mit 100 µl 1 x PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von je 100 µl 2%igem BSA in PBS geblockt. Nach 60 Minuten wurde die Flüssigkeit aus den Slides vorsichtig entfernt und mit dem EpCAM- und TF-Antikörper über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei wurde der EpCAM-Antikörper im Verhältnis 1:100 und der TF-Antikörper im Verhältnis 1:50 in der Antibody-Solution (1% BSA im Verhältnis 1:100 + 0,5%iges Triton X-100 im Verhältnis 1:200 in 1x PBS) angesetzt. In jedes Well wurden 50 µl gegeben. Bei EpCAM handelt es sich um ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül, was in der Färbung vor allem zur Darstellung der Zelle dient. Nach Abschluss der 60-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen noch dreimal mit je 100 µl 1 x PBS gewaschen und schließlich mikroskopiert.

3.2.6.2 EMT-MARKER: CLAUDIN-7, E-CADHERIN, N-CADHERIN

Claudin-7, E-Cadherin

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen, wie in den Kapiteln 3.2.1.4 und 3.2.1.5 beschrieben, ausgesät und behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus den Slides entfernt und die Zellen mit 100 µl 1 x PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von je 100 µl kaltem Methanol (4°C) über 5 Minuten. Hiernach wurden die Zellen erneut zweifach mit 100 µl 1 x PBS gewaschen und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur durch Zugabe von je 100 µl 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Die Zellen wurden erneut mit 1 x PBS gewaschen und daraufhin durch Zugabe von 100 µl 10%igen Ziegen Serum in PBS über 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifischen Bindungen des Antikörpers vorzubeugen. Schließlich wurde über Nacht mit den primären Antikörpern bei 4°C inkubiert. Für den Antikörper-Mix wurden anti-Claudin-7 (im Verhältnis 1:100) und anti-E-Cadherin (im Verhältnis 1:50) verdünnt mit 1%igen Ziegen Serum in PBS angesetzt. Pro Well wurde mit jeweils 50 µl Mix inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Antikörper-Mix abpipettiert und die Zellen mit 100 µl 1%igem Ziegenserum in PBS gewaschen. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur. Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 verdünnt mit 1%igen Ziegenserum in PBS angesetzt. Auch hier wurde wieder mit 50 µl pro Well inkubiert. Im Anschluss wurde erneut mit je 100 µl 1%igen Ziegenserum in PBS und 1 x PBS gewaschen. Zuletzt wurden 50 µl 1 x PBS in die Wells gegeben und mikroskopiert.

N-Cadherin

Auch hier wurde zunächst das Medium aus den Slides abgesaugt und die Zellen mit 100 µl 1 x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung mit je 100 µl 2%igem PFA/PBS über 15 Minuten. Nach Ablauf der Zeit wurde erneut mit 100 µl 1 x PBS gewaschen und durch Zugabe von 100 µl 2%igem BSA in PBS über 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Im Anschluss erfolgten drei Waschschriffe mit je 100 µl 1 x PBS, bevor im finalen Schritt der Antikörper-Mix auf die Zellen gegeben werden konnte. Hierfür wurde zuvor der anti-N-Cadherin Antikörper im Verhältnis 1:25 zur Antikörper-Lösung (1% BSA im Verhältnis 1:100 + 0,5%iges Triton X-100 im Verhältnis 1:200 in 1x PBS) gegeben und schließlich mit 50 µl pro Well über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Am nächsten Tag wurden erneut drei Waschschriffe mit je 100 µl 1 x PBS durchgeführt und es erfolgte eine nukleäre Gegenfärbung mit DAPI. Hierfür wurde DAPI im Verhältnis 1:1750 mit PBS gemischt und je 50 µl dieses Ansatzes für 2 Minuten auf die Wells gegeben. Zuletzt wurde noch einmal mit 100 µl PBS gewaschen und anschließend mikroskopiert.

3.2.7 STATISTIK

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der in der Arbeit erhobenen Daten erfolgte vorwiegend über das Programm GraphPad Prism 8.0.2. Lediglich für die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder wurde das Programm ImageJ Version 1.53 verwendet. Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Daten. Alle Versuche wurden mindestens dreifach durchgeführt. Im Rahmen der Auswertung erfolgte zunächst der Nachweis einer Normalverteilung der Daten mittels Shapiro-Wilk Test. Anschließend wurden statistische Unterschiede der Daten durch Anwendung von *one-way* bzw. *two-way* ANOVA (*Tukey's multiple comparisons test*) ermittelt. Das Kriterium für die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Die p-Werte wurden wie folgt gekennzeichnet: $p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$ und $p \leq 0,0001 = ****$.

IV. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde anhand kolorektaler Karzinomzellen der Einfluss der zytostatischen Substanzen 5-FU und Gem sowie der CDKis Dinaciclib, Abemaciclib und THZ-1 auf TF untersucht. Weiterhin wurde betrachtet, welche Effekte hinsichtlich Gerinnung und EMT-Markern zu verzeichnen sind und inwiefern diese mit veränderter TF-Abundanz in Verbindung gebracht werden können.

Basierend auf den in 1.4 beschriebenen Vordaten der Arbeitsgruppe und der Tatsache, dass die HROC173 Zellen einen sehr häufigen molekularen Subtyp des CRCs repräsentieren, wurden alle nachfolgenden Versuche ausschließlich an dieser Zelllinie durchgeführt.

4.1 EINFLUSS VON 5-FU UND GEM AUF KOLOREKTALE KARZINOMZELLINIEN

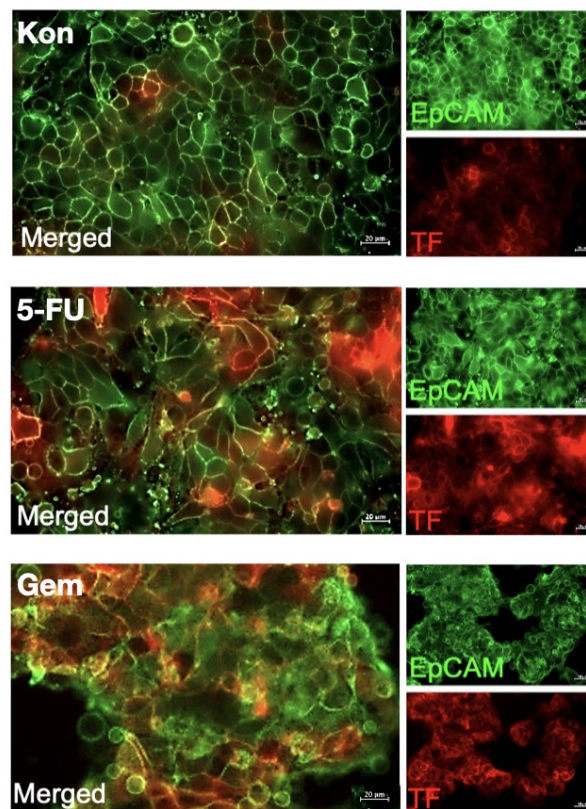


ABBILDUNG 13: IMMUNFLUORESCENZ VON TF UND EPCAM AUF DEN HROC173 ZELLEN NACH ZYTOSTATISCHER THERAPIE MIT 5-FU BZW. GEM

HROC173 Zellen wurden monotherapeutisch über 48h mit 5-FU oder Gem behandelt und anschließend die Immunfluoreszenz von TF und EpCAM mikroskopisch nachgewiesen. Als Kontrollen dienten unbehandelten Zellen. Dargestellt sind ausgewählte Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie, bei einer 40fachen Vergrößerung. Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nach 5-FU- Behandlung wurden freundlicherweise von M. Sc. Annabell Wolff zur Verfügung gestellt. Kon – Kontrolle, 5-FU – 5-Fluorouracil, Gem – Gemcitabin

Zunächst wurde die Therapie-assoziierte Hochregulation von TF mittels Immunfluoreszenz validiert. Abbildung 13 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der TF und EpCAM Immunfluoreszenzfärbung. Bei EpCAM handelt es sich um ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül, das insbesondere von vielen Karzinomen, so auch vom CRC, hoch exprimiert wird⁷⁶. Hier diente es vor allem zur immunfluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Zellstruktur. Dargestellt sind jeweils die Einzelkanäle sowie das aus beiden Kanälen bestehende Gesamtbild (= Merged). Deutlich erkennbar ist die Therapie-assoziierte Zunahme von TF auf HROC173 Zellen.

4.1.1 SORTING TF⁺ ZELLEN & LANGZEITKULTIVIERUNG TF⁺-GESORTETER HROC173 ZELLEN

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die Therapie-assoziierte Hochregulation von TF eine akute, und damit kurzzeitige zelluläre „Stressantwort“ darstellt, oder ob diese Veränderungen auch nach Reaktivierung konstant bleiben. Hierfür wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) direkt nach der Inkubation sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Sorting der TF⁺-Zellfraktion ermittelt. Abbildung 14 zeigt repräsentative Ergebnisse der Zellsortierung. Von den TF-positiven Zellen wurden diejenigen Zellen mit der höchsten TF-Expression (höchste 20 %, ca. 5 % aller Zellen) gesammelt und reaktiviert.

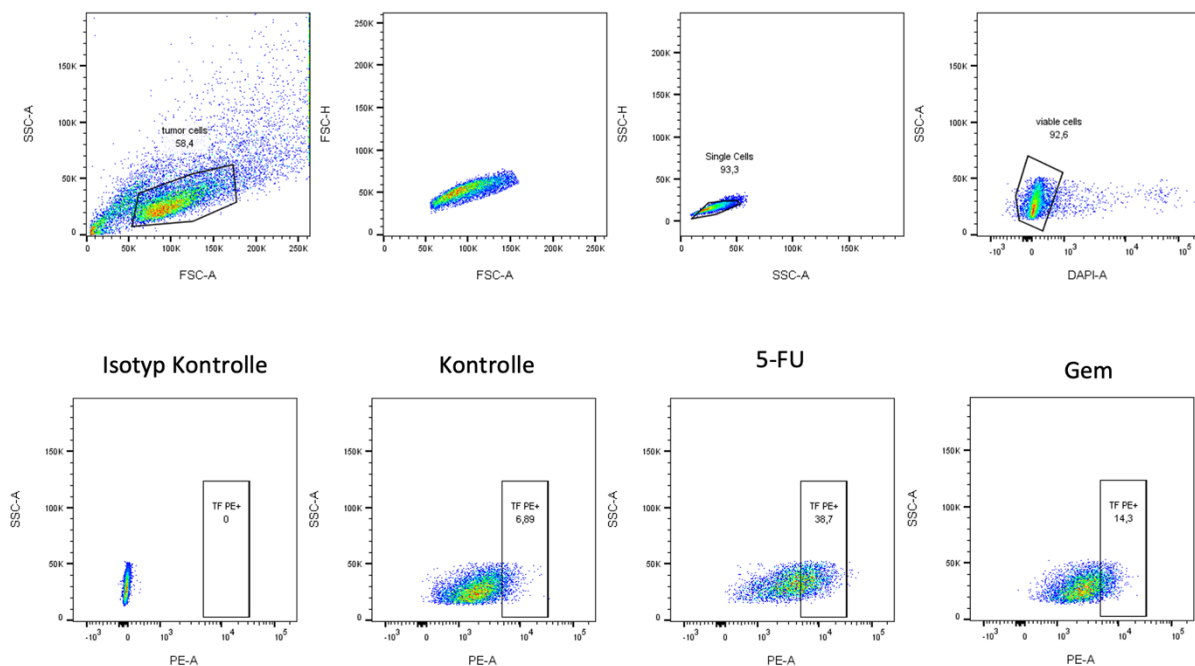


ABBILDUNG 14: BEISPIELPFLICHTE DARSTELLUNG DES ZELLSORTIERVORGANGS

HROC173 Zellen wurden 48h lang mit 1 μM 5-FU oder 0,15 μM Gem behandelt und mit einem PE-markierten Anti-TF-Antikörper gefärbt. Die Zellfraktionen mit hoher TF-Abundanz wurden mit einem BD FACSAriaTM III gesortet (= 20 % mit der höchsten TF-Fluoreszenz). DAPI wurde als Ausschlussfarbstoff für die Zellviabilität verwendet. Hier dargestellt sind repräsentative Dot-Blots der TF-positiven Zellen. Es wurden jeweils nur die Zellen mit der höchsten TF-Expression gesortet (etwa 5 % aller Zellen).

Die Reanalysen erfolgten an den Tagen 21 und 63. Während der Reaktivierung fanden keine Behandlungen mit 5-FU bzw. Gem statt, sodass alle Effekte auf eine einmalige Behandlung zurückzuführen sind.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zu sehen. Die TF-MFI stieg nach der Behandlung mit 5-FU oder Gem signifikant an und lag auch noch nach der Reaktivierung der Zellen stabil über den Kontrollwerten. Die Daten demonstrieren somit anschaulich, dass es sich hierbei nicht nur um eine kurzzeitige stressinduzierte Reaktion, sondern um einen konstanten Chemotherapie-assoziierten Effekt handelt.

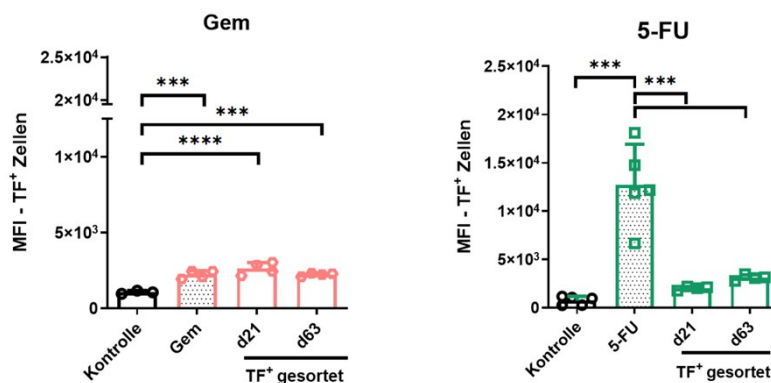


ABBILDUNG 15: MITTLERE FLUORESCENZINTENSITÄT (MFI) ZU VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN NACH SORTING VON HROC173 ZELLEN, DIE ZUVOR MIT 5-FU ODER GEM BEHANDELT WURDEN

Quantitative Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Sorting, d. h. Tag 21 und Tag 63. Dargestellt sind die Mittlere Fluoreszenzintensität + Standardabweichung, inkl. der Einzelwerte, die sich aus 20.000 Ereignissen ergeben. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und mindestens dreimal wiederholt. *** p<0,001; **** p<0,0001; one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test)

4.2 EINFLUSS VON 5-FU, GEM UND CDK-INHIBITOREN AUF DIE ZELLMIGRATION

In weiterführenden Untersuchungen wurde der Einfluss der verwendeten Zytostatika 5-FU und Gem auf die Zellmigration erfasst. Hierbei wurde erstmals auch untersucht, welchen Einfluss die CDK-Inhibitoren Dinaciclib (Dina), Abemaciclib (Abema) und THZ-1 haben.

Abbildung 16 zeigt repräsentative Bilder der HROC173 Zellen. Als Kontrolle und zum Vergleich der Ergebnisse wurden parallel unbehandelte Zellen betrachtet. Untersucht wurde hier lediglich die basale HROC173-Zelllinie. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Therapeutika auf die Zellmigration festgestellt. Dies war u.a. auch darauf zurückzuführen, dass die hier verwendeten Zellen keinen konfluenten Zellrasen bildeten, weshalb die Dateninterpretation erschwert ist.

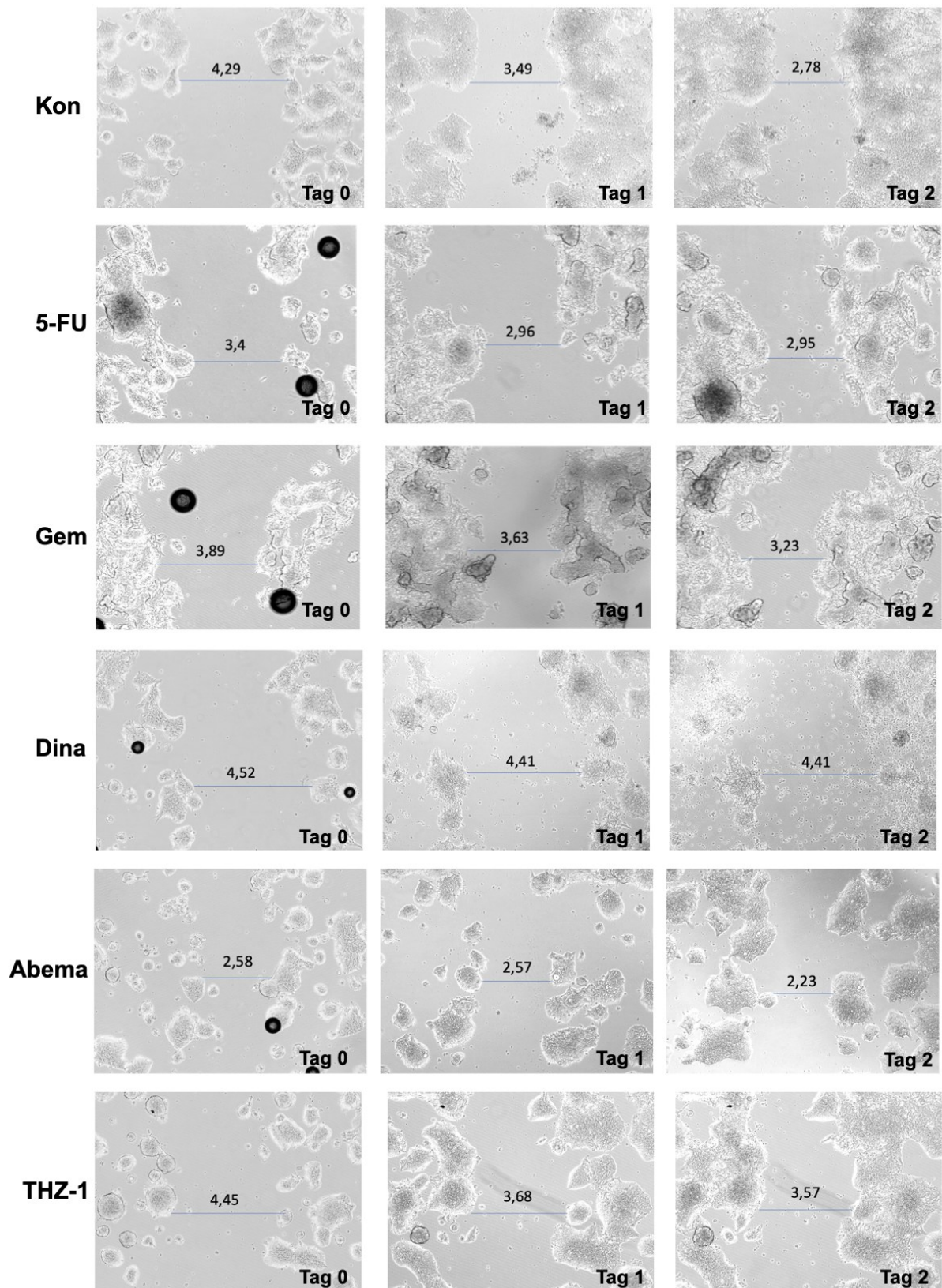


ABBILDUNG 16: EINFLUSS VON 5-FU UND GEM, SOWIE DER CDK-INHIBITOREN DINACICLIB, ABEMACICLIB UND THZ-1 AUF DEN WOUND HEALING ASSAY ANHAND DER BASALEN HROC173 ZELLEN

Dargestellt sind repräsentative Abbildungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung (Tag 0 – Tag 2). Zu beachten ist, dass die Zellen unabhängig von der Behandlung keinen konfluenten Zellrasen bildeten, weshalb die Dateninterpretation erschwert ist.

4.3 EINFLUSS VON MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIEN AUF DIE TF-ABUNDANZ

In den beschriebenen Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass 5-FU und Gem in niedriger Dosis zu einer deutlichen und anhaltenden Erhöhung der TF-Abundanz auf den HROC173-Tumorzellen führen. Darauf aufbauend sollte im Folgenden der Einfluss der CDK-Inhibitoren Dinaciclib, Abemaciclib und THZ-1 auf die TF-Abundanz und die Gerinnung untersucht werden. Diese wurden dafür sowohl in Monotherapie als auch in simultanen und sequenziellen Kombinationsbehandlungen mit 5-FU untersucht.

Die Messung der TF-Abundanz der HROC173-Tumorzellen nach Mono- und Kombinationstherapien erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17-19 dargestellt.

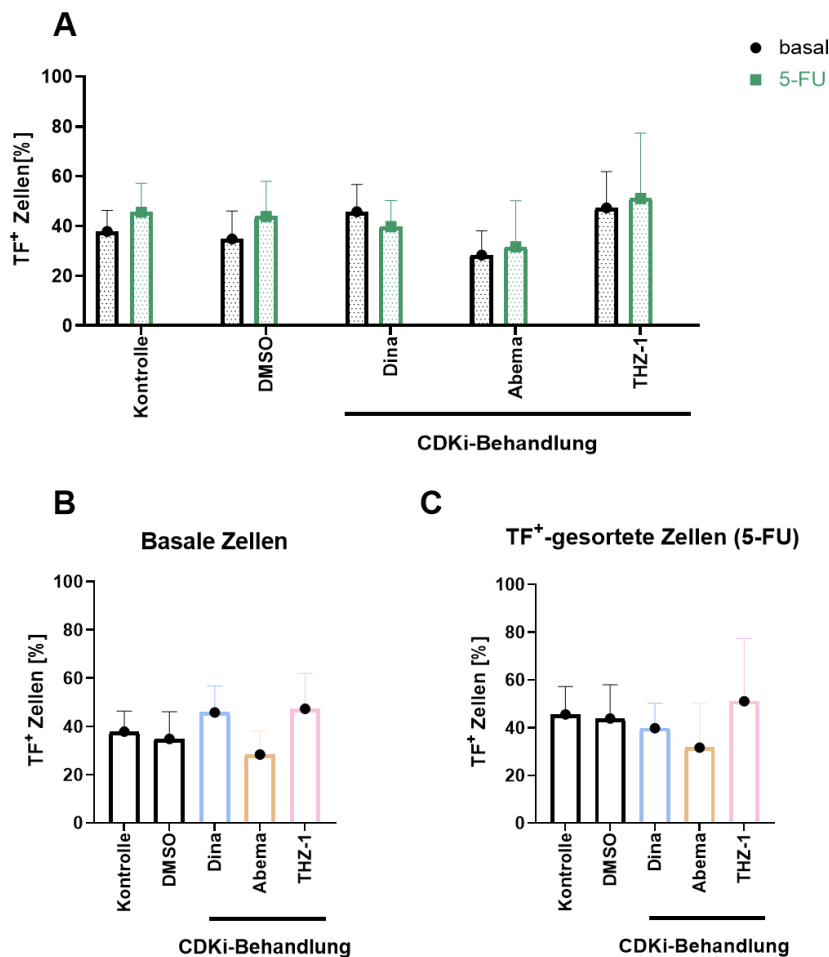


ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DER TF-ABUNDANZEN NACH MONOTHERAPIE MIT CDK-INHIBITOREN AN BASALEN UND TF⁺-GESORTETEN HROC173 ZELLEN

(A-C) Die Tumorzellen wurden über 48h mit den CDK-Inhibitoren Dinaciclib (Dina), Abemaciclib (Abema) und THZ-1 behandelt. Anschließend erfolgte die Messung der TF⁺-Zellen mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle dienen unbehandelte und mit DMSO-behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen biologischen Replikaten. (A) Gesamtdarstellung der Ergebnisse von B und C, (B) Basale HROC173 Zellen, (C) TF⁺-gesortete HROC173 Zellen. Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib

Durchgeführt wurden die Versuche sowohl an der basalen Zelllinie als auch an einer der zuvor etablierten TF-positiv gesorteten Zelllinien (siehe 3.2.2). Abbildung 17A zeigt die Gesamtheit der Ergebnisse zur besseren Vergleichbarkeit. Abbildung 17B und C zeigen jeweils die Ergebnisse für die basale und die 5-FU behandelte TF⁺-gesortete Zelllinie.

Bei den basalen Zellen waren in der Kontrolle ca. 37% TF-positiv (17B). Unter der Behandlung mit Dinaciclib und THZ-1 konnte eine Zunahme der TF-positiven Zellen um jeweils etwa 10% verzeichnet werden. Bei Abemaciclib zeigte sich ein gegenteiliger Effekt, mit Abnahme der TF-positiven Zellen auf ca. 28%. Leicht abweichende Ergebnisse waren bei der zuvor durch 5-FU-Behandlung etablierten TF⁺-Zelllinie zu verzeichnen (17C). In der Kontrolle waren hier etwa 45 % der Zellen TF-positiv. Unter der Behandlung mit Dinaciclib kam es hier zu keiner Erhöhung der TF-Abundanz. Stattdessen blieben die Werte ähnlich zu denen der unbehandelten Kontrollen. Auch bei THZ-1 war der Effekt weniger stark ausgeprägt (auf ca. 51%). Unter der Therapie mit Abemaciclib kam es, wie zuvor bei den basalen Zellen, zu einer deutlichen Abnahme auf 31%. Obgleich in keinem Fall statistisch signifikante Unterschiede nachweisbar waren, ließen sich leichte Tendenzen hinsichtlich der Hoch- bzw. Runterregulierung der TF-Abundanz bei den CDK-Inhibitoren erkennen.

Die sequenzielle Therapie der basalen und TF⁺-Zelllinie mit 5-FU und CDK-Inhibitoren (jeweils für 48h) erzielte folgende Ergebnisse (Abbildung 18): Die 48-stündige Therapie mit 5-FU führte zu einer Hochregulation von TF auf ca. 47% (vs. 40% unbehandelte Kontrolle). Die sequenziellen Behandlungen mit 5-FU und Dinaciclib beziehungsweise 5-FU und THZ-1 führten zu einer noch ausgeprägteren Zunahme auf ca. 52% (Dinaciclib) bzw. 54% (THZ-1). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Daten der CDKi-Monotherapie, bei der Dinaciclib und THZ-1 ebenfalls TF auf den Tumorzellen induzierten. Die sequenzielle Behandlung mit 5-FU und Abemaciclib hingegen führte wie zuvor nach der Abemaciclib Monotherapie zu einer leichten Abnahme der TF⁺-Zellen auf etwa 28%. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund, dass 5-FU monotherapeutisch genau den gegenteiligen Effekt auf die Zellen ausübt, interessant.

Auch für die TF⁺-Zelllinie, dargestellt in Abbildung 18B, wurden ähnliche Befunden erhoben. Die TF-Abundanz lag bei etwa 47% und stieg nach erneuter 5-FU Behandlung marginal auf ca. 50%. Im Rahmen der sequenziellen Therapien mit Dinaciclib und THZ-1 kam es auch hier zu einer Zunahme der TF⁺-Zellen auf 54% (Dinaciclib) bzw. 56% (THZ-1). Abemaciclib vermittelte erneut antagonistische Effekte, mit Reduktion des Anteils TF⁺ Zellen auf 32%. Zwar konnten wieder keine statistischen Signifikanzen erzielt werden, dennoch bestätigten sich auch hier die in der Monotherapie beobachteten Effekte der jeweiligen CDKis. Hierbei wurde Abemaciclib erneut als Gegenspieler der 5-FU-induzierten TF-Hochregulation identifiziert.

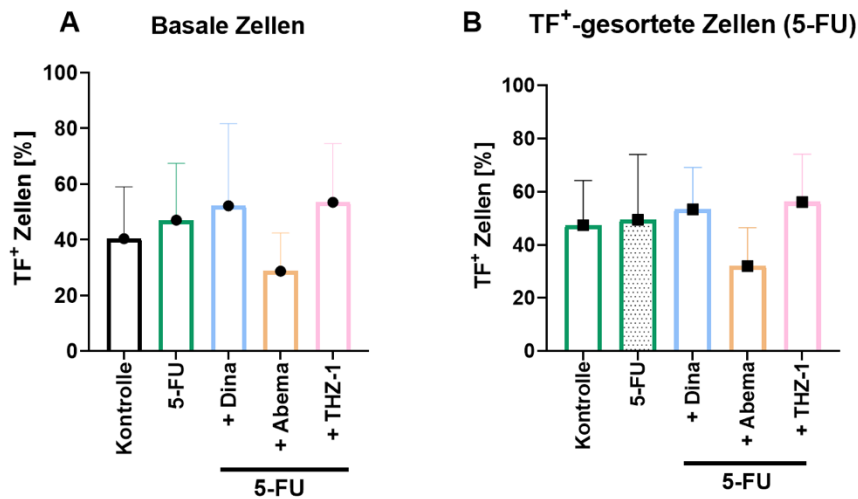


ABBILDUNG 18: DARSTELLUNG DER TF-ABUNDANZEN NACH SEQUENZIELLER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN (A, B) Bei der sequenziellen Behandlung wurde zunächst über 48h mit 5-FU und anschließend über weitere 48h mit einem CDKi behandelt. Mitaufgeführt sind die Daten aus einer monotherapeutischen Behandlung mit 5-FU über 48h. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Messung der TF-Abundanzen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 3 unabhängigen biologischen Replikaten (A) Basale HROC173 Zellen, (B) TF⁺-gesortete HROC173 Zellen. 5-FU – 5-Fluorouracil, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib

Neben der sequenziellen Therapie fand auch eine simultane Behandlung der Tumorzellen mit 5-FU und einem CDKi statt. Die Applikation der Substanzen erfolgte hierbei erneut über 48h. Parallel dazu wurden die Zellen für 48h mit 5-FU behandelt, um den singulären Effekt von 5-FU vergleichend darzustellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 19 dargestellt.

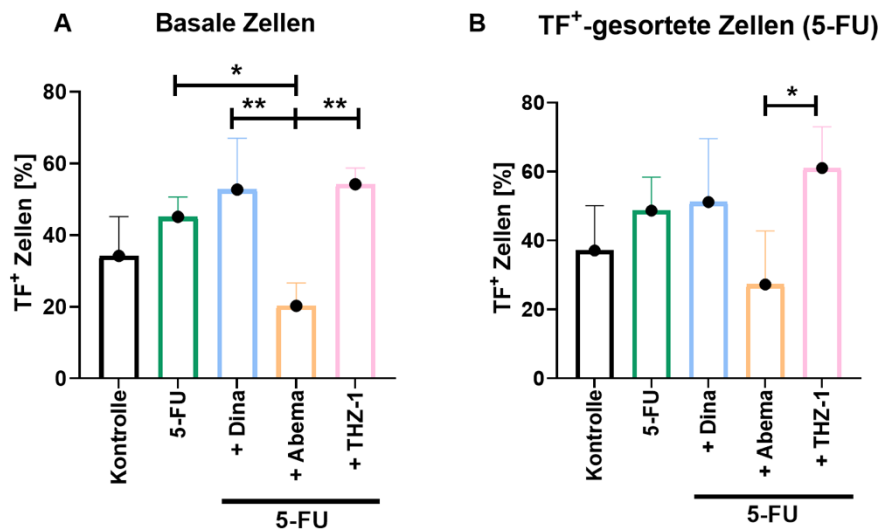


ABBILDUNG 19: DARSTELLUNG DER TF-ABUNDANZEN NACH SIMULTANER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN (A, B) Die Zellen wurden über 48h simultan mit 5-FU und einem CDK-Inhibitor behandelt. Die verwendeten Dosierungen entsprachen dabei denen der Monotherapie. Parallel dazu wurde auch monotherapeutisch mit 5-FU über 48h behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Messung der TF-Abundanzen erfolgte im Anschluss an die Behandlung mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen biologischen Replikaten ($n \geq 3$). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Überprüfung der Normalverteilung mittels one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (A) Basale HROC173 Zellen, (B) TF⁺-gesortete HROC173 Zellen. 5-FU – 5-Fluorouracil, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib.

Die TF-Abundanz der unbehandelten, basalen Zellen (siehe 19A) lag bei etwa 34%. Die 5-FU Monotherapie induzierte TF. In Analogie zu den Vorbefunden führte auch die simultane Applikation von 5-FU + Dinaciclib bzw. 5-FU + THZ-1 zu einer höheren TF-Abundanz (53% bzw. 54%: 5-FU + Dinaciclib bzw. THZ-1). Abemaciclib hingegen wirkte auch bei simultaner Applikation mit 5-FU antagonistisch und verringerte den Anteil TF⁺-Zellen signifikant auf ca. 20%.

In Abbildung 19B sind die Daten für die TF⁺-Zelllinie dargestellt. Der Anteil TF⁺ Zellen betrug ca. 38% und erhöhte sich nach 5-FU Gabe um etwa 10%. Die simultanen Therapien mit 5-FU + Dinaciclib und 5-FU + THZ-1 führten erneut zu einer Steigerung der TF-Abundanz (51% bzw. 61%: 5-FU + Dinaciclib bzw. THZ-1). Demgegenüber reduzierte die Behandlung mit 5-FU + Abemaciclib TF auf ca. 27% ($p < 0,05$ vs. 5-FU + THZ-1).

Im Rahmen dieser Untersuchung waren teilweise signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsansätzen nachweisbar. Zudem bestätigt sich mit den hier ermittelten Daten, dass Abemaciclib nicht nur bei sequenzieller Gabe mit 5-FU, sondern auch bei simultaner Applikation zu einer deutlichen Abnahme der TF-Abundanz führt.

4.4 DETEKTION DER KO-ABUNDANZ VON TF UND PHOSPHATIDYLSEKIN

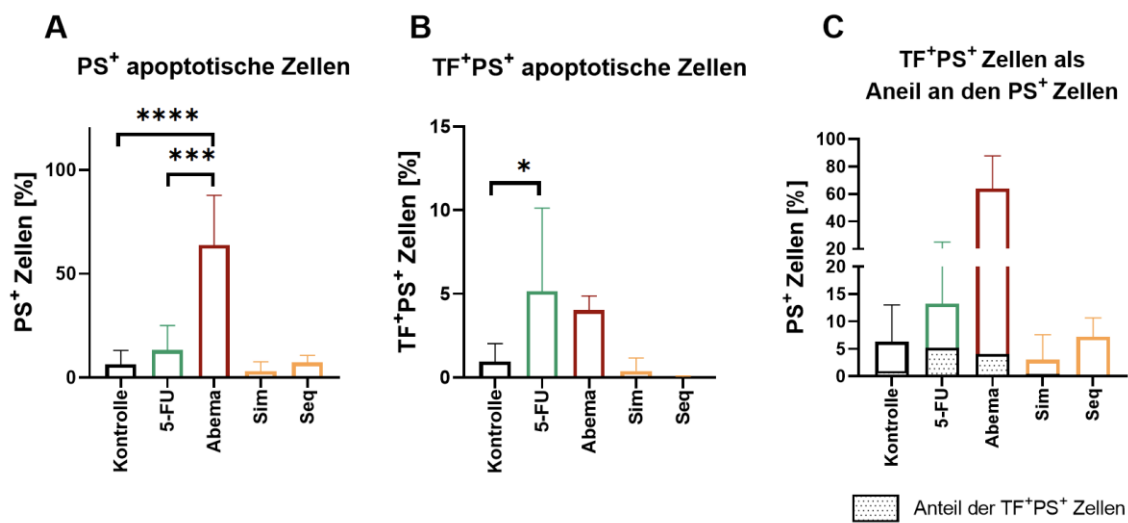


ABBILDUNG 20: DARSTELLUNG DER KO-ABUNDANZ VON TF UND PS AUF HROC173 ZELLEN NACH MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE

(A – C) HROC173 Zellen wurden mit 5-FU und Abema monotherapeutisch oder in Kombination behandelt und anschließend die TF- und PS- Abundanz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte nach Testung der Normalverteilung mittels one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test). Ein Teil der Daten wurde von M. Sc. Annabell Wolff erhoben. * p<0,05, *** p ≤ 0,001 und **** p ≤ 0,0001 (A) PS⁺ apoptotische Zellen, (B) TF⁺PS⁺ apoptotische Zellen, (C) TF⁺PS⁺ Zellen als Anteil an den PS⁺ apoptotischen Zellen. 5-FU – 5-Fluorouracil, Abema – Abemaciclib, Seq – sequenziell, Sim – simultan.

Die Ko-Lokalisation von TF und Phosphatidylserin (PS) auf HROC173 Zellen nach Mono- sowie simultaner und sequenzieller Kombinationstherapie wurde ebenfalls mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Rationale basiert auf der Erkenntnis, dass TF gemeinsam mit PS an die Oberfläche transloziert wird und damit zur TF-„Dekodierung“ beiträgt^{77,78}.

Da PS auch ein Marker für Apoptose ist, wurde sowohl der Anteil PS⁺ Zellen als auch der Anteil PS⁺TF⁺ Zellen bestimmt. Mittels Apotracker wurde die Translokation von PS an die Zelloberfläche und damit der Anteil apoptotischer Zellen detektiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20A dargestellt. In der Kontrolle betrug der Anteil der apoptotischen Zellen nur 6%. Unter der Behandlung mit 5-FU kam es zu einer Erhöhung auf etwa 13% und nach der Abemaciclib-Behandlung zu einer hochsignifikanten Steigerung auf ca. 64%. Unter simultaner und sequenzieller Therapie war der Anteil PS⁺-Zellen etwa gleich hoch wie bei der Kontrolle, sodass sich hier keine signifikanten Unterschiede ergaben.

Zusätzlich wurde die Ko-Lokalisation von TF⁺- und PS⁺-Zellen detektiert (Abbildung 20B). In der Kontrolle waren nur 1% der HROC173 Zellen TF⁺PS⁺. Einzig unter der Therapie mit 5-FU kam es zu einer signifikanten Zunahme auf ca. 5%. Unter der Therapie mit Abema-

ciclib war der Anteil mit 4% etwas geringer. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen simultaner und sequenzieller Therapie. In beiden Fällen lag der Anteil der TF⁺PS⁺-Zellen bei unter 1%. Somit war die 5-FU-assoziierte Hochregulation von TF nur teilweise auf eine verstärkte PS-Translokation zurückzuführen.

4.5 EINFLUSS VON MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIE AUF DIE GERINNUNGSZEITEN

In weiterführenden Untersuchungen wurden die Einflüsse der Mono- und Kombinationstherapien auf die Gerinnungszeiten und damit auf den prokoagulanten Phänotyp der HROC173 Zellen näher untersucht. Vorbereitung und Durchführung der Clotting-Assays fanden wie in 3.2.4 beschrieben statt. Die Messung der Gerinnungszeiten erfolgte mittels Koagulometer.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die CDK-Inhibitoren individuelle Effekte auf die Gerinnung der untersuchten Zellen haben (Abbildung 21). Insbesondere Abemaciclib führte zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit und damit zu einer Modulation des prokoagulanten Zustands der Zellen. Diese Befunde korrelieren mit den zuvor ermittelten Daten zur TF-Abundanz.

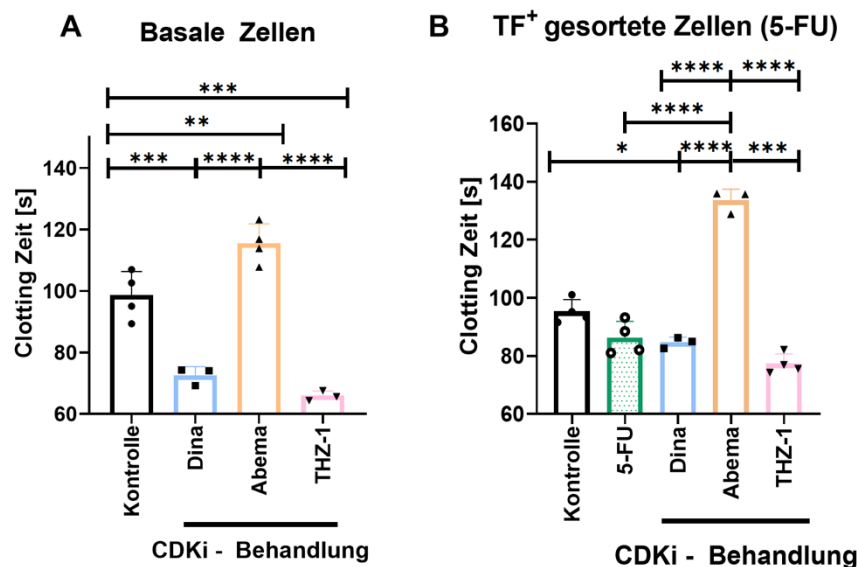


ABBILDUNG 21: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH MONOTHERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN

(A) Basale und (B) TF⁺-gesortete HROC173 Zellen wurden mit CDK-Inhibitoren bzw. 5-FU über 48h behandelt und anschließend die Gerinnungszeit *via* Clotting-Assay bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von n ≥ 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte nach Testung der Normalverteilung mittels one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001, ****p<0.000. 5-FU – 5-Fluorouracil, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib.

In Abbildung 22 sind die Gerinnungszeiten nach sequenzieller Therapie für die basalen und TF⁺-gesorteten HROC173 Zellen dargestellt. Im Rahmen der sequenziellen Therapie erfolgte zunächst eine 48-stündige Behandlung mit 5-FU, gefolgt von einer weiteren 48-stündigen Behandlung mit einem CDK-Inhibitor. Parallel dazu wurden die Zellen mit 5-FU inkubiert, um den singulären Effekt beurteilen zu können.

Die Gerinnungszeit der basalen Zellen betrug etwa 100 s (Abbildung 22A). Nach der Behandlung mit 5-FU verkürzte sich diese auf 87 s. Bei den sequenziellen Behandlungen mit 5-FU + Dinaciclib und 5-FU + THZ-1 kam es zu einer noch deutlicheren Verkürzung (78 s Dinaciclib und 82 s THZ-1). Damit zeigten sich synergistische Effekte bezüglich der Wirkung von 5-FU und den beiden CDK-Inhibitoren. Die Behandlung mit 5-FU und Abemaciclib führte dahingegen zu einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeit (120 s) verglichen mit den anderen beiden CDK-Inhibitoren.

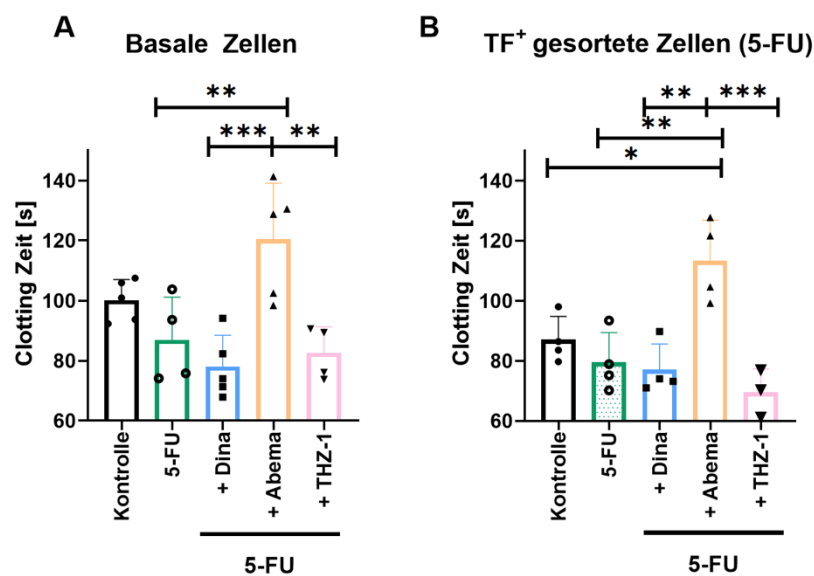


ABBILDUNG 22: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH SEQUENZIELLER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN (A) Basale und (B) TF⁺-gesortete HROC173 Zellen wurden über 48h mit 5-FU und anschließend über weiter 48h mit einem CDK-Inhibitor behandelt. Parallel dazu sind auch die Ergebnisse einer monotherapeutischen Behandlung mit 5-FU über 48h dargestellt. Anschließend erfolgte die Messung der Gerinnungszeiten *via* Clotting-Assay. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von n ≥ 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte nach Testung der Normalverteilung mittels one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001. 5-FU – 5-Fluorouracil, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib.

Bei der TF⁺-gesorteten Zelllinie betrug die Gerinnungszeit 87 s und war damit geringer als bei der der basalen HROC173 Kontrolle (siehe Abbildung 22B). 5-FU verkürzte die Gerinnungszeit weiter auf etwa 79 s. Die sequenziellen Behandlungen mit Dinaciclib und THZ-1

fürten zu einer noch deutlicheren Verkürzung dieser (76 s Dinaciclib und 69 s THZ-1). Demgegenüber verlängerte die sequenzielle Kombination mit 5-FU > Abemaciclib die Gerinnungszeit im Vergleich zur Kontrolle signifikant auf 113 s, trotz der Vorbehandlung mit 5-FU. Allerdings war das Signifikanzniveau niedriger als bei der Monotherapie mit Abemaciclib.

Insgesamt zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den sequenziellen Therapien mit den drei untersuchten CDK-Inhibitoren. Darüber hinaus korrelieren die erhobenen Daten gut mit den beobachteten Effekten der sequenziellen Therapie auf die TF-Abundanzen. Weiterhin wurde der Einfluss der simultanen Therapie mit 5-FU und einem CDK-Inhibitor auf die Gerinnungszeit im Vergleich zur 5-FU Monotherapie eruiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

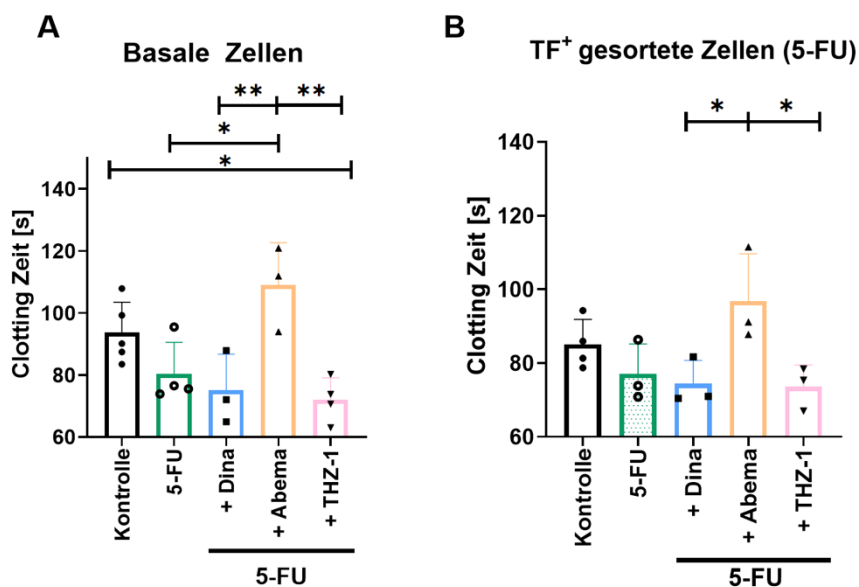


ABBILDUNG 23: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH SIMULTANER THERAPIE MIT 5-FU UND CDK-INHIBITOREN (A) Basale und (B) TF⁺-gesortete HROC173 Zellen wurden über 48h simultan mit 5-FU und einem CDK-Inhibitor behandelt. Parallel dazu wurde zudem über 48h monotherapeutisch mit 5-FU behandelt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Gerinnungszeiten *via* Clotting-Assay. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von n ≥ 3 unabhängigen biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte nach Testung der Normalverteilung mittels one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01. 5-FU – 5-Fluorouracil, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib.

Für die basalen Zellen ergab sich eine mittlere Gerinnungszeit von ca. 94 s (Abbildung 23A). Die alleinige 5-FU Behandlung verringerte diese auf ca. 80 s. Die simultane Applikation von 5-FU + Dinaciclib bzw. THZ-1 verkürzte weiterhin die Gerinnungszeit (ca. 75 s: Dinaciclib und ca. 72 s: THZ-1). Die simultane Abemaciclib-Behandlung hatte einen gegenteiligen Effekt mit deutlicher Verlängerung der Gerinnungszeit auf 109 s. Diese war jedoch um 11 s geringer als bei der sequenziellen Therapie und deutet auf einen weniger starken Effekt von Abemaciclib bei simultaner Applikation mit 5-FU hin.

Bei der 5-FU behandelten TF⁺-Zelllinie lag die Gerinnungszeit der Kontrolle bei 85 s und war entsprechend geringer als bei der basalen Zelllinie (Abbildung 23B). Die wiederholte 5-FU-Therapie führte zu einer Reduktion dieser auf 77 s. Dieser Effekt wurde durch die gleichzeitige Gabe von 5-FU + Dinaciclib (74 s) bzw. 5-FU + THZ-1 (73 s) nur geringfügig verstärkt. Abemaciclib hingegen verlängerte die Gerinnungszeit auf ca. 97 s. Im Vergleich zur sequenziellen Therapie war diese Verlängerung jedoch deutlich geringer ausgeprägt.

4.6 EINFLUSS DER MONOTHERAPIEN AUF EMT-MARKER

Die Betrachtung von EMT-Markern bei Tumorerkrankungen nimmt mittlerweile einen großen Stellenwert ein. Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war es zu detektieren, ob Kurzzeitbehandlungen mit chemotherapeutischen Substanzen bzw. CDKis einen Einfluss auf EMT-Marker haben. Betrachtet wurden hierbei die epithelialen Marker Claudin-7 und E-Cadherin sowie der mesenchymale Marker N-Cadherin.

4.6.1 IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN VON CLAUDIN-7, E-CADHERIN UND N-CADHERIN

In Abbildung 24 sind repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen nach Behandlungen zum Nachweis verschiedener EMT-Marker dargestellt. Weiterhin aufgeführt ist die statistische Auswertung der *integrated densities*, um möglichst objektive Aussagen zu den Therapie-assoziierten Veränderungen zu ermöglichen (Abbildung 25).

Der direkte Vergleich der TF⁺-gesorteten Zellen mit der basalen Linie zeigte eine leichte Abnahme von N-Cadherin. Die Therapien selbst führten zu keinen signifikanten Unterschieden. Lediglich unter den Therapien mit Gem, Dinaciclib und Abemaciclib war für die TF⁺-gesortete Zelllinie ein leichter Anstieg von N-Cadherin zu beobachten. Bei E-Cadherin gab es keine deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien. Es zeigte sich jedoch, dass Gem in beiden Linien zu einer leichten Abnahme von E-Cadherin führt. Dieser Effekt war vor allem bei den TF⁺-gesorteten Zellen nachweisbar. Bei gemeinsamer Betrachtung von N-Cadherin und E-Cadherin wurde damit allein für die TF⁺-gesortete Zelllinie unter Gem-Behandlung ein Anstieg von N-Cadherin bei simultaner Abnahme von E-Cadherin detektiert. Auch für Claudin-7 konnten kaum Unterschiede festgestellt werden.

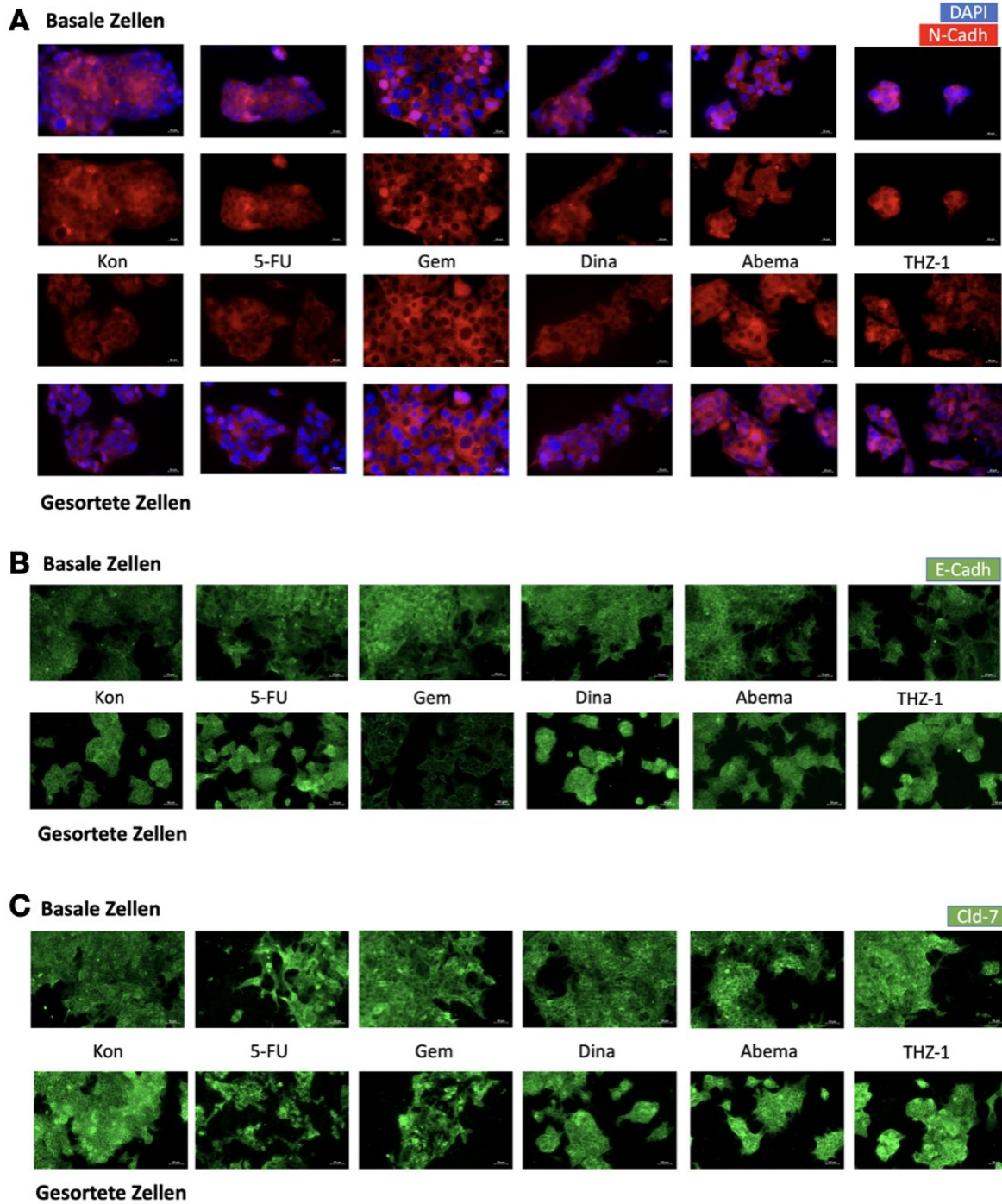


ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DER IMMUNFLUORESCENZ VON N-CADHERIN, E-CADHERIN UND CLAUDIN-7 AUF BASALEN UND TF⁺-GESORTETEN HROC173 ZELLEN (A, B, C)

HROC173 Zellen wurden über 48h mit chemotherapeutischen Substanzen oder CDKis behandelt. Anschließend wurde die Immunfluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen. Untersucht wurden die basale, sowie die 5-FU behandelte TF⁺-HROC173 Zelllinie. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind ausgewählte Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie, bei einer 20fachen Vergrößerung. (A) N-Cadherin, (B) E-Cadherin, (C) Claudin-7. 5-FU – 5-Fluorouracil, Gem – Gemcitabin, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib.

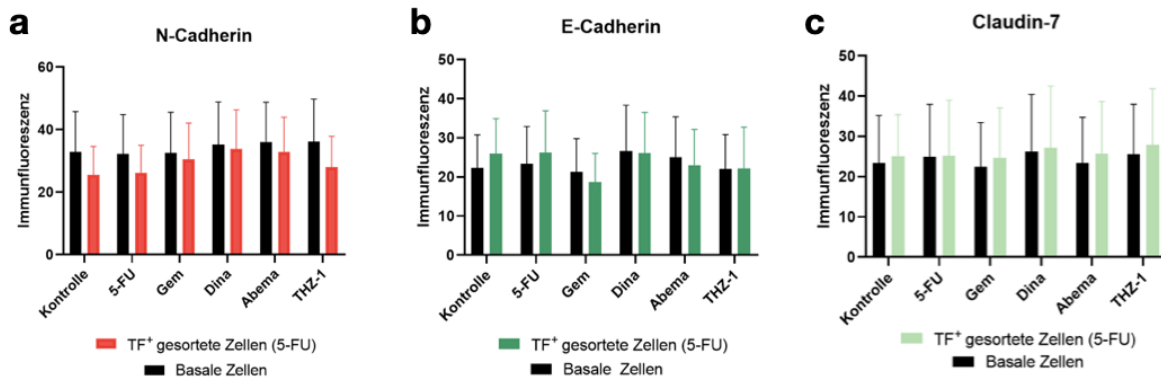


ABBILDUNG 25: QUANTIFIZIERUNG DER IMMUNFLUORESCENZ VON N-CADHERIN, E-CADHERIN UND CLAUDIN-7

Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzintensität erfolgte mittels ImageJ (Integrated-Density-Analyse). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von $n \geq 3$ unabhängigen biologischen Replikaten. (a) N-Cadherin, (b) E-Cadherin, (c) Claudin-7. 5-FU – 5-Fluorouracil, Gem – Gemcitabin, Dina – Dinaciclib, Abema – Abemaciclib.

Damit zeigten sich unter der einmaligen Kurzzeittherapie mit den jeweiligen Substanzen bzw. CDKis insgesamt nur sehr geringe Auswirkungen auf die hier untersuchten EMT-Marker. Folglich scheint die EMT im Rahmen der Kurzzeitbehandlungen hier keine Relevanz zu haben.

4.6.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG VON EMT-MARKERN

Ergänzend zur immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung erfolgte auch eine durchflusszytometrische Bestimmung EMT-spezifischer sowie -assoziierter Marker (Abbildung 26). Hierbei wurden die Zellen jeweils mit 5-FU und Abemaciclib, sowie simultan mit beiden Substanzen über 48h behandelt. Als EMT-Marker wurden E-Cadherin sowie das Immuncheck-pointmolekül PD-L1 und Glut1 betrachtet. PD-L1 (*Programmed cell death 1 ligand 1*) ist bei einer Vielzahl von Tumorerkrankungen überexprimiert und hat Einfluss auf EMT-Prozesse⁷⁹. GLUT-1 hingegen gehört zu den Glukosetransportern und reguliert den Transport von Glukose über die Zellmembran. Eine verminderte Expression von GLUT-1 wird häufig im Zusammenhang mit EMT beobachtet. Die Suppression von GLUT-1 ist jedoch im Allgemeinen eher mit einer reduzierten Zellproliferation als mit dem EMT-Prozess selbst assoziiert^{80,81}.

In Analogie zu den Befunden der Immunfluoreszenzfärbung wurden nur marginale Veränderungen im Anteil E-Cadherin positiver Zellen nachgewiesen. Keiner der untersuchten Therapieansätze hatte einen Einfluss auf E-Cadherin. Die Anzahl PD-L1-positiver Zellen nahm bei der basalen Linie unter allen Behandlungsansätzen und bei der TF⁺-gesorteten Zelllinie unter den beiden Monotherapien leicht zu. Demgegenüber wurden nach Abemaciclib-Behandlung weniger Glut1-positive Zellen detektiert. Dieser Effekt blieb auch nach der simultanen Kombinationsbehandlung in beiden untersuchten Zelllinien erhalten

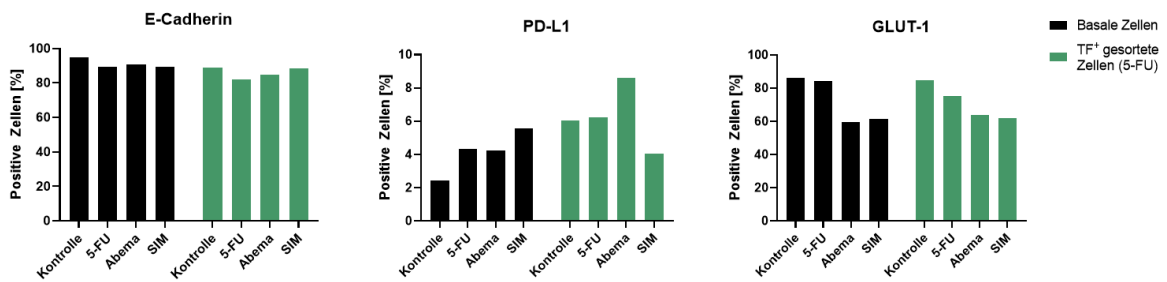


ABBILDUNG 26: AUSWIRKUNG VON MONOTHERAPEUTISCHER UND SIMULTANER BEHANDLUNG MIT 5-FU UND ABEMACICLIB AUF EMT-MARKER

Basale und 5-FU behandelte TF⁺-gesortete HROC173 Zellen wurden über 48h monotherapeutisch mit 5-FU, Abemaciclib oder simultan mit beiden Substanzen behandelt. Anschließend wurden verschiedene EMT-Marker mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Als Kontrollen dienten unbehandelten Zellen. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte von n = 2 unabhängigen Experimenten. 5-FU – 5-Fluorouracil, Abema – Abemaciclib, SIM – Simultan.

Damit konnte in dieser Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen TF-Erhöhung, prokoagulantem Phänotyp und EMT ermittelt werden.

V. DISKUSSION

Die verstärkte Produktion und Freisetzung von Tissue Factor ist mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse (=VTEs) bei Krebspatienten assoziiert. Diese stellen eine wichtige Ursache für vorzeitige Mortalität und Morbidität in dieser Gruppe dar^{82,83}. Je nach vorliegender Tumorentität ist das Risiko für die Patienten initial unterschiedlich. CRC-Patienten gehören zum intermediären Risikosegment¹¹. Dieses Risiko wird jedoch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren beeinflusst. Immobilisation durch chirurgische Eingriffe, Krankenhausaufenthalte und insbesondere Chemotherapien tragen neben anderen Aspekten zu einer deutlichen Erhöhung bei. Die alleinige Chemotherapie kann das VTE-Risiko um das 2-6-fache erhöhen^{83,84}. All diese Faktoren betreffen auch CRC-Patienten, insbesondere solche mit fortgeschrittenen oder metastasierten Karzinomen. Die Relevanz dieser Thematik zeigte sich unter anderem in einer Studie von Mandalà *et al.* (2009), in der die VTE als häufigste Grad 3 Toxizität bei CRC-Patienten unter ambulanter Chemotherapie beschrieben wurde. Mehrere Mechanismen werden mit der Chemotherapie-assoziierten Risikoerhöhung in Verbindung gebracht. Dazu gehören akute Gefäßwandschädigungen, nicht akute Schädigungen des Endothels und eine Abnahme der natürlichen Gerinnungsinhibitoren⁸⁵.

In dieser Arbeit wird mit der beobachteten Hochregulation von TF nach kurzzeitiger 5-FU-Exposition ein weiterer Mechanismus der gerinnungsfördernden Wirkung diskutiert. Eine Überexpression von TF ist oftmals mit einer schlechten Prognose onkologischer Patienten assoziiert^{9,10}. TF ist jedoch nicht nur in der Lage, maligne Prozesse über gerinnungsabhängige Wege zu fördern, sondern kann auch über unabhängige Mechanismen wirken. So wirkt sich beispielsweise die Aktivierung intrazellulärer Protease-aktivierter Rezeptor-2-Signale positiv auf Prozesse wie Proliferation und Metastasierung aus⁸⁶. Vor diesem Hintergrund erscheint eine zusätzliche Expressionssteigerung durch 5-FU besonders interessant.

Neben dem direkten Einfluss zytostatischer Therapien auf die TF-Abundanz und den prokoagulant Phänotyp der CRC-Zelllinie HROC173 wurde auch der Effekt von zunehmend klinisch eingesetzten global und selektiv wirkenden CDK-Inhibitoren untersucht. Dabei wurden sowohl monotherapeutische als auch sequenzielle und simultane Behandlungsregime betrachtet. Die EMT, als wichtiger biologischer Prozess im Rahmen der Tumorentstehung und die Ko-Lokalisation von TF und PS, als möglicher Regulationsmechanismus der TF-Überexpression, waren ebenfalls Gegenstand der zellbiologischen Arbeiten. Im Folgenden werden die gewonnenen Ergebnisse im Zusammenhang mit der aktuellen Literatur diskutiert.

5.1 RELEVANZ VON TF AUF KARZINOMZELLEN NACH MONO- UND KOMBINATIONSTHERAPIEN

Der Zusammenhang zwischen malignen Neoplasien und dem Auftreten von VTEs ist seit langem bekannt. Dieses als „Trousseau-Syndrom“ bezeichnete Phänomen stellt eine gefürchtete Komplikation bei vielen Tumorpatienten dar^{82,87}. Die dabei auftretende Hyperkoagulabilität scheint zumindest teilweise durch eine erhöhte TF-Expression beziehungsweise TF-tragende Mikrovesikel bedingt zu sein^{88–90}.

Verschiedene onkogene Ereignisse, die bei der Entstehung von CRCs unter anderen eine entscheidende Rolle spielen, sind ebenfalls mit einer Überexpression von TF assoziiert. Dazu gehören insbesondere die Aktivierung des Onkogens *KRAS* sowie inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressorgens *TP53*^{13,91,92}. Insbesondere die dadurch ausgelösten MAPK- und Pi3K/AKT-Signalwege tragen zur Erhöhung der TF-Expression auf den Tumorzellen bei. Die basale TF-Abundanz von verschiedenen Zelllinien kann jedoch stark variieren. Dies geht auch aus den hier beschriebenen Daten in 1.4 hervor. Der direkte Vergleich von zwei CRC-Zelllinien (HROC173 und HROC257 T0 M1) zeigte ein relativ heterogenes Bild bezüglich der TF⁺-Zellen. Solche Unterschiede wurden auch in der Literatur bereits beschrieben, unter anderem in einer Studie von Kataoka *et al.* (1997). In dieser Arbeit wurde die Expression von TF auf mRNA-Ebene an 16 verschiedenen CRC-Zelllinien mittels Northern-Blot-Analyse untersucht. Das Ausmaß der TF-Expression variierte stark zwischen den verschiedenen Linien, wobei Zelllinien, die aus Metastasen etabliert wurden, generell höhere TF-Expressionen zeigten⁹³. Damit wird deutlich, dass die TF-Abundanz im Allgemeinen ein stark zelllinienspezifisches Charakteristikum darstellt.

Die höhere TF-Expression der HROC173 Zellen ist vermutlich mit molekularen Alterationen – in diesem Fall *KRAS*-Mutation – assoziiert, welche bei HROC257 T0 M1 Zellen nicht vorlag. Dies stützt die Hypothese, dass die Interaktion des TF:VIIa-Komplexes und des EGFR-Signalweges von einer *KRAS*-Mutation abhängt⁹⁴. Klinisch stellen CRCs mit einer *KRAS*-Mutation eine wichtige Untergruppe dieser Tumorentität dar, da etwa 40% der CRCs eine solche somatische Mutation aufweisen. Es erscheint daher naheliegend, dass eine Vielzahl von CRC-Patienten von einer erhöhten basalen TF-Abundanz und dementsprechend auch von einem erhöhten Thromboserisiko betroffen sein könnte.

Es ist bekannt, dass auch die Behandlung mit Chemotherapeutika zu einer weiteren Risikoerhöhung beiträgt^{82–84}. Diese ist zumindest teilweise auf eine erhöhte Expression und Aktivität von TF zurückzuführen^{95,96}. Der Einfluss von Chemotherapeutika auf die TF-Expression bei verschiedenen Tumorentitäten ist bislang jedoch nur wenig untersucht. Die Relevanz dieser Thematik wird vor allem vor dem Hintergrund deutlich, dass das Auftreten von VTEs bei

Tumorpatienten mit einer schlechteren Prognose und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist^{95,97}.

Aufgrund dieser präliminären Befunde wurde vermutet, dass die Behandlung mit 5-FU beziehungsweise Gem ebenfalls zu einer Erhöhung der TF-Abundanz führt. Diese Hypothese wurde durch die in dieser Arbeit erhobenen Befunde bestätigt. Sowohl die Behandlung mit 5-FU als auch mit Gem erhöhte die Anzahl der TF⁺-Zellen. Gleichzeitig konnte unter beiden Therapien eine Verkürzung der Gerinnungszeiten nachgewiesen werden. Besonders bemerkenswert war die Beobachtung, dass die TF-Hochregulation nicht nur eine akute „Stress-assoziierte“ Antwort darstellte, sondern bis zu 63 Tage nach einmaliger Exposition anhielt, mit Werten oberhalb des basalen Kontrollniveaus. Dies war insbesondere unerwartet, da die Zellen nach Sortierung der TF⁺-Zellfraktion ohne erneute Behandlung rekultiviert wurden. Bedingt ist dies vermutlich durch ein entstehendes Ungleichgewicht aus Gerinnungsaktivatoren (TF) und -inhibitoren (u.a. Protein C und S)⁸⁵. Erneute Behandlungen der Tumorzellen mit den chemotherapeutischen Substanzen führten jeweils zu einer weiteren Steigerung der TF-Abundanz bzw. stärker verkürzten Gerinnungszeiten (siehe Anhang, Abbildung 27). Es ist daher davon auszugehen, dass mit der Anzahl der durchgeführten Chemotherapiezyklen auch das thrombogene Potenzial der Tumorzellen zunimmt.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Wirkung von CDK-Inhibitoren untersucht, da diese Substanzen von zunehmender klinischer Relevanz sind und eine potenzielle Alternative bzw. Ergänzung zu den bisherigen Therapiemodalitäten darstellen. Daher wurden im Rahmen weiterer Untersuchungen der globale Inhibitor Dinaciclib, sowie die beiden selektiven CDKis Abemaciclib und THZ-1 betrachtet. Hierbei zeigte sich unter der Monotherapie mit Dinaciclib bzw. THZ-1 ein ähnliches Bild, wie schon in der Therapie mit den chemotherapeutischen Substanzen 5-FU und Gem. Erneut waren eine Zunahme der TF⁺-Zellen sowie verkürzte Gerinnungszeiten und damit die Ausbildung eines prokoagulant Phänotyps der Tumorzellen nachweisbar. Gegenteilige Effekte ergaben sich unter der Behandlung mit Abemaciclib. Hier kam es unter der Therapie interessanterweise zu einer beträchtlichen Verringerung der TF-Abundanz, die sich sogar deutlich unterhalb des Niveaus der basalen Kontrolle befand. Korrespondierend dazu zeigten sich im Clotting-Assay deutlich verlängerte Gerinnungszeiten, sodass in der Zusammenschau der Daten eine Reduktion der prokoagulant Aktivität nach Abemaciclib-Therapie geschlussfolgert werden kann. Auf dieser Basis könnte Abemaciclib einen interessanten Gegenspieler zur Zytostatika-induzierten Hochregulation von TF darstellen. Dieser Umstand könnte insbesondere im Hinblick auf die Reduktion tumorassoziierter thromboembolischer Komplikationen interessant sein. Abemaciclib ist bereits für die Therapie des Mammakarzinoms unter bestimmten Indikationen zugelassen⁶⁷. Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen wurde jedoch unter der Therapie mit Abemaciclib bei

Patientinnen mit Mammakarzinom ein gehäuftes Auftreten thromboembolischer Komplikationen beobachtet⁹⁸. Somit steht die in HROC173 Zellen beobachtete Abnahme der prokoagulanten Aktivität nach Abemaciclib-Therapie in Widerspruch zu den in der Studie von Watson *et al.* beschriebenen Befunden. Da es sich hierbei jedoch um zwei unterschiedliche Tumorentitäten handelt, erscheint es durchaus möglich, dass die Wirkung von Abemaciclib nicht immer einheitlich ist, sondern sich je nach Tumorentität unterscheidet. Zum besseren Verständnis dieses Sachverhalts bedarf es jedoch noch weiterer Studien, um die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen. Ebenso sollte der Einfluss von Abemaciclib auf TF-Abundanz und Gerinnung nach dauerhafter/längerer Exposition erfasst werden.

Aufgrund der klinischen Relevanz der hier eingesetzten Substanzen und der teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zwischen den beiden Substanzklassen (Antimetabolit vs. Targets), wurden zusätzlich sequenzielle und simultane Kombinationstherapien bestehend aus 5-FU und CDK-Inhibitoren durchgeführt. Die beobachteten Wirkungen in der Monotherapie waren unter 5-FU, Dinaciclib und THZ-1 analog. In den nachfolgenden Kombinationstherapien aus 5-FU und Dinaciclib beziehungsweise 5-FU und THZ-1 kam es jeweils zu etwas ausgeprägteren Effekten (höhere TF-Abundanz und kürzere Gerinnungszeiten) als in den Monotherapien mit den jeweiligen Substanzen. Die Ergebnisse vom sequenziellen und vom simultanen Therapieansatz zeigten hierbei keine nennenswerten Unterschiede. Insgesamt zeigte sich somit eine synergistische Wirkverstärkung von 5-FU in Kombination mit Dinaciclib bzw. THZ-1. Abemaciclib hingegen zeigte in der Monotherapie einen gegenteiligen Effekt, der durch eine Herunterregulation von TF und eine Verlängerung der Gerinnungszeit charakterisiert war. Daher war von besonderem Interesse, die Effekte der Kombination näher zu untersuchen. Hier zeigte sich sowohl in der sequenziellen als auch in der simultanen Kombinationstherapie, bestehend aus 5-FU und Abemaciclib, eine signifikante Reduktion der TF⁺-Zellen (unter das Kontrollniveau der basalen Zellen) sowie eine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeiten. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass die Verringerung der prokoagulanten Aktivität nicht nur bei der Monotherapie mit Abemaciclib auftritt, sondern auch unter Kombinationstherapien mit 5-FU erhalten bleibt.

Auch wenn der Einfluss von CDK-Inhibitoren auf die TF-Abundanz von Tumorzellen bisher noch wenig untersucht ist, konnte in anderen Studien bereits ein chemosensibilisierender Effekt nachgewiesen werden. So wurde in einer Studie von Takagi *et al.* gezeigt, dass SU9516 (Inhibitor von CDK 2, 1 und 4) über eine Verringerung der TF-Expression auf CRC-Zellen deren Sensitivität gegenüber 5-FU erhöhen kann. Dies macht die kombinierte Anwendung von 5-FU und CDK-Inhibitoren auch im Hinblick auf ein möglicherweise besseres Therapieansprechen interessant.

Insgesamt geht aus den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen vor allem Abemaciclib, angesichts seiner positiven Effekte auf die TF-Abundanz und damit auch auf die prokoagulante Aktivität von CRC-Zellen, als ein potenziell interessanter CDK-Inhibitor hervor. Die Tatsache, dass eine erhöhte TF-Expression weitere protumorale Effekte hervorruft, lässt vermuten, dass durch Abemaciclib auch andere positive Off-target Effekte infolge der Verringerung der TF-Abundanz zum Tragen kommen könnten. Aufgrund der beschriebenen Häufigkeit von Thrombosen unter Abemaciclib-Therapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom sind jedoch weitere Studien notwendig, um die Wirkung von Abemaciclib bei verschiedenen Tumoritäten besser einschätzen zu können.

5.2 EINFLUSS VON KURZZEITBEHANDLUNGEN AUF EMT-MARKER BEI CRC-ZELLEN

EMT ist nicht nur ein wichtiger Prozess in der embryonalen Morphogenese, sondern spielt auch eine Rolle bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen, die zur Tumorprogression beitragen^{15,100}. Zu den wichtigsten Mechanismen, die auch beim CRC von großer Bedeutung sind, zählen die Vermittlung von Multidrug-Resistenzen, die Förderung von Stammzeleigenschaften und die Befähigung der Tumorzellen zur Metastasenbildung^{100–103}. Zur Detektion von EMT eignen sich verschiedene Biomarker, die Aussagen über das Vorhandensein epithelialer bzw. mesenchymaler Eigenschaften von Tumorzellen erlauben¹⁵. Ein klassisches Merkmal von EMT ist die Hochregulation des mesenchymalen Markers N-Cadherin bei gleichzeitiger Abnahme der Expression von E-Cadherin. Dadurch werden die invasiven und migratorischen Eigenschaften verstärkt, sodass der sogenannte „Cadherin-Switch“ den Tumorzellen als Überlebensstrategie dient^{16,104}.

Insgesamt tragen die durch EMT ausgelösten Effekte maßgeblich zu einem schlechteren Outcome der Patienten bei. So konnte eine Studie von Lugli *et al.* an fast 1200 CRCs mit profizienter Mismatch-Reparatur zeigen, dass ein Verlust der E-Cadherin Expression mit erhöhtem N- und T-Stadium, vaskulärer Invasion sowie einem schlechterem Überleben der Patienten assoziiert ist¹⁰⁵.

In von der Arbeitsgruppe erzielten Vordaten zu dieser Arbeit konnte bereits eine Veränderung der Genexpression von bestimmten EMT-Markern nach 5-FU- bzw. Gem-Behandlung in TF⁺-gesorteten Zellen über einen Zeitraum von 63 Tagen nachgewiesen werden (siehe **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Dabei zeigte sich in beiden Fällen ein initialer Anstieg der Genexpression aller untersuchten Marker (Vimentin, Fibronectin, CTGF und MUC1). Eine anhaltende deutliche Erhöhung über einen Zeitraum von mindestens 63 Tagen wurde nur bei MUC1 bestätigt. Mehrere Studien konnten bereits einen Zusammenhang

zwischen MUC1 und erhöhter Proliferation, Invasivität, Metastasierung und schlechter Prognose beim CRC postulieren^{106–108}. Die Assoziation mit einer schlechten Prognose konnte jedoch bisher lediglich bei CRCs mit einer profizienten Mismatch-Reparatur nachgewiesen werden und ließ sich bei vererbaren Formen wie dem Lynch Syndrom nicht bestätigen¹⁰⁹. Ein Zusammenhang zwischen Tumortherapie und EMT konnte bereits von Tato-Costa *et al.* in einer Studie an Rektumkarzinomzellen gezeigt werden. Hierbei wiesen seneszente Tumorzellen nach neoadjuvanter Chemoradiotherapie EMT-Charakteristika auf¹¹⁰. Dies lässt eine mögliche Induktion von EMT-Prozessen in CRC-Tumorzellen durch Chemotherapeutika naheliegender erscheinen.

Um die unmittelbaren Effekte von Kurzzeitbehandlungen mit 5-FU und Gem bzw. CDKis zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene charakteristische EMT-Marker nach Behandlung mittels Immunfluoreszenzfärbung bzw. Durchflusszytometrie betrachtet. Im Rahmen dieser Kurzzeitbehandlungen von 48 Stunden ließen sich jedoch in beiden Fällen kaum Effekte auf die untersuchten EMT-Marker N-Cadherin, E-Cadherin und Claudin-7 nachweisen. Lediglich für die 5-FU-behandelten TF⁺-gesorteten Zellen zeigte sich unter der Behandlung mit Gem eine leichte Zunahme der N-Cadherin Intensität bei gleichzeitiger Verringerung von E-Cadherin im Sinne eines „Cadherin-Switches“. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die Effekte nach einer einmaligen Low-Dose Behandlung mit den jeweiligen Substanzen nachweisbar waren. Folglich scheint es zumindest für Gem naheliegend, dass insbesondere wiederholt durchgeführte oder höher dosierte Behandlungen zu einer EMT-Induktion beitragen könnten.

Weiterführende durchflusszytometrische Analysen wurden für die direkten und assoziierten EMT-Marker E-Cadherin, PD-L1 und GLUT-1 nach 5-FU und Abemaciclib Mono- bzw. simultaner Kombinationstherapie durchgeführt. Für E-Cadherin ließen sich dabei, konform zu den Ergebnissen in der Immunfluoreszenz, keine Unterschiede zwischen den Behandlungen nachweisen. Auch PD-L1 wurde nicht signifikant durch die Therapien induziert. Jedoch wiesen die TF⁺-gesorteten Zellen generell etwas höhere PD-L1-Abundanzen auf als die basalen Zellen. Ebenso führte Abemaciclib zu einem leichten Anstieg bei beiden Zelllinien (basal und TF⁺-gesortet). PD-L1 fungiert als wichtiger immunmodulatorischer Ligand und vermittelt globale immunsuppressive Effekte⁷⁹. Mittlerweile haben sich gegen PD-L1 bzw. PD-1 gerichtete Antikörper in der Therapie verschiedener Tumorentitäten etabliert¹¹¹. Auch beim CRC sind bereits drei verschiedene Immuncheckpoint-Inhibitoren (Ipilimumab, Nivolumab und Pembrolizumab) für bestimmte Indikationen zugelassen^{112–114}. Darüber hinaus konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass PD-L1 einen wichtigen Mediator der EMT bei verschiedenen Tumorentitäten darstellt, so auch beim CRC^{79,115}. In einer Studie von Zhi *et al.* wurde die Ko-Expression von PD-L1 und EMT-assoziierten Markern bei CRC-Zellen mit CSC-ähnlichen Eigenschaften

untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die CSCs neben einem EMT-Phänotyp auch hohe PD-L1 Level aufwiesen, was auf eine mögliche Strategie zur Immunumgehung dieser Zellen hindeutet¹¹⁵.

GLUT-1 hingegen ist ein EMT-Antagonist, führt jedoch zu verstärkter Zellproliferation^{80,81}. Bei den in dieser Arbeit erhobenen Daten ließ sich vor allem unter der Monotherapie mit Abemaciclib sowie unter der simultanen Behandlung mit 5-FU eine Reduktion der GLUT-1⁺-Zellen beobachten. Insgesamt werden hohe GLUT-1 Level beim CRC eher mit einer ungünstigeren Prognose und einem aggressiveren Phänotyp in Verbindung gebracht¹¹⁶. In einer Studie von Brophy *et al.* wurde GLUT-1 als möglicher prädiktiver Marker hinsichtlich des Ansprechens auf eine Chemoradiotherapie beim Rektumkarzinom identifiziert. Hier zeigte sich, dass das Ansprechen auf diese Therapie bei GLUT-1-negativen Tumoren deutlich besser war¹¹⁷. Vor diesem Hintergrund könnte die in dieser Arbeit nachgewiesene Abnahme von GLUT-1⁺-Zellen durch Abemaciclib auch beim CRC gegebenenfalls einen positiven Effekt bezüglich des Ansprechens auf Chemotherapie zeigen.

Insgesamt sind die Effekte von Chemotherapeutika und CDK-Inhibitoren auf EMT-Prozesse in Tumorzellen nur wenig untersucht und bedürfen weiterer Forschung, um gezielte Aussagen für verschiedene Tumorentitäten treffen zu können. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Arbeit nur unmittelbare Effekte auf EMT-Marker durch Low-Dose Kurzzeitbehandlungen mit 5-FU und Gem bzw. den CDK-Inhibitoren Dinaciclib, Abemaciclib und THZ-1 untersucht wurden. Um die Datenlage zu vervollständigen und die tatsächliche Wirkung der eingesetzten Substanzen besser einschätzen zu können, sind weitere Studien erforderlich, die insbesondere auch die Langzeiteffekte von wiederholten Therapien betrachten.

Die EMT stellt einen wichtigen Pathomechanismus bei der Entstehung und Progression zahlreicher Tumorerkrankungen dar. Obwohl bereits viele Erkenntnisse über die Rolle der EMT in der Pathogenese verschiedener Tumorentitäten vorliegen, ist der Einfluss therapeutisch eingesetzter Substanzen auf EMT noch nicht hinreichend verstanden. Vor diesem Hintergrund erscheint es wichtig, auch diesen Teilaspekt in Zukunft verstärkt in der Forschung zu berücksichtigen.

5.3 NACHWEIS DER KO-ABUNDANZ VON TF UND PS AUF CRC-ZELLEN

Neben dem TF selbst spielen auch Lipide in der Zellmembran eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der Blutgerinnung. Hierzu gehört insbesondere auch Phosphatidylserin (PS), welches sich als negativ geladenes Aminophospholipid physiologischerweise an der inneren, dem Zytoplasma zugewandten, Zellmembran befindet^{78,118}. Bei Gewebs- und damit

auch Membranschädigungen kommt es zu einer vermehrten Externalisierung von PS in die äußere Zellmembran. Dies ermöglicht die verstärkte Bildung von Tenase- (IXa, VIIIa und X) und Prothrombinase-Komplexen (Va, Xa und Prothrombin) und damit auch ein zügiges Fortschreiten des Gerinnungsprozesses¹¹⁹.

Die Bedeutung von PS auch für die Initiierung der prokoagulanten Aktivität von TF konnte in einer Studie von Kothari *et al.* (1997) gezeigt werden¹²⁰. Dort wurde u.a. untersucht, wie hoch der Anteil aktiver und kryptischer TF-Moleküle in verschiedenen Zelllinien ist. Dabei zeigte sich, dass auch Fibroblasten nur eine limitierte Fähigkeit zur Gerinnungsaktivierung besitzen, obwohl diese natürlicherweise über eine sehr hohe TF-Abundanz verfügen. Dies war darauf zurückzuführen, dass ein Großteil der TF-Moleküle (ca. 90%) in seiner kryptischen und damit inaktiven Form vorlag. Durch physikalische Schädigung und damit Imitation von Gefäßwandverletzungen konnte jedoch die TF:VIIIa-abhängige Xa-Bildung deutlich gesteigert werden, was auf eine PS-abhängige Aktivierung von TF hindeutet¹²⁰⁻¹²². Auch eine Studie von Rosas *et al.* (2020) zeigte vergleichbare Ergebnisse. Durch Zugabe von PS-enthaltenden Liposomen konnte auch hier die TF:VIIIa-abhängige Xa-Bildung erhöht und über Zugabe von Annexin V, ein an externalisiertes PS bindendes Protein, gehemmt werden¹²¹.

Phosphatidylserin wird auch im Rahmen der Apoptose an die äußere Zellemembran verlagert¹²³. Auch hierbei lässt sich eine Verstärkung von TF nachweisen^{120,121}. Da der prokoagulante Phänotyp von CRC-Zellen damit neben der Erhöhung von TF auch maßgeblich von der PS-Verlagerung an die äußere Zellmembran abhängt, wurde im Rahmen dieser Arbeit neben der TF-Abundanz zusätzlich auch die PS-Translokation mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurde zum einen der prozentuale Anteil der PS⁺ und damit apoptotischen Zellen ermittelt, zum anderen aber auch der Anteil der Zellen, die eine Ko-Lokalisation von TF und PS aufwiesen.

In den Kontrollzellen konnte nahezu keine Ko-Lokalisierung von TF und PS nachgewiesen werden, sodass hier eine räumliche Trennung der beiden gerinnungsfördernden Faktoren vorlag. Die Behandlung mit 5-FU, Abemaciclib bzw. deren Kombination führte zu einer Zunahme von PS⁺-Zellen. Eine hochsignifikante Erhöhung der PS⁺-Zellen ließ sich insbesondere durch Abemaciclib, jedoch nicht durch 5-FU induzieren. Dagegen stieg der Anteil TF⁺PS⁺-Zellen am meisten nach 5-FU Behandlung, was mit einem prokoagulantem Phänotyp einherging. Unter Abemaciclib war dies nicht nachweisbar, die TF⁺PS⁺-Zellen blieben hier leicht unterhalb des Niveaus der 5-FU-Therapie. Der Anteil der TF⁺PS⁺-Zellen unter den PS⁺ und damit apoptotischen Zellen war demnach bei den mit 5-FU behandelten Zellen höher als bei den mit Abemaciclib behandelten Zellen. Die Kombinationstherapien zeigten jeweils keinen Einfluss auf die TF/PS-Positivität.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Thromboembolische Ereignisse sind eine häufige und schwerwiegende Komplikation bei Patienten mit Krebserkrankungen, die u.a. auf eine Überexpression des Tissue Factors (TF) zurückzuführen sind. Sowohl der Einsatz von Chemotherapeutika als auch die häufig bestehende Immobilität nach chirurgischen Interventionen erhöhen das Thromboserisiko. Vor diesem Hintergrund ist die Etablierung von wirksamen Therapien, die gleichzeitig das Thromboembolierisiko senken, ein erstrebenswertes Ziel. Ein möglicher Therapieansatz sind Cyclin-abhängige Kinasen (CDK). CDK-Inhibitoren (CDKis) werden zunehmend klinisch erprobt und bereits in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Zytostatika 5-FU und Gemcitabin (Gem) sowie der CDK-Inhibitoren Dinaciclib, Abemaciclib und THZ-1 auf die TF-Abundanz und den prokoagulanten Phänotyp von CRC-Zellen zu untersuchen. Alle Untersuchungen wurden an der Patienten-abgeleiteten CRC-Zelllinie HROC173 durchgeführt. Dabei kamen sowohl monotherapeutische Behandlungen als auch sequenzielle und simultane Kombinationstherapien zum Einsatz. Im Rahmen der Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mit Ausnahme des selektiven CDK4/6-Inhibitors Abemaciclib alle Substanzen eine Steigerung der prokoagulanten Aktivität der Tumorzellen induzieren, charakterisiert durch erhöhte TF-Abundanzen und verkürzte Gerinnungszeiten. Interessanterweise zeigte Abemaciclib einen gegenteiligen Effekt und führte zu einer Abnahme der TF-Abundanz unter das Kontrollniveau sowie zu einer signifikanten Verlängerung der Gerinnungszeiten. Damit konnte ein günstiger Effekt auf den prokoagulant Phänotyp der HROC173 Zellen unter dieser Therapie nachgewiesen werden. In weiterführenden Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass die antikoagulante Wirkung von Abemaciclib auch bei simultaner bzw. sequenzieller 5-FU-Behandlung aufrecht erhalten bleibt. Mechanismen wie die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) waren nicht involviert. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Abemaciclib neben seinen antiproliferativen Eigenschaften auch günstige Auswirkungen auf die TF-Abundanz und damit auch die prokoagulante Aktivität von Tumorzellen haben kann.

Ein weiterer Befund der vorliegenden Untersuchungen ist die anhaltende Hochregulation des TF nach einmaliger Behandlung mit 5-FU bzw. Gem und Reaktivierung der Zellen ohne erneute Behandlung. Dies ist besonders interessant, da der TF über verschiedene Signalwege die Proliferation und Metastasierung initiiert und somit die Tumorprogression fördert. Dieser Umstand macht den TF selbst auch zu einem interessanten therapeutischen Ziel. Seit September 2021 ist in den USA mit Tisotumab-Vedotin ein erster gegen TF gerichteter Antikörper zur Behandlung von Patienten mit rezidiviertem oder metastasiertem Gebärmutterhalskrebs, der während oder nach einer Chemotherapie fortgeschritten ist, zugelassen. Klinische Studien

laufen auch für andere Tumorentitäten, einschließlich Patienten mit CRC, deren Ergebnisse ausstehend sind (*Clinicaltrials.gov identifier* NCT03485209).

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der selektive CDK-Inhibitor Abemaciclib als möglicher Gegenspieler zu einer Zytostatika-induzierten TF-Hochregulation identifiziert werden. Da die Aussagekraft von rein zellbiologischen Arbeiten jedoch limitiert ist, bedarf es weiterer Studien, um diese Effekte weiter zu untersuchen und so besser beurteilen zu können, ob Abemaciclib perspektivisch auch für die klinische Erprobung bei der Behandlung von CRC-Patienten in Frage kommt.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Unruh D, Horbinski C. Beyond thrombosis: the impact of tissue factor signaling in cancer. *J Hematol Oncol* 2020; 13: 93.
 2. Smith SA, Travers RJ, Morrissey JH. How it all starts: initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2015; 50: 326–336.
 3. Morawitz P. Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergeb Physiol* 1905; 4: 307–422.
 4. Gekle et al. *Taschenlehrbuch Physiologie*. 2. überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 2015.
 5. Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: The role of a bifunctional coagulation cofactor - ScienceDirect, <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0049384885902701?via%3Dihub> (accessed 18 August 2022).
 6. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134: 1087–1097.
 7. Leppert U, Eisenreich A. The role of tissue factor isoforms in cancer biology. *Int J Cancer* 2015; 137: 497–503.
 8. Ruf W, Yokota N, Schaffner F. Tissue Factor in Cancer Progression and Angiogenesis. *Thromb Res* 2010; 125: 10.1016/S0049-3848(10)70010-4.
 9. van den Berg YW, Osanto S, Reitsma PH, et al. The relationship between tissue factor and cancer progression: insights from bench and bedside. *Blood* 2012; 119: 924–932.
 10. Hisada Y, Mackman N. Tissue Factor and Cancer: Regulation, Tumor Growth and Metastasis. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45: 385–395.
 11. Hisada Y, Mackman N. Cancer-associated pathways and biomarkers of venous thrombosis. *Blood* 2017; 130: 1499–1506.
 12. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood* 2007; 110: 1723–1729.
 13. Yu JL, May L, Lhotak V, et al. Oncogenic events regulate tissue factor expression in colorectal cancer cells: implications for tumor progression and angiogenesis. *Blood* 2005; 105: 1734–1741.
 14. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 1982; 95: 333–339.
 15. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420–1428.
 16. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 178–196.
 17. Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 265–273.
-

18. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429–1437.
 19. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, et al. Cadherin switching. *J Cell Sci* 2008; 121: 727–735.
 20. Bates RC, Bellovin DI, Brown C, et al. Transcriptional activation of integrin $\beta 6$ during the epithelial-mesenchymal transition defines a novel prognostic indicator of aggressive colon carcinoma. *J Clin Invest* 2005; 115: 339–347.
 21. Chen Z, Fang Z, Ma J. Regulatory mechanisms and clinical significance of vimentin in breast cancer. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2021; 133: 111068.
 22. Cheng F, Shen Y, Mohanasundaram P, et al. Vimentin coordinates fibroblast proliferation and keratinocyte differentiation in wound healing via TGF- β -Slug signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: E4320–E4327.
 23. Milsom CC, Yu JL, Mackman N, et al. Tissue Factor Regulation by Epidermal Growth Factor Receptor and Epithelial-to-Mesenchymal Transitions: Effect on Tumor Initiation and Angiogenesis. *Cancer Res* 2008; 68: 10068–10076.
 24. Bourcy M, Suarez-Carmona M, Lambert J, et al. Tissue Factor Induced by Epithelial–Mesenchymal Transition Triggers a Procoagulant State That Drives Metastasis of Circulating Tumor Cells. *Cancer Res* 2016; 76: 4270–4282.
 25. Versteeg HH, Ruf W. Emerging Insights in Tissue Factor-Dependent Signaling Events. *Semin Thromb Hemost* 2006; 32: 024–032.
 26. Tissue factor isoforms in cancer and coagulation: May the best isoform win | Elsevier Enhanced Reader. DOI: 10.1016/S0049-3848(12)70020-8.
 27. van den Berg YW, van den Hengel LG, Myers HR, et al. Alternatively spliced tissue factor induces angiogenesis through integrin ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 19497–19502.
 28. Wu B, Zhou H, Hu L, et al. Involvement of PKC α activation in TF/VIIa/PAR2-induced proliferation, migration, and survival of colon cancer cell SW620. *Tumor Biol* 2013; 34: 837–846.
 29. Duden | Metastase | Rechtschreibung, Bedeutung, Definition, Herkunft, <https://www.duden.de/rechtschreibung/Metastase> (accessed 20 August 2022).
 30. Ott I, Weigand B, Michl R, et al. Tissue Factor Cytoplasmic Domain Stimulates Migration by Activation of the GTPase Rac1 and the Mitogen-Activated Protein Kinase p38. *Circulation* 2005; 111: 349–355.
 31. Che SPY, Park JY, Stokol T. Tissue Factor-Expressing Tumor-Derived Extracellular Vesicles Activate Quiescent Endothelial Cells via Protease-Activated Receptor-1. *Front Oncol* 2017; 7: 261.
-

32. Mueller BM, Reisfeld RA, Edgington TS, et al. Expression of tissue factor by melanoma cells promotes efficient hematogenous metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 11832–11836.
33. Versteeg HH, Spek CA, Peppelenbosch MP, et al. Tissue factor and cancer metastasis: the role of intracellular and extracellular signaling pathways. *Mol Med Camb Mass* 2004; 10: 6–11.
34. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–249.
35. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018. Robert Koch Inst. 2021;(13. Ausgabe): 172.
36. Baidoun F, Elshiwiy K, Elkeraie Y, et al. Colorectal Cancer Epidemiology: Recent Trends and Impact on Outcomes. *Curr Drug Targets* 2021; 22: 998–1009.
37. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* 2019; 11: 164.
38. Sonnenberg A, Genta RM. Helicobacter pyloriis a Risk Factor for Colonic Neoplasms. *Off J Am Coll Gastroenterol ACG* 2013; 108: 208–215.
39. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, et al. Genomic analysis identifies association of Fusobacterium with colorectal carcinoma. *Genome Res* 2012; 22: 292–298.
40. Greene FL, American Joint Committee on Cancer (eds). *AJCC cancer staging atlas*. New York, NY: Springer, 2006.
41. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Kolorektales Karzinom, Langversion 2.1, 2019, AWMF Registrierungsnummer: 021/007OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/kolorektales-karzinom/> [abgerufen am: 01.08.2022].
42. Ghoshal K, Jacob ST. An alternative molecular mechanism of action of 5-fluorouracil, a potent anticancer drug. *Biochem Pharmacol* 1997; 53: 1569–1575.
43. Wigmore PM, Mustafa S, El-Beltagy M, et al. Effects of 5-FU. In: Raffa RB, Tallarida RJ (eds) *Chemo Fog: Cancer Chemotherapy-Related Cognitive Impairment*. New York, NY: Springer, pp. 157–164.
44. Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt CL, et al. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol* 2004; 15: 1025–1032.
45. Kerr DJ. 5-Fluorouracil and folinic acid: interesting biochemistry or effective treatment? *Br J Cancer* 1989; 60: 807.

46. Dean L, Kane M. Fluorouracil Therapy and DPYD Genotype. In: Pratt VM, Scott SA, Pirmohamed M, et al. (eds) *Medical Genetics Summaries*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395610/> (2012, accessed 10 September 2022).
47. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 330–338.
48. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2021; 172.
49. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 1998; 35: 461–478.
50. Malumbres M, Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 222–231.
51. Bartkova J, Thullberg M, Slezak P, et al. Aberrant expression of G1-phase cell cycle regulators in flat and exophytic adenomas of the human colon. *Gastroenterology* 2001; 120: 1680–1688.
52. Lu J, Zhang ZL, Huang D, et al. Cdk3-promoted epithelial-mesenchymal transition through activating AP-1 is involved in colorectal cancer metastasis. *Oncotarget* 2016; 7: 7012–7028.
53. Huang P-H, Chen M-C, Peng Y-T, et al. Cdk5 Directly Targets Nuclear p21CIP1 and Promotes Cancer Cell Growth. *Cancer Res* 2016; 76: 6888–6900.
54. Thoma O-M, Neurath MF, Waldner MJ. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors and Their Therapeutic Potential in Colorectal Cancer Treatment. *Front Pharmacol*; 12, <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.757120> (2021, accessed 20 September 2022).
55. Zhu Y, Li K, Zhang J, et al. Inhibition of CDK1 Reverses the Resistance of 5-Fu in Colorectal Cancer. *Cancer Manag Res* 2020; 12: 11271–11283.
56. Riess C, Irmischer N, Salewski I, et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors in head and neck cancer and glioblastoma—backbone or add-on in immune-oncology? *Cancer Metastasis Rev* 2021; 40: 153–171.
57. Parry D, Guzi T, Shanahan F, et al. Dinaciclib (SCH 727965), a Novel and Potent Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther* 2010; 9: 2344–2353.
58. Johnson SF, Cruz C, Greifenberg AK, et al. CDK12 Inhibition Reverses De Novo and Acquired PARP Inhibitor Resistance in BRCA Wild-Type and Mutated Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cell Rep* 2016; 17: 2367–2381.
59. Cai D, Latham VM Jr, Zhang X, et al. Combined Depletion of Cell Cycle and Transcriptional Cyclin-Dependent Kinase Activities Induces Apoptosis in Cancer Cells. *Cancer Res* 2006; 66: 9270–9280.

60. Mita MM, Mita AC, Moseley JL, et al. Phase 1 safety, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib administered every three weeks in patients with advanced malignancies. *Br J Cancer* 2017; 117: 1258–1268.
 61. Booher RN, Hatch H, Dolinski BM, et al. MCL1 and BCL-xL Levels in Solid Tumors Are Predictive of Dinaciclib-Induced Apoptosis. *PLOS ONE* 2014; 9: e108371.
 62. Mita MM, Joy AA, Mita A, et al. Randomized phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2014; 14: 169–176.
 63. Stephenson JJ, Nemunaitis J, Joy AA, et al. Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth* 2014; 83: 219–223.
 64. Patnaik A, Rosen LS, Tolaney SM, et al. Efficacy and Safety of Abemaciclib, an Inhibitor of CDK4 and CDK6, for Patients with Breast Cancer, Non-Small Cell Lung Cancer, and Other Solid Tumors. *Cancer Discov* 2016; 6: 740–753.
 65. Gelbert LM, Cai S, Lin X, et al. Preclinical characterization of the CDK4/6 inhibitor LY2835219: in-vivo cell cycle-dependent/independent anti-tumor activities alone/in combination with gemcitabine. *Invest New Drugs* 2014; 32: 825–837.
 66. Raub TJ, Wishart GN, Kulanthaivel P, et al. Brain Exposure of Two Selective Dual CDK4 and CDK6 Inhibitors and the Antitumor Activity of CDK4 and CDK6 Inhibition in Combination with Temozolomide in an Intracranial Glioblastoma Xenograft. *Drug Metab Dispos* 2015; 43: 1360–1371.
 67. verzenios-epar-product-information_de.pdf, https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/verzenios-epar-product-information_de.pdf (accessed 23 September 2022).
 68. Kwiatkowski N, Zhang T, Rahl PB, et al. Targeting transcription regulation in cancer with a covalent CDK7 inhibitor. *Nature* 2014; 511: 616–620.
 69. Zhou Y, Lu L, Jiang G, et al. Targeting CDK7 increases the stability of Snail to promote the dissemination of colorectal cancer. *Cell Death Differ* 2019; 26: 1442–1452.
 70. Hu S, Marineau JJ, Rajagopal N, et al. Discovery and Characterization of SY-1365, a Selective, Covalent Inhibitor of CDK7. *Cancer Res* 2019; 79: 3479–3491.
 71. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 2018; 120: 5.1.1-5.1.11.
 72. BD FACSCalibur – Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, <https://zsa.med.uni-rostock.de/ausstattung/bd-facscalibur> (accessed 12 October 2022).
 73. Cytek Aurora – Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse, <https://zsa.med.uni-rostock.de/ausstattung/cytek-aurora> (accessed 12 October 2022).
-

74. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, et al. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2019; 1897: 299–311.
 75. Direct vs indirect immunofluorescence | Abcam, <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/direct-vs-indirect-immunofluorescence> (accessed 16 October 2022).
 76. Gires O, Pan M, Schinke H, et al. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev* 2020; 39: 969–987.
 77. Ansari SA, Pendurthi UR, Sen P, et al. The Role of Putative Phosphatidylserine-Interactive Residues of Tissue Factor on Its Coagulant Activity at the Cell Surface. *PLoS ONE* 2016; 11: e0158377.
 78. Spronk HMH, ten Cate H, van der Meijden PEJ. Differential roles of Tissue Factor and Phosphatidylserine in activation of coagulation. *Thromb Res* 2014; 133: S54–S56.
 79. Chen L, Xiong Y, Li J, et al. PD-L1 Expression Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Esophageal Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42: 2267–2280.
 80. Nilchian A, Giotopoulou N, Sun W, et al. Different Regulation of Glut1 Expression and Glucose Uptake during the Induction and Chronic Stages of TGF β 1-Induced EMT in Breast Cancer Cells. *Biomolecules* 2020; 10: 1621.
 81. Deng D, Xu C, Sun P, et al. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 2014; 510: 121–125.
 82. Fennerty A. Venous thromboembolic disease and cancer. *Postgrad Med J* 2006; 82: 642–648.
 83. Bozkaya Y, Özdemir N, Erdem GU, et al. Mortality risk analysis of asymptomatic and symptomatic venous thromboembolism in patients with metastatic colorectal cancer. *J Cancer Res Ther* 2018; 14: 1330–1335.
 84. Bao Y, Wan X, Fu J, et al. The risk of venous thromboembolism in cancer patients receiving chemotherapy: a meta-analysis with systematic review. *Ann Transl Med* 2021; 9: 277.
 85. Mandalà M, Barni S, Floriani I, et al. Incidence and clinical implications of venous thromboembolism in advanced colorectal cancer patients: The 'GISCAD-alternating schedule' study findings. *Eur J Cancer* 2009; 45: 65–73.
 86. Rees PA, Clouston HW, Duff S, et al. Colorectal cancer and thrombosis. *Int J Colorectal Dis* 2018; 33: 105–108.
 87. Akiyama T, Miyamoto Y, Sakamoto Y, et al. Cancer-related multiple brain infarctions caused by Trousseau syndrome in a patient with metastatic colon cancer: a case report. *Surg Case Rep* 2016; 2: 91.
 88. Del Conde I, Bharwani LD, Dietzen DJ, et al. Microvesicle-associated tissue factor and Trousseau's syndrome. *J Thromb Haemost JTH* 2007; 5: 70–74.
-

89. Sato T, Tsujino I, Ikeda D, et al. Trousseau's syndrome associated with tissue factor produced by pulmonary adenocarcinoma. *Thorax* 2006; 61: 1009–1010.
 90. Okada S, Miyagawa-Hayashino A, Fujinami J, et al. Trousseau's syndrome associated with pulmonary pleomorphic carcinoma exhibiting aggressive features: A case report. *Mol Clin Oncol* 2020; 12: 36–40.
 91. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 479–507.
 92. Rao B, Gao Y, Huang J, et al. Mutations of p53 and K-ras correlate TF expression in human colorectal carcinomas: TF downregulation as a marker of poor prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2011; 26: 593–601.
 93. Kataoka H, Uchino H, Asada Y, et al. Analysis of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor expression in human colorectal carcinoma cell lines and metastatic sublines to the liver. *Int J Cancer* 1997; 72: 878–884.
 94. Chen H, Wang X, Wan Y, et al. Crosstalk between TF/FVIIa and EGFR signaling in colorectal cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2019; 20: 454–460.
 95. Haddad TC, Greeno EW. Chemotherapy-induced thrombosis. *Thromb Res* 2006; 118: 555–568.
 96. Wang J, Weiss I, Svoboda K, et al. Thrombogenic role of cells undergoing apoptosis. *Br J Haematol* 2001; 115: 382–391.
 97. Sørensen HT, Mellekjær L, Olsen JH, et al. Prognosis of cancers associated with venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2000; 343: 1846–1850.
 98. Watson NW, Wander SA, Shatzel JJ, et al. Venous and arterial thrombosis associated with abemaciclib therapy for metastatic breast cancer. *Cancer* 2022; 128: 3224–3232.
 99. Takagi K, Sowa Y, Cevik OM, et al. CDK inhibitor enhances the sensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 2008; 32: 1105–1110.
 100. Zhang Y, Weinberg RA. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front Med* 2018; 12: 361–373.
 101. Hoshino H, Miyoshi N, Nagai K, et al. Epithelial–mesenchymal transition with expression of SNAI1-induced chemoresistance in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 390: 1061–1065.
 102. Fan F, Samuel S, Evans KW, et al. Overexpression of Snail induces epithelial–mesenchymal transition and a cancer stem cell–like phenotype in human colorectal cancer cells. *Cancer Med* 2012; 1: 5–16.
 103. Cao H, Xu E, Liu H, et al. Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review. *Pathol - Res Pract* 2015; 211: 557–569.
 104. Loh C-Y, Chai JY, Tang TF, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* 2019; 8: 1118.
-

105. Lugli A, Zlobec I, Minoo P, et al. Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules APC, β -catenin and E-cadherin in colorectal cancer—a tissue microarray-based analysis. *Histopathology* 2007; 50: 453–464.
 106. Niv Y. MUC1 and colorectal cancer pathophysiology considerations. *World J Gastroenterol WJG* 2008; 14: 2139–2141.
 107. Duncan TJ, Watson NF, Al-Attar AH, et al. The role of MUC1 and MUC3 in the biology and prognosis of colorectal cancer. *World J Surg Oncol* 2007; 5: 31.
 108. Bresalier RS, Niv Y, Byrd JC, et al. Mucin production by human colonic carcinoma cells correlates with their metastatic potential in animal models of colon cancer metastasis. *J Clin Invest* 1991; 87: 1037–1045.
 109. Lugli A, Zlobec I, Baker K, et al. Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. *J Clin Pathol* 2007; 60: 534–539.
 110. Tato-Costa J, Casimiro S, Pacheco T, et al. Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* 2016; 15: 170-178.e3.
 111. Shen X, Zhao B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: meta-analysis. *BMJ* 2018; 362: k3529.
 112. André T, Shiu K-K, Kim TW, et al. Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2020; 383: 2207–2218.
 113. Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2017; 18: 1182–1191.
 114. Lenz H-J, Cutsem EV, Limon ML, et al. First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *J Clin Oncol*. Epub ahead of print 12 October 2021. DOI: 10.1200/JCO.21.01015.
 115. Zhi Y, Mou Z, Chen J, et al. B7H1 Expression and Epithelial-To-Mesenchymal Transition Phenotypes on Colorectal Cancer Stem-Like Cells. *PLoS ONE* 2015; 10: e0135528.
 116. Yang J, Wen J, Tian T, et al. GLUT-1 overexpression as an unfavorable prognostic biomarker in patients with colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 8: 11788–11796.
 117. Brophy S, Sheehan KM, McNamara DA, et al. GLUT-1 expression and response to chemoradiotherapy in rectal cancer. *Int J Cancer* 2009; 125: 2778–2782.
 118. Zwaal RFA. Membrane and lipid involvement in blood coagulation. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Biomembr* 1978; 515: 163–205.
 119. Sengupta T, Koklic T, Lentz BR, et al. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine regulate the structure and function of FVlla and its interaction with soluble tissue factor. *Biosci Rep* 2021; 41: BSR20204077.
-

120. Kothari H, Pendurthi UR, Rao LVM. Analysis of tissue factor expression in various cell model systems: cryptic vs. active. *J Thromb Haemost JTH* 2013; 11: 1353–1363.
121. Rosas M, Slatter DA, Obaji SG, et al. The procoagulant activity of tissue factor expressed on fibroblasts is increased by tissue factor-negative extracellular vesicles. *PLOS ONE* 2020; 15: e0240189.
122. Maynard JR, Heckman CA, Pitlick FA, et al. Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells. *J Clin Invest* 1975; 55: 814–824.
123. Leventis PA, Grinstein S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 2010; 39: 407–427.
124. Du L, Li J, Lei L, et al. High Vimentin Expression Predicts a Poor Prognosis and Progression in Colorectal Cancer: A Study with Meta-Analysis and TCGA Database. *BioMed Res Int*; 2018. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1155/2018/6387810.
125. Toyama Y, Yasuda H, Saigusa S, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2013; 34: 2548–2557.
126. Yi W, Xiao E, Ding R, et al. High expression of fibronectin is associated with poor prognosis, cell proliferation and malignancy via the NF- κ B/p53-apoptosis signaling pathway in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2016; 36: 3145–3153.
127. Yang K, Gao K, Hu G, et al. CTGF enhances resistance to 5-FU-mediated cell apoptosis through FAK/MEK/ERK signal pathway in colorectal cancer. *OncoTargets Ther* 2016; 9: 7285–7295.

VIII. ANHANG

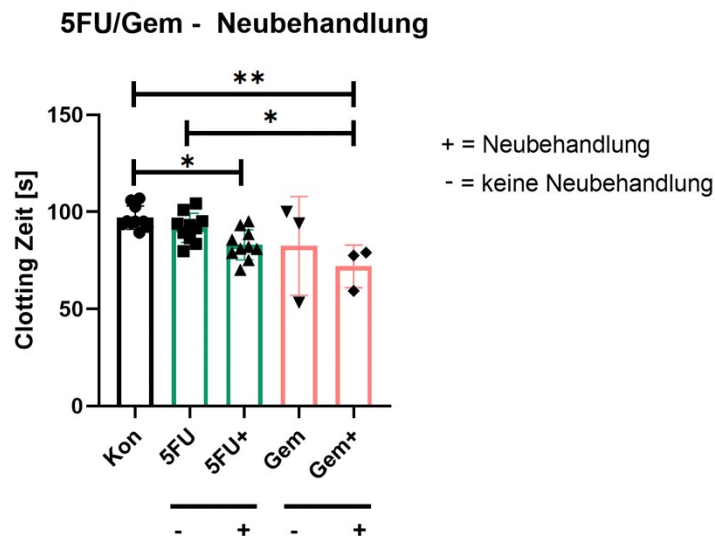
8.1 REEXPOSITION MIT ZYTOSTATISCHEN SUBSTANZEN VON 5-FU- UND GEM-BEHANDELTEN TF⁺-GESORTETE ZELLEN

ABBILDUNG 27: DARSTELLUNG DER GERINNUNGSZEITEN NACH NEUBEHANDLUNG DER 5-FU BZW. GEM-BEHANDELTEN TF⁺-GESORTETEN ZELLEN MIT 5-FU BZW. GEM

Die mit 5-FU bzw. Gem-behandelten und TF⁺-gesorteten HROC173 Zellen wurden jeweils mit 5-FU bzw. Gem über 48h erneut behandelt. Anschließend wurden die Gerinnungszeiten via Clotting-Assay bestimmt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt werden Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen biologischen Replikaten (n≥3). Die statistische Auswertung erfolgte nach Testung der Normalverteilung mittels one-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01. 5-FU – 5-Fluorouracil, Gem – Gemcitabin.

Abbildung 27 zeigt die Gerinnungszeiten nach Neubehandlungen für die mit 5-FU bzw. Gem-behandelten und TF⁺-gesorteten HROC173 Zellen. Hierfür wurden die TF⁺-gesorteten Zellen jeweils erneut über 48 Stunden mit der jeweiligen chemotherapeutischen Substanz (5-FU bzw. Gem) behandelt und anschließend erneut die Gerinnungszeiten gemessen. Als Kontrolle dienten dabei unbehandelte basale Zellen.

Für die Kontrolle ergab sich eine Gerinnungszeit von etwa 97 s. Die 5-FU behandelten TF⁺-gesorteten Zellen zeigten ohne Neubehandlung eine Gerinnungszeit von etwa 91 s und lagen damit etwas unterhalb der Kontrollzellen. Auch für die mit Gem behandelten TF⁺-gesorteten Zellen ließ sich mit ca. 82 s eine geringere Zeit als für die basalen Kontrollzellen ermitteln. Unter der Neubehandlung mit den jeweiligen chemotherapeutischen Substanzen zeigte sich jeweils eine weitere Verkürzung der Gerinnungszeiten. Im Rahmen der Neubehandlung mit 5-FU verkürzte sich die Zeit von etwa 97 s auf 83 s und unter der Neubehandlung mit Gem kam es zu einer Verkürzung um etwa 10 s auf 72 s.

8.2 VORDATEN: LANGZEITBEOBACHTUNG VON EMT-MARKERN

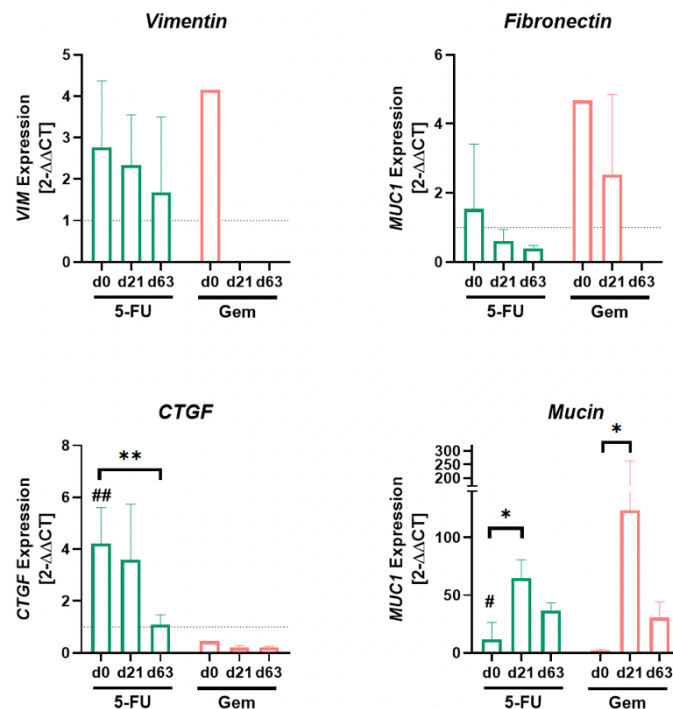


ABBILDUNG 28: DARSTELLUNG DER LANGZEITBEOBACHTUNG DER GEN-EXPRESSION VERSCHIEDENER EMT-MARKER VON 5-FU- BZW. GEM- BEHANDELTEN TF⁺-GESORTETEN HROC173 ZELLEN

Die RNA wurde isoliert, revers in cDNA transkribiert und eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Die mRNA-Spiegel der Zielgene wurden auf GAPDH normalisiert. Die Reaktionen wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und zweimal wiederholt. Das allgemeine Expressionsniveau jeder Probe wurde durch Berechnung von $2^{-\Delta\Delta CT}$ ($\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}}$) ermittelt. Unbehandelte Zellen wurden als Kalibrator verwendet. Mittelwert + SD, $n \geq 3$ unabhängige Experimente. ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ vs. unbehandelte Zellen; ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; two-way ANOVA (Turkey's multiple comparison test).

Dargestellt in Abbildung 28 ist die Veränderung der Genexpression verschiedener epithelialer und mesenchymaler Marker von 5-FU- bzw. Gem- behandelten TF⁺-gesorteten HROC173 Zellen über einen Zeitraum von insgesamt 63 Tagen. Hierbei wurde die Genexpression der vier verschiedenen Marker Vimentin, Fibronectin, CTGF und Mucin insgesamt an drei verschiedenen Zeitpunkten (d0, d21 und d63) ermittelt. Der mesenchymale Marker Vimentin wird häufig zur Detektion von EMT-Prozessen eingesetzt und eine Überexpression wird insbesondere beim CRC mit Förderung der Metastasierung und Invasivität sowie einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht^{124,125}. Dies gilt auch für das EZM-Glykoprotein Fibronectin, das unter anderem wichtige Aufgaben bei der Regulierung des Zellzyklus erfüllt¹²⁶. Hohe Expressionen des *Connective tissue growth factors* (CTGF) stellen ebenfalls einen Indikator für EMT dar und gehen beim CRC zudem mit einer verstärkten Resistenz gegen 5-FU-induzierte Apoptose einher¹²⁷. Darüber hinaus wurde auch die Expression des epithelialen

Markers MUC1 betrachtet, der eine positive Korrelation mit Proliferation, Invasivität und Metastasierung bei CRC-Patienten zeigt¹⁰⁶.

MUC1 war der Marker, der hier mit Abstand die größte Steigerung der Genexpression sowohl bei den mit 5-FU als auch bei den mit Gem behandelten Zellen zeigte. Auch nach 63 Tagen war hier noch eine deutliche Erhöhung von MUC1 bei beiden TF⁺-gesorteten Zelllinien zu registrieren. Für Vimentin, Fibronectin und CTGF fielen die Genexpressionslevel deutlich geringer aus. Hier zeigten sich jeweils initial leichte Erhöhungen, die jedoch über die Zeit nicht konstant blieben.

8.3 LEBENS LAUF

Persönliche Daten

| | |
|------------------------|---|
| Name, Vorname | Kayser, Annika Frizzi |
| Anschrift | Joachimsthaler Straße 6 16278 Angermünde |
| Geburtsdatum und -ort: | 17.07.1998, Schwedt/Oder |
| Telefonnummer: | +49162 9294 690 |
| E-Mail-Adresse: | annika_kayser@web.de |

Akademische Laufbahn

| | |
|-------------------|--|
| 10/2017 – 11/2024 | Studium der Humanmedizin (Staatsexamen) - Universität Rostock <ul style="list-style-type: none">• M3: 11/2024: 1,0• M2: 04/2023: 2,0• M1 09/2019: 2,0 |
| 2010 – 2016 | Abitur - Einstein-Gymnasium Angermünde <ul style="list-style-type: none">• Abschlussnote: 1,0 |

Praxis und Berufserfahrung

| | |
|-------------|--|
| 2023 | Famulatur in der Anästhesiologie und Intensivmedizin, Werner-Forßmann-Krankenhaus Eberswalde (30 Tage) |
| 2022 | Famulatur in der Kardiologie, Klinikum Ernst von Bergmann in Potsdam (30 Tage) |
| 2021 | Famulatur Innere Medizin, GLG Krankenhaus Angermünde (14 Tage) Famulatur im Notfallzentrum, Werner Forßmann Klinikum Eberswalde (30 Tage) |
| 2021 – 2022 | Studentische Hilfskraft in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Universitätsmedizin Rostock |
| 2020 | Famulatur „Praxis zum Alten Krug“, Woltersdorf (30 Tage) Famulatur Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, St. Elisabethen-Klinikum Ravensburg (30 Tage) |
| 2020 – 2022 | Tutor für Klinische Propädeutik und Untersuchungstechniken, Universitätsmedizin Rostock |

Sprachkenntnisse

| | |
|----------|---------------------------------|
| Deutsch | C2 (Muttersprache) |
| Englisch | C1 (Cambridge Zertifikat, 2020) |
| Spanisch | B1 |

8.4 PUBLIKATIONSLISTE

1) Kongressbeiträge

Kayser A, Bull J, Oehmcke-Hecht S, Bergmann W, Berlin P, Junghanss C, Maletzki C. Der Einfluss von Zytostatika und CDK Inhibitoren auf die Tissue Faktor Expression bei kolorektalen Karzinomzellen. *Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie. 7. bis 10. Oktober 2022*, Poster: P998

2) Originalarbeiten

Kayser A, Wolff A, Berlin P, Dühring L, Henze L, Mundkowski R, Bergmann W, Müller-Hilke B, Wagner C, Oehmcke-Hecht S, Maletzki C. 5-FU-driven activation of the extrinsic coagulation cascade in colorectal cancer cells can be abolished by selective, but not pan-CDK inhibition, in Begutachtung bei *Sci rep*

8.5 DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. C. Junghanß, Direktor der Medizinischen Klinik III – Klinik für Hämatologie, Onkologie und Palliativmedizin für die Aufnahme in sein großartiges Forschungsteam im Rahmen meiner medizinischen Doktorarbeit. Vom allerersten Tag an wurde ich vom gesamten Team der Arbeitsgruppe herzlich willkommen geheißen und integriert. Mein mit Abstand allergrößter Dank geht dabei an die Leiterin der Arbeitsgruppe Frau PD Dr. rer. nat. Claudia Maletzki. Ich hätte mir für meine Doktorarbeit keine bessere Betreuung wünschen können und kann mit ruhigem Gewissen sagen, dass ich ohne sie auch nie so eine Arbeit zustande gebracht hätte. Ihre unglaubliche fachliche Kompetenz sowie das Engagement und die Hingabe für die Forschungsarbeit beeindruckten mich immer wieder aufs Neue. Im Handumdrehen konnte ich dank ihrer Hilfe eine Vielzahl an praktischen Fertigkeiten erlernen. Auch für das unerschütterliche Vertrauen, das sie mir und meiner Arbeit von Anfang an zuteilwerden ließ, möchte ich mich an dieser Stelle nochmal herzlich bedanken. Ganz besonders wird mir auch ihre unvergleichliche Art in Erinnerung bleiben. Egal, wie groß das Arbeitspensum war, es war jederzeit möglich, Probleme anzusprechen, gemeinsam Lösungen zu suchen oder auch neue Ideen gemeinsam zu diskutieren. Am dankbarsten bin ich ihr jedoch dafür, dass durch die Arbeit mit ihr und ihrem Team mein ungeahnt großes Interesse an Forschung und experimentellen Arbeiten geweckt wurde! Durch die zahlreichen Denkanstöße und die spannenden Unterhaltungen habe ich während der gesamten Zeit immer mit riesigem Interesse und vor allem Spaß gearbeitet. Ich bin mir sicher, dass ich aus dieser wertvollen Zeit auch viel für meinen weiteren Weg mitnehmen werde.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Arbeitskollegen, die ich in meiner Zeit kennenlernen durfte. Jeder hatte stets ein offenes Ohr für Fragen und nie gezögert, bei jeglichem Problem zu helfen. Auch bei Frau J. Bull aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene sowie bei Frau M. Sc. Wendy Bergmann aus der Core Facility für Zellsortierung und Zellanalyse möchte ich mich für ihre fortwährende Unterstützung und Hilfe herzlich bedanken. Ein besonderer Dank geht auch an Frau M. Sc. N. Schönwälder, Frau M. Sc. I. Salewski, Thomas Freitag, Mareike Krause, Julia Henne, Leonie Engster, Paula Krone, Annabell Wolff und Friedericke Klauk. Die zahlreichen schönen Stunden mit euch werden mir immer in Erinnerung bleiben. Zweifellos wäre meine Zeit im Labor ohne euch nur halb so schön und lustig gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich es auch nicht versäumen, meinen Freunden und meiner Familie für Ihre Unterstützung von ganzem Herzen zu danken. Ihr seid ein einziges Geschenk. Nicht nur während dieser Zeit, sondern in jeder Lebenslage ist auf euch immer Verlass. Danke für jeden schönen Moment mit euch, für lange Gespräche, für eure Ratschläge, für Ablenkung vom stressigen Alltag, für jedes aufheiternde Wort. Kurz und knapp: Danke für alles.

IX. THESEN

1. Krebspatienten haben im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung ein etwa 6-fach erhöhtes Risiko, venöse Thromboembolien (VTE) zu entwickeln.
2. Die erhöhte Thromboseneigung ist u.a. auf eine Überexpression des Tissue Factors (TF) zurückzuführen und korreliert mit einer schlechten Prognose.
3. Mutationsbedingte Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, wie beispielsweise *K-ras* und *TP53* beim kolorektalen Karzinom (CRC), aber auch Hypoxie und epitheliale-mesenchymale Transition fördern die TF-Expression auf Tumorzellen.
4. Neue zielgerichtete Ansätze zur Behandlung des CRCs basieren u.a. auf dem Einsatz von Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren (CDKis).
5. Eine Kurzzeitbehandlung mit den Zytostatika 5-FU und Gemcitabin fördert die TF-Abundanz auf CRC-Zellen.
6. Die TF-Abundanz auf CRC-Zellen korreliert mit deren prokoagulantem Phänotyp.
7. Die Effekte von global- und selektiv-wirksamen CDKis auf die TF-Abundanz und das Gerinnungsverhalten von CRC-Tumorzellen sind individuell verschieden.
8. Abemaciclib reduziert in Mono- und Kombinationsbehandlung mit 5-FU die TF-Abundanz und reduziert prokoagulante Eigenschaften von CRC-Zellen.
9. Abemaciclib fungiert als Gegenspieler zur Zytostatika-getriggerten TF-Hochregulation.
10. Neben dem TF spielt auch das Vorliegen von Phosphatidylserin (PS) eine entscheidende Rolle für den Gerinnungsprozess. Die Zahl der TF- und PS-koabundanten Zellen (TF⁺PS⁺) ist nach 5-FU-Behandlung höher als nach Abemaciclib-Behandlung.
11. Kurzzeitbehandlungen mit zytostatischen Substanzen und CDKis haben nur geringen Einfluss auf die epitheliale-mesenchymale Transition.
12. Die Aussagekraft auf klinisches Anwendungspotenzial anhand von präklinischen Zellkultur-Untersuchungen ist stark beschränkt. Weitere präklinische Untersuchungen sind notwendig, um die erhobenen Ergebnisse zu verifizieren, und gegebenenfalls klinische Erprobungen in Betracht ziehen zu können.

X. EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

11.02.2025

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)