

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Marek Zygmunt)
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Der Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Proliferation, Zytokinsekretion,
Invasion und Migration humaner Mammakarzinomzelllinien**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des akademischen
Grades
Doktor der Medizin
(Dr. med.)
der
Universitätsmedizin
der
Universität Greifswald
2021

Vorgelegt von:
Anne Tischler
geboren: 20.08.1987
in: Rodewisch

Dekan:	Prof. Dr. med. Karlhans Endlich
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. Marek Zygmunt
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. Toralf Reimer
Ort, Raum:	Videokonferenz
Tag der Disputation:	07.01.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
1 Einleitung	10
1.1 Das Mammakarzinom.....	10
1.1.1 Anatomische Grundlagen der Brustdrüse	10
1.1.2 Epidemiologie	10
1.1.3 Einteilung und Klassifikation	12
1.1.4 Diagnostik.....	13
1.1.5 Therapie	14
1.2 Zytokine als Mediatoren des Immunsystems	16
1.3 Heparin.....	21
1.3.1 Aufbau	21
1.3.2 Wirkung auf die Blutgerinnung	22
1.3.3 Heparin und Karzinome	22
1.4 Zentrale Fragestellung der Arbeit	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Laborgeräte	25
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien	33
2.1.4 Zelllinien	39
2.1.5 Primer.....	40
2.1.6 Softwareprogramme	41
2.2 Methoden	42
2.2.1 Zellkultur.....	42
2.2.1.1 Kryokonservierung	42

2.2.1.2 Kultivierung der Zellen	42
2.2.1.3 Zellzählung.....	42
2.2.1.4 Zellaussaat für die Experimente	43
2.2.2 Bestimmung der Proliferation.....	44
2.2.3 Invasionsassay	45
2.2.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	46
2.2.5 Real-time RT-PCR.....	47
2.2.6 Life-Cell-Imaging: Wound-Healing-Assay (Scratch-Assay)	50
2.2.7 Statistische Auswertung	52
3 Ergebnisse	53
3.1 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Proliferation	53
3.2 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Zytokinsekretion	55
3.2.1 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	55
3.2.2 Real-time RT-PCR.....	63
3.3 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Invasion.....	68
3.4 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Migration	71
4 Diskussion	75
4.1 Heparin und sein Einfluss auf die Proliferation.....	75
4.2 Heparin und sein Einfluss auf die Zytokine	76
4.3 Heparin und sein Einfluss auf Migration und Invasion.....	80
4.4 Heparin und Tumoren.....	86
4.5 Methodik Zellkultur	88
5 Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis.....	92
Eidesstattliche Erklärung	119
Lebenslauf.....	120
Danksagung	122

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
BET	brusterhaltende Therapie
BRCA1	Breast Cancer 1-Gen
BRCA2	Breast Cancer 2-Gen
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	C-C-Motif
CCL	C-C-Motif Ligand
CCR	CC-Chemokinrezeptor
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTB	Cell Titer Blue®
CXC	C-X-C-Motif
CXCL	C-X-C-Motif Ligand
CXCL8	Interleukin 8
CXCL10	Interferon gamma-induced protein 10
CXCL12	Stromal cell-derived factor-1 alpha
CXCR1	CXC-Motif-Chemokinrezeptor 1
CXCR2	CXC-Motif-Chemokinrezeptor 2
CXCR3	CXC-Motif-Chemokinrezeptor 3
CXCR4	CXC-Motif-Chemokinrezeptor 4
CXCR7	CXC-Motif-Chemokinrezeptor 7
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epithelial Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
evtl.	eventuell

FCS	fetal calf serum, fetales Kälberserum
Gr.	Größe
h	Stunde(n)
HER2-neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HGF	Hepatocyte Growth Factor, Hepatozyten-Wachstumsfaktor
Hrsg.	Herausgeber
IL	Interleukin
IL-8	Interleukin 8
IL-11	Interleukin 11
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
LMWH	low molecular weight heparin
MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- κ B	nuclear factor kappa B
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
NMH	niedermolekulares Heparin
NST	no specific type
PAR-1	Protease-activated receptor-1
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
RANTES	Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	ribonucleic acid
RNS	Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SDF-1 α	Stromal cell-derived factor-1 alpha
sec	Sekunden
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TAM	tumorassoziierte Makrophage

TDLE	terminale duktulo-lubuläre Einheit
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
U/min	Umdrehungen pro Minute
u. a.	unter anderem
$\mu\text{g/ml}$	Mikrogramm pro Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
v. a.	vor allem
VEGF	Vascular Epithelial Growth Factor
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Stimulationsschema für die Zellaussaat in zwei 12-Well-Platten zur Gewinnung von Zellüberständen für Folgeexperimente	43
Abb. 1.2:	Stimulationsschema für die Zellaussaat in zwei 12-Well-Platten zur Gewinnung von Zellüberständen für Folgeexperimente	44
Abb. 2:	Darstellung des Prinzips des Invasionsassays mittels Boyden-Kammer vor und nach der Invasion der Zellen durch das Matrigel	46
Abb. 3:	Pipettierschema zur Zellstimulation für das Wound Healing Assay in einer 24-Well-Platte	51
Abb. 4:	Zellzahl MDA-MB-231-Zellen im Zeitverlauf über 48 Stunden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml HGF +/- 5 µg/ml Heparin. Messung mittels Vitalitätsassay CTB. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt	53
Abb. 5:	Zellzahl MCF-7-Zellen im Zeitverlauf über 48 Stunden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml HGF +/- 5 µg/ml Heparin. Messung mittels Vitalitätsassay CTB. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt	54
Abb. 6:	IL-8-Sekretion der MDA-MB-231-Zellen. Die Zytokinsekretion von IL-8 wurde bei MDA-MB-231-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF-β und SDF-1α +/- 5 µg/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.....	57
Abb. 7:	IL-11-Sekretion der MDA-MB-231-Zellen. Die Zytokinsekretion von IL-11 wurde bei MDA-MB-231-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF-β und SDF-1α +/- 5 µg/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.....	60

- Abb. 8: RANTES-Sekretion der MDA-MB-231-Zellen. Die Zytokinsekretion von RANTES wurde bei MDA-MB-231-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α +/- 5 μ g/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Exemplarisch wird die RANTES-Zytokinsekretion nach HGF-Stimulation gezeigt.....61
- Abb. 9: RANTES-Sekretion der MCF-7-Zellen. Die Zytokinsekretion von RANTES wurde bei MCF-7 Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α +/- 5 μ g/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Exemplarisch wird die RANTES-Zytokinsekretion nach HGF-Stimulation gezeigt.....62
- Abb. 10: Zusammenfassung real-time RT-PCR für IL-8 bei MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit HGF +/- 5 μ g/ml Heparin für 4, 8, 24, 48 Stunden. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt65
- Abb. 11: Zusammenfassung real-time RT-PCR für IL-8 bei MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit EGF +/- 5 μ g/ml Heparin für 4, 8, 24, 48 Stunden. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt67
- Abb. 12: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit HGF +/- 5 μ g/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt69
- Abb. 13: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit EGF +/- 5 μ g/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt69
- Abb. 14: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit TGF- β +/- 5 μ g/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt70
- Abb. 15: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit SDF-1 α +/- 5 μ g/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.....70

- Abb. 16: Wound-Healing-Assay. Mikroskopische Aufnahme von unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. Zellrasen nach manuell geschaffenen Defekt zum Zeitpunkt 0 Stunden (Ausgangswert)72
- Abb. 17: Wound-Healing-Assay. Mikroskopische Aufnahme von unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. Zellrasen zum Zeitpunkt 24 Stunden.....72
- Abb. 18: Darstellung Wound-Healing-Assay nach 24 Stunden. Vergleich unbehandelter MDA-MB-231-Zellen mit MDA-MB-231-Zellen, die nur mit 5 µg/ml Heparin sowie MDA-MB-231-Zellen, die mit den Stimulationsfaktoren HGF und EGF +/- 5 µg/ml Heparin behandelt wurden. Es wurden N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Verwendete Laborgeräte.....	25
Tabelle 1.2:	Verwendete Laborgeräte.....	26
Tabelle 2.1:	Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 2.2:	Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 2.3:	Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 2.4:	Verbrauchsmaterialien	30
Tabelle 2.5:	Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 2.6:	Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 2.7:	Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 3.1:	Reagenzien und Chemikalien für das zellbiologische Arbeiten.....	33
Tabelle 3.2:	Reagenzien und Chemikalien für das zellbiologische Arbeiten.....	34
Tabelle 4:	Reagenzien und Chemikalien für das biochemische Arbeiten	35
Tabelle 5:	Reagenzien und Chemikalien für das molekularbiologische Arbeiten.....	36
Tabelle 6.1:	Reagenzien und Chemikalien. Verwendete ELISA-Kits.....	37
Tabelle 6.2:	Reagenzien und Chemikalien. Verwendete ELISA-Kits.....	38
Tabelle 7:	Verwendete Zelllinien.....	39
Tabelle 8:	Verwendete Primer für die real-time-PCR.	40
Tabelle 9:	Verwendete Softwareprogramme.....	41
Tabelle 10:	Zyklen der real-time-PCR im Programm ABI PRISM 7000	50

1 Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen und die zweithäufigste Todesursache infolge von Krebserkrankungen nach dem Lungenkarzinom (Weinberger et Zikán 2016). Die Aufklärung dieses Krankheitsprozesses, seine Entstehung und die Entwicklung neuer Therapieansätze gehören zu den wichtigsten medizinischen Forschungsgebieten unserer Zeit.

1.1.1 Anatomische Grundlagen der Brustdrüse

Die weibliche Brustdrüse (Glandula mammaria) einer geschlechtsreifen Frau besteht aus etwa zwanzig Einzeldrüsen, die verzweigt in fibrösem Stroma eingebettet sind. Dieses Stroma zieht strangförmig von der Mamille bis in die Tiefe und unterteilt das Fettgewebe der Brust. Die so bindegewebig voneinander getrennten Lappen (Lobi) bestehen wiederum je etwa aus fünfzehn Drüsenläppchen (Lobuli). Das am Ende liegende Gangsegment mit dem Drüsenläppchen wird als terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE) bezeichnet. Diese terminalen Einheiten vereinigen sich über weitere Gangabschnitte zu den Milchgängen (Ductuli lactiferi). Über einen Ausführungsgang (Ductus excretorius) münden die Milchgänge in die Mamille. Die weibliche Brustdrüse ist eine exokrine Drüse, welche hormonellen Einflüssen unterliegt. Sie wird vor allem durch Östrogen, Progesteron, Aldosteron, Kortikosteroide und Wachstumsfaktoren beeinflusst (Böcker et al. 2012).

1.1.2 Epidemiologie

Mit circa 70.000 Neuerkrankungen im Jahr 2012 ist das Mammakarzinom die häufigste Tumorerkrankung des weiblichen Geschlechts. Die Inzidenz für das Mammakarzinom betrug für das Jahr 2014 etwa 115 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner. Jährlich versterben circa 18.000 Patienten an einem bösartigen Tumor der Brustdrüse (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2017).

Risikofaktoren

Das weibliche Geschlecht und das Patientenalter stellen die beiden größten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms dar. Für 2018 wurden in Deutschland circa 71.900 Neuerkrankungen erwartet, davon waren etwa ein Prozent der Betroffenen männlichen Geschlechts. Die meisten Fälle werden bei Patienten nach dem 50.

Lebensjahr diagnostiziert. Das Durchschnittserkrankungsalter betrug 2014 in Deutschland 64 Jahre (Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2017). Kommt es früher zum Auftreten eines Mammakarzinoms, muss immer auch eine genetische Disposition der Frauen in Betracht gezogen werden (Weinberger et Zikán 2016).

Einen besonderen Stellenwert nehmen hormonelle Faktoren bei den Patientinnen ein. Ist die Patientin über einen langen Zeitraum einem hohen endogenen Östrogenspiegel ausgesetzt, wie es bei einer frühzeitigen Menarche, einer späten Menopause, dichtem Brustdrüsengewebe sowie bei Kinderlosigkeit der Fall ist, steigt das Risiko, an einem bösartigen Tumor der Brust zu erkranken (McPherson et al. 2000). Mehrere Studien konnten bereits belegen, dass die Höhe des Östrogenspiegels mit dem Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken korreliert (Dunn et al. 2005; Eliassen et al. 2006). Auch orale Kontrazeptiva können das Erkrankungsrisiko bei Frauen mit lang andauernder Medikation minimal erhöhen (Marchbanks et al. 2002). Überwiegend werden orale Kontrazeptiva aber in einer Altersgruppe verordnet, in welcher Mammakarzinome selten auftreten, sodass dies die Inzidenz nur geringgradig beeinflusst (European Society for Human Reproduction and Embryology Capri Workshop Group 2004; Marchbanks et al. 2002). Eine postmenopausale Hormonersatztherapie muss ebenfalls als Risikofaktor betrachtet werden. Der alleinige Einsatz einer Östrogen- oder Östrogen-Gestagen-Therapie steigert das Karzinomrisiko allerdings nur gering, erst ab einer Anwendungsdauer von über 15 Jahren konnte eine Risikohöherhöhung festgestellt werden (Chen et al. 2006). Dahingegen führt eine kombinierte Östrogen-Gestagen-Therapie innerhalb weniger Jahre zu einem signifikanten Anstieg, des Risikos, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Dabei korreliert die Einnahmedauer mit der Risikohöhe. Wird die kombinierte Hormonersatztherapie wieder beendet, sinkt auch das Erkrankungsrisiko und normalisiert sich sogar wieder (Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe 2009). Dieser Fakt deutet darauf hin, dass eine kombinierte Östrogen- und Gestagen-Therapie das Wachstum bereits präexistenter Karzinome fördert, sie aber nicht induziert (Dietel et al. 2005; Dunn et al. 2005).

Die Familienanamnese ist ein weiterer entscheidender prognostischer Faktor und einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Fünf bis zehn Prozent der erkrankten Frauen haben eine Verwandte ersten Grades, welche ebenfalls betroffen ist. In doppelt so vielen Fällen litt bereits ein Verwandter zweiten Grades an einem bösartigen Tumor der Brust (Gayther et al. 1997; The Breast Cancer Linkage Consortium 1999; Liede et al. 2004). Bei einer familiären Häufung maligner Brusttumoren muss daher immer an eine genetische Prädisposition gedacht werden. Eine Abklärung auf

eine erbliche Mutation und eine entsprechende Beratung diesbezüglich sollten hierbei unbedingt empfohlen werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2018).

Auch die Lebensführung von Patienten spielt eine beeinflussende Rolle bei der Tumorentstehung. So steigert z. B. Übergewicht in der Postmenopause das Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms. Überwiegend sitzende Tätigkeiten und der regelmäßige Konsum von Alkohol stehen ebenso in der Diskussion, als Risikofaktoren zu gelten (Weitzel et al. 2005; Couch et al. 2008; Chenevix-Trench et al. 2006).

Benigne Tumoren der Brust (Anglian Breast Cancer Study Group 2000; McPherson et al. 2000) und eine erhöhte Dichte des Brustdrüsengewebes (Loman et al. 2001) sind weitere Faktoren, welche das Risiko steigern, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Die Dichte des Brustgewebes ist genetisch bedingt (Newman et al. 1998; Basham et al. 2002; Risch et al. 2001).

Eine Strahlenexposition wird oft im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumoren genannt. So steigert eine therapeutische Bestrahlung der Brust bzw. des Thorax, vor allem während des Brustwachstums, das Erkrankungsrisiko (McPherson et al. 2000).

Eine frühe erste Schwangerschaft und eine lange Stillzeit senken dahingegen das Risiko einer Erkrankung und gelten damit als protektive Faktoren (Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2015).

1.1.3 Einteilung und Klassifikation

Einteilung

Es werden benigne und maligne Tumoren der Brust unterschieden. Auf erstere, deren häufigster Vertreter das Fibroadenom ist, soll im Rahmen dieser Arbeit nicht detailliert eingegangen werden. Den Großteil der malignen Tumoren der Brustdrüse machen Adenokarzinome aus. Etwa 40 bis 75 Prozent gehen vom Milchgangepithel aus und werden als duktale Karzinome bezeichnet. Karzinome ausgehend vom Drüsenläppchenepithel werden lobuläre Karzinome genannt. Die World Health Organization (WHO) unterscheidet bei beiden Karzinomarten nicht-invasive und invasive Mammakarzinome. Zu den nicht-invasiven Formen werden das lobuläre Carcinoma in situ (LCIS) und das duktale Carcinoma in situ (DCIS) gezählt. Alle invasiven Karzinome gehen aus einer In-situ-Läsion hervor. Hier unterscheidet man das invasive duktale Karzinom (not otherwise specified, NOS), das invasive lobuläre Karzinom sowie weitere Tumoren, wie das tubuläre, das muzinöse, das medulläre, das kribriforme, das papilläre Karzinom und neuroendokrine Tumoren. Häufig metastasieren Mammakarzinome lymphogen und hämatogen (Kreienberg et al. 2010).

Klassifikation

Ein wichtiger Aspekt neben der Diagnosestellung ist die Feststellung der bereits stattgefundenen Ausbreitung des Tumors. Dazu wird die Klassifikation maligner Tumoren (TNM-Klassifikation) der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) herangezogen.

Die TNM-Klassifikation beruht auf der Feststellung dreier Komponenten:

1. der Ausbreitung des Primärtumors (T),
2. dem Fehlen oder Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen (N),
3. dem Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen (M).

Durch jeweiliges Zufügen von Ziffern kann anhand aller Komponenten die Ausbreitung der malignen Tumorerkrankung beschrieben werden. So sagt die Angabe T0 aus, dass es keinen Anhalt für einen Primärtumor gibt. Tis beschreibt das Vorliegen eines Carcinoma in situ und T1 bis T4 die zunehmende Tumorgöße und/oder die lokale Tumorausbreitung. N0 bedeutet, dass keine regionären Lymphknoten von Tumorzellen befallen sind. N1 bis N3 gibt wiederum die Anzahl der befallenen Lymphknoten an. M0 steht für das Nichtvorhandensein von Fernmetastasen, M1 dagegen für deren Bestehen. Handelt es sich um eine rein klinische Klassifikation, wird der Zusatz "c" verwandt (cTNM). Erfolgt die Klassifikation postoperativ durch die Histopathologie, wird der Zusatz "p" genutzt (pTNM). Wird die Tumordiagnose erst nach dem Tod mittels einer Autopsie gestellt bzw. erfolgt erst nach dem Versterben des Patienten die Tumorklassifikation, verwendet man den Zusatz „a“ (aTNM) (Wittekind 2017).

1.1.4 Diagnostik

Das Diagnostizieren und das Erkennen eines Mammakarzinoms in einem bereits frühen Krankheitsstadium ist eine fächerübergreifende Aufgabe, an der sowohl ambulante und klinisch tätige Gynäkologen, Chirurgen, Radiologen, Pathologen und nicht zuletzt die Patienten selbst beteiligt sind. Die Befunde einer zielgerichteten und Risikofaktoren erfassenden Anamnese, der klinischen Untersuchung inklusive der Tastuntersuchung der Brüste, apparativen Diagnostik (Sonographie, Mammographie, Magnetresonanztomographie), chirurgischen Abklärung sowie die pathomorphologische Untersuchung müssen interdisziplinär bewertet werden. Abklärungsbedürftige Befunde sollten mittels einer Probenentnahme (Stanzbiopsie, Vakuumbiopsie, offene Exzision) gesichert werden (Leitlinienprogramm Onkologie 2017).

1.1.5 Therapie

Das Mammakarzinom wird je nach Tumorstadium, Art der Tumorerkrankung und zunehmend auf den Patientenwunsch therapiert. Hierbei kommen verschiedene Therapieoptionen in Betracht, welche mitunter auch in Kombination angewandt werden.

Operative Therapie

Die Möglichkeit einer operativen Therapie richtet sich nach dem Tumorstadium. Alle nicht fortgeschrittenen Karzinome der Brust sollten primär operativ mit einer Entfernung des Tumors im Gesunden behandelt werden. Das Ziel ist ein tumorfreier Resektatrand (R0-Situation), der den wichtigsten Faktor zur signifikanten Reduktion von Lokalrezidiven darstellt. Der minimale Sicherheitsabstand zum Tumorgewebe sollte mindestens einen Millimeter betragen (Houssami et al. 2010). In Bezugnahme auf das postoperative Überleben der Patienten ist eine BET mit anschließender Radiotherapie einer Mastektomie gleichwertig (Fisher et al. 2001; Veronesi et al. 2002). Die radikale Mastektomie sollte dahingegen bei bspw. einem inflammatorischen oder multizentrischen Mammakarzinom angewandt werden. Auch bei bestehenden Kontraindikationen für eine anschließende Radiotherapie oder bei entsprechendem Patientenwunsch wird eine radikale Operation empfohlen (Fisher et al. 1994; New Zealand Guidelines Group 2009; Voogd et al. 2001). Zur operativen Therapie zählt des Weiteren die Bestimmung des Lymphknotenstatus, wobei primär das Sentinellymphknotenverfahren genutzt werden sollte. Bei entsprechender Indikation wird eine Axilladissektion empfohlen, wenn z. B. kein Sentinellymphknoten gefunden werden kann oder bereits ein positiver Lymphknotenstatus bekannt ist (Leitlinienprogramm Onkologie 2017).

Adjuvante Therapie

Adjuvante Therapien beinhalten alle Maßnahmen, welche nach einer Operation erfolgen. Beim Vorliegen eines invasiven Mammakarzinoms sollte postoperativ nach BET eine perkutane Bestrahlung erfolgen, welche die gesamte verbliebene Brust sowie die Thoraxwand einbezieht (Darby et al. 2011). Auch nach stattgehabter Mastektomie sollte die Thoraxwand nachbestrahlt werden, um die Lokalrezidivrate zu senken. Bei einem Tumorstadium von T3 bzw. T4 oder einem nicht tumorfreien Resektatrand (\geq R1-Situation) wird die Nachbestrahlung ausdrücklich empfohlen (Floyd et al. 2009; Kunkler 2010). Außerdem kann postoperativ eine systemische Therapie mittels Chemo-, endokriner oder Antikörpertherapie erfolgen. Alle Patienten mit einem Östrogenrezeptor- und Progesteronrezeptor-negativen bzw. einem fraglich endokrin sensitiven Mammakarzinom,

Patienten, die vor dem 35. Lebensjahr erkranken, die ein Karzinom mit dem Malignitätsgrad G3 aufweisen, Patienten mit einem Lymphknotenbefall oder die an einem HER2-neu-positiven Karzinom leiden, sollten postoperativ eine adjuvante, systemische Chemotherapie erhalten (Leitlinienprogramm Onkologie 2018; National Institute for Clinical Excellence 2009; Ferguson et al. 2007; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 2005; New Zealand Guidelines Group 2009). Liegt ein Östrogenrezeptor- und/oder Progesteronrezeptor-positiver Tumor vor, wird eine endokrine Therapie angeraten. Prämenopausal werden hierbei Tamoxifen und postmenopausal ein Aromatasehemmer der 3. Generation genutzt (Davies et al. 2011; Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group 1998; Burstein et al. 2010; New Zealand Guidelines Group 2009). Patientinnen mit HER2-neu-überexprimierendem Tumor mit einem Durchmesser von ≥ 1 cm sollten eine Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab erhalten (National Institute for Clinical Excellence 2009).

Neoadjuvante Therapie

Neoadjuvante Therapien beinhalten alle Maßnahmen, welche vor einer Operation erfolgen. Eine neoadjuvante systemische Therapie und/oder Bestrahlung empfiehlt sich bei primär nicht operablen Karzinomen, lokal fortgeschrittenen Tumoren und bei inflammatorischen Mammakarzinomen. Anschließend kann eine operative und zudem eine adjuvante Therapie wie eine postoperative Bestrahlung erfolgen (von Minckwitz et al. 2011).

Nachsorge

Ist die primäre Behandlung des Mammakarzinoms erfolgt, schließt sich unmittelbar der Beginn der Nachsorge an. Das Ziel ist, ein Rezidiv so frühzeitig wie möglich festzustellen (Rojas et al. 2005; National Breast and Ovarian Cancer Centre 2010b; Grunfeld et al. 2005). Nach der Primärtherapie werden engmaschige Kontrolluntersuchungen empfohlen. Sie sollte in den ersten drei Jahren nach der Primärtherapie alle drei Monate, im vierten und fünften Jahr zweimal jährlich und ab dem sechsten Jahr jährlich erfolgen (Khatcheressian et al. 2006).

Palliative Therapie

Bei bereits sehr weit fortgeschrittener Tumorerkrankung ohne Aussicht auf eine kurative Heilung oder therapielimitierenden Komorbiditäten erfolgt ein palliatives Therapiekonzept. Ziel ist hierbei eine bestmögliche Lebensqualität für die Patienten sowie eine lokale Tumorkontrolle. Begleitsymptome sollen erkannt und therapiert werden. Dazu gehören eine suffiziente Schmerztherapie, die Vorbeugung von Infektionserkrankungen, die Behandlung einer eventuellen Anämie sowie eine psychoonkologische Betreuung (National Comprehensive Cancer Network 2007).

1.2 Zytokine als Mediatoren des Immunsystems

Zytokine sind kleine, lösliche Proteine, die Einfluss auf die Interaktion und Kommunikation von Zellen nehmen können (Zhang et An 2007) und sind physiologisch an der Immunantwort unseres Körpers beteiligt (Dinarello 2008). Aufgrund ihrer Halbwertszeit wirken sie nur für eine kurze Zeit an einem bestimmten Ort. Zytokine können auf die sie sezernierende Zelle (autokrin), auf benachbarte Zellen (parakrin) oder auf weiter entfernte Zellen (endokrin) wirken (Zhang et An 2007). Typischerweise induzieren mehrere Zytokine zeitlich und räumlich gemeinsam eine Wirkung (Schütt, Bröker 2011).

Klassifikation und Eigenschaften

Der Oberbegriff „Zytokine“ fasst Lymphokine, Monokine, Chemokine und Interleukine zusammen. Die Unterscheidung der einzelnen Mitglieder beruht auf deren Eigenschaften. Aus der Gruppe der Zytokine sind für die vorliegende Arbeit insbesondere die Chemokine und Interleukine sowie deren Einfluss auf humane Mammakarzinomzelllinien relevant.

Chemokine fördern Entzündungsgeschehen im Körper und wirken chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems (Zhang et An 2007). Die Bezeichnung „Chemokin“ setzt sich zusammen aus den Begriffen *chemotactic* und *cytokines* (Deshmane et al. 2009). Chemokine haben eine Vielzahl von Effekten auf den menschlichen Organismus. Sie wirken regulierend auf das Immunsystem, sind Mediatoren, haben eine relevante Funktion bei Entzündungen sowie bei der Angiogenese und sind an der Aussaat von Tumorzellen im Organismus beteiligt (Xia et Frangogiannis 2007; Fernandez et Lolis 2002). Chemokine bestehen aus 60 bis 100 Aminosäuren und sind mit einer Molekülmasse von acht bis zwölf kDa relativ kleine Moleküle (Deshmane et al. 2009). Die Benennung der Chemokine erfolgt aufgrund ihrer N-terminalen Aminosäuresequenz, sodass CC-, CXC-, CX₃C- und C-Chemokine unterschieden werden können (Rollins 1997). Bei den CC-Chemokinen befinden sich zwei Cysteinreste im N-terminalen Bereich, wohingegen bei

der CXC-Familie diese beiden Cysteinreste durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt werden. Die Signaltransduktion erfolgt über G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren (Murdoch et Finn 2000).

Interleukine dagegen werden als Botenstoffe des Immunsystems betrachtet. Sie ermöglichen eine Art Kommunikation zwischen den an der Immunantwort beteiligten Zellen wie z. B. Makrophagen (Zhang et An 2007). Interleukine sind Proteine, die von einer Vielzahl an Zellen sezerniert werden können bspw. Endothelzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Sie interagieren jeweils nur mit einer begrenzten Anzahl von Zellen, die den jeweiligen spezifischen Interleukinrezeptor exprimieren (Akdis et al. 2011).

Im Folgenden werden verschiedene Zytokine genauer betrachtet, welche für die Versuche dieser Arbeit relevant waren.

Hepatocyte Growth Factor (HGF)

Bei HGF handelt es sich um ein Zytokin, welches von Fibroblasten im Stroma gebildet wird und aus einer α - und einer β -Kette besteht (Desiderio 2007). Die Rezeptorbindungsstelle befindet sich an der α -Kette. Der Rezeptor für HGF ist c-Met (Organ 2011). HGF beeinflusst viele physiologische Prozesse im menschlichen Organismus, u. a. die Zellmigration, Proliferation, Invasion und Angiogenese (Desiderio 2007). HGF und sein Rezeptor wurden im Vergleich zu duktalem in-situ-Läsionen in invasiven duktalem Mammakarzinomen vermehrt nachgewiesen (Jin et al. 1997). Hohe Konzentrationen von HGF im Tumorgewebe sind mit einem kürzeren rezidivfreien Überleben verbunden (Yamashita et al. 1994), eine hohe Konzentration an HGF im Serum mit einem höheren Metastasierungspotential (Lymphknotenmetastasen, Lebermetastasen, Gefäßinfiltration) (Taniguchi et al. 1995; Toi et al. 1998).

Epidermal Growth Factor (EGF)

Der Wachstumsfaktor EGF ist an einer Vielzahl physiologischer Vorgänge beteiligt. Einen wichtigen Aspekt nimmt dabei die Fähigkeit ein, zur Wundheilung beizutragen. EGF stimuliert u. a. Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen zur Proliferation und Migration beim Vorliegen eines Hautdefektes. EGF kann gut zur Therapie bei chronischen Wunden wie venösen Ulcera eingesetzt werden (Bodnar 2013). Sein Rezeptor EGFR gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen und in dieser zur Gruppe der ErbB-Unterfamilie (Wieduwilt et Moasser 2008). Die Bindung des Liganden EGF an seinen Rezeptor führt zur Stimulation von Zellwachstum und zur Hemmung von Apoptose

(Carpenter and, Cohen 1990; Alroy, Yarden 1997). Seine Aktivität nimmt entscheidend Einfluss auf das Wachstum, das Invasionsverhalten und die Entstehung von Metastasen (Normanno et al. 2006). Je mehr ein maligner Tumor die Liganden des Rezeptors EGFR produziert, umso aggressiver ist der Tumor und umso schlechter ist die Prognose für den Patienten. Dies zählt u. a. auch für das Mammakarzinom (Umekita et al. 2000).

Transforming Growth Factor β (TGF- β)

Das Zytokin TGF- β beeinflusst sowohl die Zellteilung, die Zelldifferenzierung, die Migration als auch die Zelladhäsion und den Zelltod (Massagué 1998). TGF- β kann hemmend in den Zellzyklus von epithelialen Zellen eingreifen, in dem es diesen in der G1-Phase unterbricht. Es gilt daher als Tumorsuppressor (Kretzschmar 2000). TGF- β beeinflusst sowohl gesundes Brustdrüsengewebe als auch Mammakarzinomgewebe. Beim Mammakarzinom wirkt TGF- β in frühen Krankheitsstadien aufgrund seiner antiproliferativen Eigenschaften als Tumorsuppressor (Pierce et al. 1995). In späteren Stadien unterstützt TGF- β dahingegen die Tumorausbreitung durch Beeinflussung der Invasion und Migration der Karzinomzellen und fördert somit die Metastasierung (Oft et al. 1996; Welch 1990). In diesen bereits fortgeschrittenen Krankheitsstadien konnte auch eine erhöhte TGF- β -Sekretion der Tumorzellen selbst beobachtet werden (Reiss et Barcellos-Hoff 1997).

Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α , CXCL12)

Das Chemokin SDF-1 α gehört zur CXC-Familie und beeinflusst die Chemotaxis, die Hämatopoese, die Angiogenese sowie das Metastasierungsverhalten von Tumoren. Physiologisch wird SDF-1 α von Stromazellen wie Fibroblasten und Endothelzellen sezerniert (Aust et al. 2001; Yun et Jo 2003). Es bindet an die Rezeptoren CXCR4 und CXCR7 (Raman et al. 2007). CXCR4 ist von entscheidender Bedeutung für den Prozess der Metastasierung, da er Teil der CXCL12-CXCR4-Achse ist. Über diese wird während der Embryogenese die Migration von Knochenmarkszellen (Nagasawa et al. 1996) und Zellen des Nervensystems gesteuert (Ma et al. 1998). Die Migration von Tumorzellen läuft ebenso über diese Achse (Raman et al. 2007). Müller et al. zeigten, dass SDF-1 α und sein Rezeptor CXCR4 entscheidend Einfluss auf die Metastasierung von Mammakarzinomen nehmen (Müller et al. 2001).

Interleukin 8 (IL-8, CXCL8)

Interleukin-8 ist ein Mitglied der CXC-Chemokinfamilie und gehört zu den proinflammatorischen Zytokinen (Sparmann et Bar-Sagi 2004). Es hat eine Molekülmasse von 8 kDa

(Möller et al. 1993) und wird von Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, Endothelzellen und Fibroblasten sezerniert (Zhang et Chen 2000). Der Rezeptor CXCR1 bindet hochspezifisch IL-8, wohingegen CXCR2 weniger spezifisch IL-8 und zusätzlich auch weitere Chemokine binden kann (Ahuja et Murphy 1996). Das Vorhandensein der IL-8-Rezeptoren an der Oberfläche von Granulozyten wurde erstmalig 1988 beschrieben (Peveri et al. 1988). CXCR1 und CXCR2 werden auf allen Granulozyten, Monozyten, Mastzellen sowie CD8-positiven T-Lymphozyten und CD56-positiven natürlichen Killerzellen exprimiert (Chuntharapai et al. 1994). Sobald IL-8 an einen neutrophilen Granulozyten bindet, erfolgt eine Herabregulation der Expression beider Rezeptoren. IL-8 wird enzymatisch abgebaut und die Rezeptoren können erneut an der Zelloberfläche exprimiert werden (Samanta et al. 1990). Die Rolle von IL-8 innerhalb von Tumorgeschehen ist bereits für eine Vielzahl verschiedener Tumorentitäten beschrieben worden, so zum Beispiel für das Kolonkarzinom (Nastase et al. 2011), das Pankreaskarzinom (Singh et al. 2010), das Harnblasenkarzinom (Urquidi et al. 2012), das Endometriumkarzinom (Ewington et al. 2012), das maligne Melanom (Singh et al. 2010), das Bronchialkarzinom (Lagiou et Trichopoulos 2012) und auch für das Mammakarzinom (Miller et al. 1998). So konnte zum einen gezeigt werden, dass IL-8 als Biomarker bei der Suche nach malignen Tumoren (Urquidi et al. 2012), als auch der IL-8-Serumspiegel als prognostischer Marker genutzt werden kann (Chen et al. 2012; Singh et al. 2010).

Interleukin 11 (IL-11)

IL-11 ist Mitglied der Glykoprotein 130 (gp130)-Familie, zu der u. a. auch IL-6, Oncostatin M (OSM) und Leukemia inhibiting factor (LIF) zählen. Sie alle wirken über den gp130-Signalweg (Xu et al. 2016). IL-11 kann als Ligand an die Rezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR7 binden (San-Miguel et al. 2015). IL-11 wirkt einerseits proinflammatorisch und kann andererseits die Produktion der proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6) hemmen (Xu et al. 2016; Prasad et al. 2015). Außerdem wirkt IL-11 auf die Gerinnung durch eine Erhöhung der Thrombozytenzahl in dem es die Megakaryozytopoese im Knochenmark stimuliert (Johnstone et al. 2015).

Auch maligne Tumoren können von IL-11 beeinflusst werden. Calon et al. beschrieben, dass IL-11 von tumorassoziierten Fibroblasten sezerniert wird und das Überleben von Tumorzellen sowie die Ausbildung von Metastasen beim Kolonkarzinom gefördert werden (Calon et al. 2012).

Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES, CCL5)

Das Chemokin RANTES gehört zur Gruppe der CC-Chemokine und hat eine Molekülmasse von 8 kDa (Azenshtein et al. 2002). Zahlreiche Zellen wie Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Zellen des Bronchialepithels und Thrombozyten sezernieren RANTES (Arima et al. 2000; Azenshtein et al. 2002). Es bindet an die Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 (Azenshtein et al. 2002). Physiologisch ist RANTES u. a. an Entzündungsreaktionen und der Chemotaxis von Leukozyten beteiligt (Hornung et al. 2001). Bekannt ist außerdem, dass humane Muttermilch eine hohe Konzentration dieses Chemokins enthält (Azenshtein et al. 2002). Luboshits et al. stellten die Theorie auf, dass Drüsenzellen der Mamma in der Lage sind, RANTES zu produzieren. Erhöhte Konzentrationen von RANTES konnten bei fortgeschrittenen Mammakarzinomen nachgewiesen werden (Luboshits et al. 1999).

Monokine induced by Interferon-Gamma (MIG, CXCL9)

MIG ist ein CXC-Chemokin. Es wird ebenso von Immunzellen wie T-Zellen, natürlichen Killerzellen (Smit et al. 2003), dendritischen Zellen (Muthuswamy et al. 2008), Eosinophilen (Tworek et al. 2013) und Makrophagen (Ikeda et al. 2014) als auch von Endothelzellen, Fibroblasten und Tumorzellen (Vandercappellen et al. 2008) sezerniert. MIG spielt vor allem bei Entzündungsvorgängen eine wichtige Rolle. Nach Sekretion durch eine der oben genannten Zellen bindet es an den Rezeptor CXCR3, welcher u. a. auf TH1-Zellen und natürlichen Killerzellen (Murdoch, Finn 2000), aber auch auf endothelialen und epithelialen Zellen exprimiert wird (Van Raemdonck et al. 2015). Für MIG ist außerdem bekannt, dass es Einfluss auf die Infiltration von Leukozyten und das Ansprechen auf Chemotherapien beim Mammakarzinom hat (Bronger et al. 2012; Denkert et al. 2010; Specht et al. 2009).

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1, CCL2)

MCP-1 ist Mitglied der CC-Chemokinfamilie und ein chemotaktischer Faktor für Monozyten (Deshmane et al. 2009). Es hat eine Molekülmasse von 13 kDa (Van Coillie et al. 1999). MCP-1 wird u. a. von Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Mikrogliazellen (Cushing et al. 1990; Standiford et al. 1991; Brown et al. 1992) bspw. unter dem Einfluss von oxidativem Stress oder Wachstumsfaktoren produziert (Deshmane et al. 2009). Das Molekül bindet an den Rezeptor CCR2, welcher sich auf der Oberfläche von Leukozyten befindet (Deshmane et al. 2009). Für Mammakarzinome wurde bereits beschrieben, dass eine erhöhte MCP-1-Expression von den Tumorzellen ausgeht (Ohta

et al. 2003; Chavey et al. 2007). Die Menge der MCP-1-Expression korreliert zudem mit der Infiltration des Tumors durch tumorassoziierten Makrophagen (TAM) (Sato et al. 1995). Eine hohe Anzahl an TAM korreliert wiederum mit einer schlechten Prognose für den Patienten (Ueno et al. 2000).

Interferon-gamma induced protein (IP-10, CXCL10)

IP-10 gehört zur Gruppe der CXC-Chemokine und wird von u. a. sezerniert von Endothelzellen, Fibroblasten und Makrophagen (Luster et Ravetch 1987). IP-10 hat eine Molekülmasse von 10 kDa (Luster et al. 1985) und bindet ebenso wie MIG an den Rezeptor CXCR3 (Murdoch et Finn 2000). CXCR3 kann in drei unterschiedlichen Varianten vorkommen: CXCR3-A, CXCR3-B und CXCR3-alt. IP-10 kann sowohl proliferationsfördern als auch antiproliferativ auf Zellen wirken, dies scheint abhängig vom Zelltyp und den Rezeptoren zu sein. Verschiedene Zelltypen weisen ein differenziertes Expressionsmuster der CXCR3-Rezeptoren auf (Liu et al. 2011). IP-10 ist des Weiteren in der Lage die Invasion zu fördern (Melillo et al. 2005) und chemotaktisch auf Immunzellen wie T-Zellen, Makrophagen und natürliche Killerzellen zu wirken (Liu et al. 2011). Mammakarzinomzellen sezernieren IP-10 und exprimieren CXCR3 (Datta et al. 2006).

1.3 Heparin

1.3.1 Aufbau

Heparin gehört zur Gruppe der körpereigenen Glykosaminoglykane. Das Heparinmolekül besteht aus langen, unverzweigten Ketten aus sulfatierten Disaccharidbausteinen (Niers et al. 2006). Aufgrund der hohen Anzahl an Sulfat- und Carboxylresten handelt es sich um ein stark negativ geladenes Molekül. Heparin kann daher Komplexe mit basischen Proteinen bilden. Physiologischerweise wird das 5 bis 30 kDa große Molekül von Mastzellen und basophilen Granulozyten sezerniert (Linhardt et al. 1988).

Im klinischen Alltag wird Heparin zur Prävention und Therapie von Embolien und venösen Thrombosen genutzt. Es wird als hochmolekulares bzw. unfraktioniertes Heparin (UFH) oder niedermolekulares Heparin (NMH) bzw. fraktioniertes Heparin therapeutisch eingesetzt. Unfraktioniertes Heparin hat eine Molekülmasse zwischen 12 und 14 kDa (Niers et al. 2006). Niedermolekulare Heparine sind mit 1 bis 10 kDa deutlich kleiner. Gewonnen wird Heparin aus der Schweinedarmmukosa, wobei UFH nach Extraktion und Hydrolyse isoliert wird. NMH werden wiederum aus UFH hergestellt, indem eine partielle Depolymerisation erfolgt. Jedes NMH unterliegt einer ganz individuellen Herstellung und weist somit auch unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften auf (Alban 2008).

1.3.2 Wirkung auf die Blutgerinnung

Dass Heparin eine hemmende Wirkung auf die Blutgerinnung hat, wurde erstmalig 1916 beschrieben (Hirsh et al. 2001). Seit Jahrzehnten werden UFH zur Vermeidung und Behandlung thromboembolischer Ereignisse wie Venenthrombosen oder Lungenarterienembolien in der Klinik eingesetzt. Die Wirkung von Heparin wird durch die Bindung an Antithrombin III (ATIII) induziert. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Antithrombins und dadurch zu einer Verbesserung seiner antithrombotischen Wirkung. Der so entstandene Heparin-ATIII-Komplex bindet zusätzlich den aktivierten Gerinnungsfaktor X (Faktor Xa) und inaktiviert diesen. Sowohl UFH als auch NMH können den Faktor Xa inaktivieren. UFH ist zudem in der Lage, den aktivierten Gerinnungsfaktor II (Faktor IIa) zu inaktivieren. NMH hat dagegen nur eine sehr geringe Wirkung auf den Faktor IIa (Niers et al. 2006).

Gegenwärtig werden in der klinischen Routine vorwiegend NMH angewandt, welche gezielt auf den Gerinnungsfaktor Xa wirken. Der Einsatz beider Heparine birgt jeweils für sich betrachtet Vor- und Nachteile. Bei UFH kann man auf eine jahrzehntelange Erfahrung zurückgreifen und seine Wirksamkeit über die Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (apTT) kontrollieren. Für die NMH bestehen aktuell noch geringere Erfahrungswerte. Ein Monitoring für NMH erfolgt über die Bestimmung der Anti-FXa-Aktivität, dieser Wert gehört jedoch nicht zu den Routineparametern des Gerinnungslabors. Im Gegensatz zu UFH, welche intravenös oder subkutan appliziert werden, können NMH ausschließlich subkutan verabreicht werden. UFH haben eine Halbwertszeit von nur 50 bis 60 Minuten, NMH dagegen eine doppelt so lange Halbwertszeit von 100 bis 120 Minuten. Studien haben belegt, dass NMH mit über 90 Prozent eine wesentlich höhere Bioverfügbarkeit haben als unfraktionierte Heparine mit nur etwa 20 Prozent (Harenberg et al. 1997).

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine gefürchtete Komplikation unter dem Einsatz von UFH, bei NMH tritt sie deutlich seltener auf. Eine weitere, weitaus häufigere Komplikation sind Blutungen, welche sowohl durch UFH als auch durch NMH begünstigt werden. Unfraktioniertes Heparin kann in einem solchen Fall vollständig durch Protamin antagonisiert werden, fraktioniertes Heparin dagegen nur partiell (Harenberg et al. 1997; Hirsch et al. 2001).

1.3.3 Heparin und Karzinome

Heparine können neben Antithrombin III noch eine Vielzahl weiterer Moleküle und Proteine binden (Hirsh et al. 2001). So ist anzunehmen, dass sie neben ihrer Wirkung auf

die Blutgerinnung noch eine Vielzahl weiterer Eigenschaften auf den menschlichen Organismus haben. Es konnte bereits 1992 von Prandoni et al. gezeigt werden, dass Heparine einen Einfluss auf das Überleben von Tumorpatienten haben können. Sie zeigten, dass die Mortalität von Tumorpatienten mit gleichzeitig bestehender Venenthrombose und Heparintherapie im Vergleich zu Tumorpatienten ohne eine solche Therapie, signifikant reduziert werden konnte (Prandoni et al. 1992). Zudem konnte in weiteren Studien gezeigt werden, dass die antikarzinogenen Effekte von Heparin auch bei Heparinderivaten auftraten, welche deutlich geringere antikoagulatorische Eigenschaften als UFH hatten. So reduzierten bspw. die Heparinderivate NAH-HCPS (Ono et al. 2002), LAC-Heparin (Yoshitomi et al. 2004) und ITF 1164 (Sciumbata et al. 1996) die Metastasierungsrate von Tumoren. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die antikarzinogenen Effekte von Heparin überwiegend unabhängig von seiner Wirkung auf die Blutgerinnung auftreten und somit separat zu betrachten sind.

1.4 Zentrale Fragestellung der Arbeit

Bereits Virchow stellte 1863 die Hypothese auf, dass es einen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und Entzündung im Gewebe gibt, als er Leukozyten in neoplastischem Gewebe sah (David 1988). In den letzten Jahren konnte diese These immer weiter untermauert werden, da die Erkenntnisse über den Zusammenhang von Tumorwachstum und gleichzeitig bestehenden Entzündungsprozessen im Tumorgewebe ständig wachsen. Zudem ist bereits bekannt, dass auch Heparine einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben. Es fiel in Studien auf, dass Patienten mit einem Tumorleiden, welche Heparine aufgrund eines thromboembolischen Ereignisses als Therapeutikum erhielten, im Vergleich zu Patienten ohne antikoagulatorische Medikation einen Vorteil in der Überlebenszeit und der Ausbildung von Metastasen hatten (Prandoni et al. 1992). Der Heparineffekt auf das Tumorwachstum beruht wohl überwiegend nicht auf seiner antikoagulatorischen Eigenschaft. Dies stellt einen wichtigen Angriffspunkt in der Untersuchung des Zusammenhanges bezüglich der Interaktion zwischen Heparin und verschiedenen Stimulationsfaktoren bzw. Chemokinen dar. In einer vorherigen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte bereits der Einfluss von Heparin auf endometriale Karzinomzelllinien beschrieben werden. Hier zeigte sich ein Einfluss von Heparin sowohl auf die Spontanproliferation, die Zytokinsekretion als auch auf das Invasionsverhalten der Tumorzellen (Schwarzig 2014).

Aus den in der Literatur bekannten Wirkungen von Heparinen auf verschiedenen Zelllinien leiten sich die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit ab:

- Welchen Einfluss hat unfraktioniertes Heparin auf die Proliferation von den humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7?
- Welchen Einfluss hat unfraktioniertes Heparin auf die Zytokinsekretion der proinflammatorischen Chemokine IL-8, IL-11, RANTES, MIG, MCP-1 und IP-10 in den humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7?
- Welchen Einfluss hat unfraktioniertes Heparin auf das Invasions- und Migrationsverhalten der humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7?

Für die Versuchsdurchführung wurden die zwei humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 *in vitro* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Abzug	Typ 2-453-GAHD	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Analysewaage	MC1 Analytic AC 210P	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav	MLS-3750	Sanyo, Moriguchi, Japan
Automatischer Flockeneisbereiter	AF 100	Scotsman Europe, Mailand, Italien
CO ₂ -Inkubator	CytoGROW GLP Series CO ₂ , MCO-18 AIC	Sanyo, Moriguchi, Japan
Fluoreszenz- Mikrotiterplatten- Lesegerät	FLUOstar Optima	BMG LABTECH, Ortenberg, Deutschland
Handdispenser	Multipipette@plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Inkubationsbad	Inkubations-/ Inaktivierungsbad 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland
Kühlsystem		
4°C	Premiere VKS 25046	Premiere Hausgerätetechnik, Ascheberg, Deutschland
-20°C	MDF-U333 WKS 3200	Sanyo, Moriguchi, Japan Liebherr, Bulle, Schweiz
-80°C	MDF-U53V	Sanyo, Moriguchi, Japan
-190°C	ARPEGE 70	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Mehrkanalpipetten	100 µl 300 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikrotiterplatten- waschgerät	Asys Atlantis	Biochrom Asys, Salzburg, Österreich

Tabelle 1.1: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Mikroskop	Nikon TMS	Nikon Instruments, Düsseldorf, Deutschland
PCR	7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Pipetten Pipettierhilfe	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl pipetus®-akku accu-jet®pro	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland BRAND GmbH, Wertheim, Deutschland
Reinstwasser- system	Synergy	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sicherheitswerk- bank	HERAsafe KS9	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
Thermomixer	Thermomixer 5437	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex- Reagenzglas- mischer	Vortex Mixer	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	LO - Laboroptik, Lancing, England
Zentrifugen	Centrifuge 5810 R Centrifuge 5415 R Rotilabo®- Mini-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 1.2: Verwendete Laborgeräte

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikel- nummer	Artikel- bezeichnung	Hersteller
Abdeckfolien: für ELISA für PCR	100- SEAL-PLT 676 070	SealPlate®: 676 070 VIEWseal™	Excel Scientific, Victorville, USA Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Abfallbeutel	861.197		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Allzweckdosen	2-1587		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Antistatisches Tuch	AK11.1		Kinetronics Europe GmbH, Bornheim, Deutschland
Aufbewahrungs- rack für PCR- tubes und -strips	2-2603 2-2604		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Einfrierröhrchen	122 263	Cryo.s™ 2ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einwegskalpell, steril	No.22	Feather Disposable Scalpel	Feather Safety Razor Co., Osaka, Japan
ELISA			
Mikroplatte	DY990	Clear Microplate	R&D Systems, Minneapolis, USA
Flüssigkeits- reservoir	E830.1	Rotilabo Flüssigkeits- reservoir, PVC	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2.1: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikel- nummer	Artikel- bezeichnung	Hersteller
Acrylglasgestell 2x12	1-5136		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Acrylglasgestell 4x12	1-5138		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Acrylglasgestell 6x12	1-5139		neoLab, Heidelberg, Deutschland
neoRack®- Röhrchengestell 9x9	2-1630		neoLab, Heidelberg, Deutschland
neoRack®- Röhrchengestell 7x7	2-1631		neoLab, Heidelberg, Deutschland
Unwire™ Half- Racks 3x3	5972-0430		NALGENE Labware/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hämozytometer Deckglas	BAA- 26402223		Armin Baack, Schwerin, Deutschland
Handschuhe	0923.1	Cryo-Gloves®, Größe: S	Tempshield, Mount Desert, USA (Bezug: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Handtuchpapier	HE 5402	Zick-Zack Handtücher	Heemann OHG, Falkensee, Deutschland
Indikatorband	8221.1	Indikatorband für Dampfsterilisation	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Klebeband	C6001210	Scotch® Crystal Clear	3M Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
Kryo-Einfriergerät	5100-0001	Mr. Frosty	NALGENE Labware/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kultivierungs- flasche	831813002	75 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2.2: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikel- nummer	Artikel- bezeichnung	Hersteller
Labor- und Hygienetücher	16515-00	zetBox©	ZVG Zellstoff-Vertriebs GmbH, Troisdorf, Deutschland
Glasflaschen 50 ml 100 ml 250 ml 2000 ml	21 801 17 5 21 801 24 5 21 801 36 5 21 801 63 5		DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Messzylinder 100 ml 500 ml	21 396 24 K851.1	Rotilabo®- Messzylinder aus PP	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Streifen	710980	8er-SoftStrips® mit Single Cap, 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
PCR-Platte		96 Well Polypropylen Microplatten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pinzette	1-1811	Pinzette, anatomisch	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl ohne Filter 10 µl mit Filter 100 µl mit Filter	720011 780012 780102	Micro Tips Premium SafeSeal Tips Premium SafeSeal Tips Premium	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland

Tabelle 2.3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikel- nummer	Artikel- bezeichnung	Hersteller
Pipettenspitzen 200 µl ohne Filter	70.760.002		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1000 µl ohne Filter	0030000-919	epT.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
1000 µl mit Filter	076927300		nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe, Deutschland
5000 µl ohne Filter	0030.000.978	epT.I.P.S.®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Direktver- drängerspitzen, unsteril			
1 ml	0030069.234	Combitips® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2,5 ml	022266306	Combitips® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5 ml	022266403	Combitips® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10 ml	022266501	Combitips® plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Direktver- drängerspitzen, steril			
2,5 ml	022496085	Combitips Biopur®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
5 ml	022496107	Combitips Biopur®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
10 ml	022496123	Combitips Biopur®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2.4: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikel- nummer	Artikel- Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäße 1,5 ml 2 ml	72.690.001 0030 123.344		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 5 ml 10 ml 25 ml	86.1253.001 86.1254.001 86.1685.001		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sichtschutz	C348.1		Op-d-Op, Roseville, USA (Bezug: Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Steigeinsatz für Kryoboxen	P898.2		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stoppuhr	0773.1	Rotilabo-Signal- Timer, Modell: SKT338N	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taschenrechner		Modell: KF01605	Q-CONNECT, Gent, Belgien
ThinCert™ Zellkultureinsätze für Multiwell- Platten	662 638	Format: 24 Well, Membranmaterial: PET, Porendurch- messer: 8,0 µm, Porendichte: 0,15x10 ⁶ , optische Eigenschaften (Membran): transluzent	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tabelle 2.5: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikel- nummer	Artikel- bezeichnung	Hersteller
Tischständer für Abfallbeutel	951.297		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Universelle Beschriftungs- klebebänder in verschiedenen Farben	2-640	10 Rollen + Dispenser	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Untersuchungs- handschuhe Gr. S	9421509	Peha-soft®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
	50706	Sterling Nitrile, puderfrei	Kimberly-Clark Professional, Roswell, USA
	700112	Nitra-Tex®	Ansell, Melbourne, Australien
Zählkammer		Neubauer Zähl- kammer	LO - Laboroptik, Lancing, England
Zellkulturplatten			
96-Well Mikrotiter- platte	167008	F26 MicroWell™ Plate	nunc/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
96-Well Mikrotiter- platte, U-Boden	650180		Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
24-Well Zellkulturplatte	353047		BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
12-Well Zellkulturplatte	353043		BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Artikelnummer	Artikelbeschreibung	Hersteller
Zentrifugenröhrchen 15 ml	62.554.502		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml	352070		BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellschaber	83.1832	16 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 2.7: Verbrauchsmaterialien

2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

a) Zellbiologisches Arbeiten

Chemikalien und Reagenzien	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
Cell Titer Blue® Cell Viability Assay	G8081		Promega, Madison, USA
Dimethylsulfoxid	D2438		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 96%		vergällt mit Mercaptoethanol	Universitätsapotheke der Ernst- Moritz-Arndt-Universität Greifswald
Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F- 12 (DMEM/F-12)	11039021		Gibco/Life Technologies, Carlsbad, USA
Epidermal Growth Factor (EGF)	50349	human, rekombinant Quelle: Escherischia coli	Biomol, Hamburg
Fetales Kälber- serum (FCS)	S0115		Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Gentamycin	PZN: 3928180	80 mg/2 ml	Ratiopharm, Ulm, Deutschland

Tabelle 3.1: Reagenzien und Chemikalien für das zellbiologische Arbeiten

Chemikalien und Reagenzien	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
Händedesinfektion	975512		BODE Chemie GmbH, Hamburg, Deutschland
Heparin Natriumsalz	H3149	9000 U/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hepatocyte Growth Factor (HGF)	94893	human, rekombinant Quelle: Insektenzellen	Biomol, Hamburg
Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS, steril)	L1825	(-) Calcium, (-) Magnesium, niedriger Endo- toxingehalt	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Stromal Cell- Derived Factor-1 α (SDF-1 α)	94842	human, rekombinant Quelle: Escherischia coli	Biomol, Hamburg
Transforming Growth Factor- β (TGF- β)	76861	human, rekombinant Quelle: Escherischia coli	Biomol, Hamburg
Trypanblau	T 8154	0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin EDTA 1x	252000- 56	0,25%	Gibco/ Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 3.2: Reagenzien und Chemikalien für das zellbiologische Arbeiten

b) Biochemisches Arbeiten

Chemikalien und Reagenzien	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	A7030	lyophilisiertes Puder, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS Trocken-substanz	L 182-50	ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Schwefelsäure	17025	96%	Fluka Analytical/ Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptavidin-Meerrettich-peroxidase	DY998		R&D Systems, Minneapolis, USA
Substrat Reagent Pack	DY999	Color Reagent A, (Wasserstoffperoxid) Color Reagent B, (Tetramethylbenzidine)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Invasionsassay			
BD Matrigel® Basement Membrane Matrix	356234	10,5 mg/ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Tabelle 4: Reagenzien und Chemikalien für das biochemische Arbeiten.

c) Molekularbiologisches Arbeiten

Chemikalien und Reagenzien	Artikelnummer	Produktangaben	Hersteller
RNA-Isolation			
Ethanol	9065.3	ROTIPURAN® ≥99,8%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichlormethan/ Chloroform	3313.2	ROTIPURAN® ≥99%, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-Propanol	1.136.100	chemsolute®, min 99.7%	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland
Trifast	30-2020		PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
RT-Reaktion			
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor	4374966	10x RT Random Primers, 10x RT Buffer, dNTP Mix (100 mM), RNase Inhibitor (2000 U, 20 U/μl), MultiScribe™ MuLV reverse transcriptase (50 U/μl)	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
PCR			
SYBR® Green PCR Master Mix	4309155	SYBR Green 1 Farbstoff, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Referenz, Pufferkomponenten	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 5: Reagenzien und Chemikalien für das molekularbiologische Arbeiten

d) Verwendete ELISA-Kits

ELISA-Kit	Artikel-Nummer	Beschreibung	Hersteller
Human CXCL-8/IL-8 DuoSet	DY208	<u>Fangantikörper:</u> Maus anti-human CXCL8/IL-8 Antikörper, polyklonal (720 µg/ml) <u>Detektionsantikörper:</u> biotinylierter Ziege anti-human CXCL8/IL-8 Antikörper, polyklonal (3,6 µg/ml) <u>CXCL8/IL-8 Standard:</u> rekombinantes humanes CXCL8/IL-8 (110 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human IL-11 DuoSet	DY218	<u>Fangantikörper:</u> Maus anti-human IP-10-Antikörper, polyklonal (360 µg/ml) <u>Detektionsantikörper:</u> biotinylierter Ziege anti-human IL-11 Antikörper, polyklonal (18 µg/ml) <u>IL-11 Standard:</u> rekombinantes humanes IL-11 (120 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human CXCL10/IP-10 DuoSet	DY266	<u>Fangantikörper:</u> Maus anti-human IP-10-Antikörper, polyklonal (360 µg/ml) <u>Detektionsantikörper:</u> biotinylierter Ziege anti-human IP-10 Antikörper, polyklonal (9 µg/ml) <u>CXCL10/IP-10 Standard:</u> rekombinantes humanes IP-10 (90 ng/ml)	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 6.1: Reagenzien und Chemikalien. Verwendete ELISA-Kits

ELISA-Kit	Artikel-nummer	Beschreibung	Hersteller
Human CCL2/MCP-1 DuoSet	DY279	<p><u>Fangantikörper:</u> Maus anti-human CCL2/MCP-1 Antikörper, polyklonal (180 µg/ml)</p> <p><u>Detektionsantikörper:</u> biotinylierter Ziege anti-human CCL2/MCP-1 Antikörper, polyklonal (18 µg/ml)</p> <p><u>CCL2/MCP-1 Standard:</u> rekombinantes humanes CCL2/MCP-1 (90 ng/ml)</p>	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human CXCL9/MIG DuoSet	DY392	<p><u>Fangantikörper:</u> Maus anti-human MIG-Antikörper, polyklonal (1080 µg/ml)</p> <p><u>Detektionsantikörper:</u> biotinylierter Ziege anti-human MIG Antikörper, polyklonal (36 µg/ml)</p> <p><u>MIG Standard:</u> rekombinantes humanes MIG (300 ng/ml)</p>	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human CCL5/RANTES DuoSet	DY278	<p><u>Fangantikörper:</u> Maus anti-human RANTES Antikörper, polyklonal (180 µg/ml)</p> <p><u>Detektionsantikörper:</u> biotinylierter Ziege anti-human RANTES Antikörper, polyclonal (3,6 µg/ml)</p> <p><u>RANTES Standard:</u> rekombinantes humanes CCL5/RANTES(120 ng/ml)</p>	R&D Systems, Minneapolis, USA

Tabelle 6.2: Reagenzien und Chemikalien. Verwendete ELISA-Kits

2.1.4 Zelllinien

Zelllinie	ATCC® Nummer	Beschreibung	Lieferant
MCF-7	HTB-22	epitheliales Adenokarzinom der Mamma, Pleuraerguss	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA
MDA-MB-231	HTB-26	epitheliales Adenokarzinom der Mamma, Pleuraerguss	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien

MCF-7-Zelllinie (Michigan Cancer Foundation-7)

Die MCF-7-Zelllinie ist eine humane, hormonsensitive Zelllinie, welche 1970 aus dem malignen Pleuraerguss einer 69-Jährigen Frau mit einem metastasierten, invasiven duktalem Adenokarzinom der Mamma isoliert werden konnte (Soule et al. 1973). Die Patientin wurde zuvor drei Jahre lang mittels Hormon- und Radiotherapie behandelt (Sweeney et al. 2012). Die Zellen sind Östrogenrezeptor positiv, Progesteronrezeptor positiv und weisen eine HER2-neu-Überexpression auf (Horwitz et al. 1975, Subik et al. 2010).

MDA-MB-231-Zelllinie

Die Zellen der Zelllinie MDA-MB-231 sind ursprünglich im Jahr 1974 aus dem Pleuraerguss einer 51-jährigen Patientin mit einem Adenokarzinom der Mamma gewonnen worden (Cailleau et al. 1978). Der Zellphänotyp ist fibroblastoid und gestreckt. MDA-MB-231-Zellen sind eine niedrig differenzierte und hochgradig aggressive, invasiv wachsende Zelllinie. Zudem sind die Zellen Östrogenrezeptor negativ, Progesteronrezeptor negativ und Her2-neu negativ (triple negativ) (Liu et al. 2003, Chavez et al. 2010).

2.1.5 Primer

Primer	Eigenschaften	Lieferant
human β-Aktin		
Vorwärtsprimer	Sequenz 5'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3' Länge: 18 bp Tm: 59°C GC-Gehalt: 61% Lage: Exon 4 (876 - 1057)	Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Rückwärtsprimer	Sequenz: 5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3' Länge: 20 bp Tm: 59°C GC-Gehalt: 60% Lage: Exon 5 (1058-10793)	Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, USA
human CXCL8		
Vorwärtsprimer	Sequenz: 5'-TCTTGGCAGCCTTCCTGATT-3' Länge: 20 bp Tm: 58°C GC-Gehalt: 50% Lage: Exon 1 (1 - 165)	Invitrogen/ Life Technologies, Carlsbad, USA
Rückwärtsprimer	Sequenz: 5'-TTAGCACTCCTTGGCAAACACTG-3' Länge: 22 bp Tm: 58°C GC-Gehalt: 45% Lage: Exon 2 (166 - 301)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, USA

Tabelle 8: Verwendete Primer für die real-time-PCR

2.1.6 Softwareprogramme

Programm	Verwendung	Hersteller
7300 System Sequence Detection Software v1.4.0	Datenerhebung real- time RT-PCR	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
GraphPad Prism 5.01	Statistische Auswertung, Grafiken	GraphPad Software Ins., San Diego/ USA
Microsoft Excel 2007	Datenverarbeitung	Microsoft Co, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft Power Point 2007	Bildbearbeitung	Microsoft Co, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft Word 2007	Textverarbeitung	Microsoft Co, Unterschleißheim, Deutschland
OPTIMA Software v2.10	Datenerhebung ELISA und CTB	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland
Primer Express® Software Version 3.0	Primerdesign	Applied Biosystems/ Life Technologies, Carlsbad, USA
ImageJ 1.51n	Bestimmung der Flächen beim Wound Healing Assay	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA

Tabelle 9: Verwendete Softwareprogramme

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Brustkrebszellen der Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 wurden für alle Experimente unter gleichen Bedingungen kultiviert.

2.2.1.1 Kryokonservierung

Die von Gibco/Life Technologies erworbenen Zelllinien wurden von einem technischen Assistenten für den Einfrierprozess vorbereitet. Die Zellen wurden hierfür in einer Suspension aus 90% FCS plus 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) zunächst bei -80°C für 24 Stunden in einem Kryocontainer eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Dabei sollte die Temperatur der Zellen im Kryo-Reaktionsgefäß um 1°C pro Stunde abgesenkt werden. Die Verwendung von DMSO dient zur Vermeidung der Bildung kleiner Eiskristalle, welche die Zellen zerstören könnten.

2.2.1.2 Kultivierung der Zellen

Für die Experimente wurden die benötigten Aliquots bei 37°C aufgetaut und die Zellen direkt in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche mit 10 ml frischem, 37°C warmem Vollmedium überführt. Dieses besteht aus DMEM/F-12, 10% FCS und $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ Gentamycin. Durch diesen Schritt konnte das für den Einfrierprozess benötigte DMSO auf eine nicht mehr zelltoxische Dosis von weniger als 1% verdünnt werden. Die so angelegte Zellkultur wurde bei 37°C kultiviert und bei einer erreichten Konfluenz von etwa 90% im Verhältnis 1:3 passagiert. Für die jeweiligen Experimente wurden die Zellen aus den 75 cm^2 Kulturflaschen mit jeweils 2 ml 0,25%-Trypsin-EDTA abgelöst, danach mit einer Stopplösung aus 8 ml PBS, 10% FCS und $10\text{ }\mu\text{l}$ Gentamycin ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$) abgestoppt und bei 130 U/min zentrifugiert.

2.2.1.3 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mittels einer Lösung aus gut resuspendierten Zellen und PBS im Verhältnis 1:10. Um abgestorbene Zellen zu erkennen, wurden $10\text{ }\mu\text{l}$ dieser Zell-PBS-Suspension zusätzlich 1:1 mit Trypanblau versetzt. Dadurch wurde eine Zellzahlverdünnung von 1:20 erreicht. Es erfolgte eine lichtmikroskopische Auswertung unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde die Gesamtzellzahl durch Auszählung der 4 großen Eckquadrate, die ihrerseits in 16 Kleinquadrate unterteilt waren, ermittelt. Die Zellzahl konnte somit pro ml berechnet werden.

$$\text{Zellkonzentration} = \frac{\text{gezählte Zellzahl} \times \text{Faktor Neubauer-Kammer} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}}$$

Faktor für die Neubauer-Kammer = 10^4

Verdünnungsfaktor = 1/20

2.2.1.4 Zellaussaat für die Experimente

Für die ELISA-Versuche wurden 80.000 Zellen pro Well einer 12-Well-Platte in 1 ml Vollmedium ausgesät. Nach 48 Stunden wurden sie mit den Stimulationsfaktoren HGF, EGF, SDF-1 α und TGF- β für 24 Stunden in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml und sowohl mit als auch ohne 5 μ g/ml Heparin stimuliert. Dabei wurde mit Quadruplikaten gearbeitet. Das zellkonditionierte Medium wurde 24 Stunden nach erfolgter Stimulation abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Stimulation der Zellen erfolgte nach folgendem Schema:

Platte 1

No treatment	No treatment	No treatment	No treatment
5 μ g/ml Heparin			
10 ng/ml Stimulus	10 ng/ml Stimulus	10 ng/ml Stimulus	10 ng/ml Stimulus

Abb. 1.1: Stimulationsschema für die Zellaussaat in zwei 12-Well-Platten zur Gewinnung von Zellüberständen für Folgeexperimente

Platte 2

10 ng/ml Stimulus + 5 µg/ml Heparin			
100 ng/ml Stimulus	100 ng/ml Stimulus	100 ng/ml Stimulus	100 ng/ml Stimulus
100 ng/ml Stimulus + 5 µg/ml Heparin			

Abb. 1.2: Stimulationsschema für die Zellaussaat in zwei 12-Well-Platten zur Gewinnung von Zellüberständen für Folgeexperimente

2.2.2 Bestimmung der Proliferation

Die Zellen wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte ausgesät, wobei pro Bedingung jeweils sechs Wells genutzt wurden. Im Anschluss wuchsen die Zellen über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt an. Daraufhin erfolgte eine Stimulation der Zellen mit den Wachstumsfaktoren HGF, EGF, SDF-1α und TGF-β in der Konzentration 100 ng/ml sowie mit und ohne 5 µg/ml Heparin. Die Messungen erfolgten nach 0 Stunden, also parallel zur Stimulation und des Weiteren nach 4, 8, 24 und 48 Stunden. Zur Messung wurden 20 µl Cell Titer Blue®-Reagenz pro Well zugegeben, nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 Stunde bei wiederum 37°C wurde die Messung am FLUOstar Optima Mikroplatten Lesegerät bei 590 nm durchgeführt.

Im Cell Titer Blue®-Assay wird Resazurin zu Resorufin umgesetzt, dafür sind mitochondriale Enzyme der Zellen nötig. Eine Umwandlung kann demnach nur durch vitale, also stoffwechselaktive Zellen erfolgen. Es wird davon ausgegangen, dass eine Zelle in einem bestimmten Zeitraum eine konstante Menge Resazurin zum fluoreszierenden Produkt Resorufin verstoffwechseln kann. Das Cell Titer Blue®-Assay kann somit als Vitalitätsassay genutzt und dadurch die relative Zellzahl bestimmt werden. Wird nun die Veränderung der relativen Zellzahl über einen definierten, längerer Zeitraum beobachtet, können wiederum Rückschlüsse über das Proliferationsvermögen der Zellen gezogen und das Cell Titer Blue®-Assay somit auch als Proliferationsassay genutzt werden.

2.2.3 Invasionsassay

Der Invasionsassay ist eine komplexe Methode zum Nachweis des invasiven Verhaltens von Zellen, um im Modell darzustellen, wie die unterschiedlichen Zellen sich bspw. bei Metastasierungsprozessen verhalten und ob sie sich durch verschiedene Stimulations- und Hemmverfahren beeinflussen lassen. Dazu wurden die verwendeten MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen in Inserts einer Boyden-Kammer, einer Art Well mit Membranboden, ausgesät und jeweils ein Insert in ein Well einer 24-Well-Platte verbracht. Vorher wurde in das jeweilige Well das Nährmedium und der jeweils verwendete Stimulus pipettiert. Die verwendeten Inserts oder ThinCertdsTM-TC-Einsätze für 24-Well-Platten mit einer Porengröße von 8,0 µm müssen vor der Zellaussaat mit Matrigel beschichtet werden, welches in diesem Modell die Basalmembran darstellt. Das Matrigel wird bei -20°C tiefgefroren gelagert und wurde vor Gebrauch über Nacht auf Eis aufgetaut, so erhielt es eine flüssige Konsistenz. Bei Zimmertemperatur kommt es zu einer Konsistenzveränderung von Matrigel, welches sich dann gelartig erweist und nicht mehr ausreichend gut zu pipettieren ist. Deshalb mussten für die Versuchsdurchführung die sterilen Pipettenspitzen sowie die Zellkulturplatten über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden, um dies zu verhindern. Die Gebrauchslösung zur Beschichtung der Inserts wurde dann aus 0,5 mg/ml Matrigel-Basement in DMEM/F-12 hergestellt. Jedes Insert wurde mit 60 µl Matrigel-Gebrauchslösung luftblasenfrei beschichtet und anschließend für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank auspolymerisiert. Es folgte jeweils ein zweimaliger Waschschriff mit 200 µl PBS, wobei darauf zu achten war, die Membran nicht mit der Pipettenspitze zu berühren. Danach wurden die vorher präparierten Inserts in die 24-Well-Platten mit 700 µl vorgelegtem Nährmedium überführt und je 100.000 Zellen in 250 µl Medium in jedes Insert pipettiert. Nach einer 18-stündigen Adhärenzphase bei 37°C erfolgte die Zellstimulation jeweils in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, SDF-1α und TGF-β ohne bzw. mit 5 µg/ml Heparin. Des Weiteren wurde eine Kontrolle mitgeführt, welche weder einen Stimulus noch Heparin enthielt. Vor der Zellstimulation wurde das alte Medium aus den Wells abpipettiert und durch neues Medium mit dem entsprechenden Stimulus und Heparin bzw. ohne dieses ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24, 48 und 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Aus allen Wells wurde das verbrauchte Medium abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die nun leeren Wells wurden jeweils mit 500 µl PBS gespült und das PBS danach verworfen. Nach Zugabe von 500 µl Trypsin pro Well wurde die 24-Well-Platte für 12 Minuten bei 37°C zur Ablösung der Zellen in den Brutschrank gestellt. Danach wurden 250 µl einer Stopplösung aus PBS und 10% FCS pro Well zugegeben. Nun wurde mit Hilfe eines flexiblen Zellschabers die Zellschicht an der Unterseite der Membran

abgeschabt und die sich an dem Zellschaber befindenden Zellen in dem entsprechenden Well abgelöst. Der Vorgang wurde einmal wiederholt. Zur Bestimmung der Zellzahl der invadierten Zellen wurde eine Messung mit Cell Titer Blue®-Reagenz durchgeführt. 150 µl Cell Titer Blue®-Reagenz wurden pro Well verwendet, anschließend eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach direkt am FLUOstar Optima Mikrotiterplatten Lesegerät bei 544 nm gemessen. Die Bestimmungen erfolgten alle in mindestens drei Durchläufen und es wurde immer eine Negativkontrolle aus Aqua dest. mitgeführt.

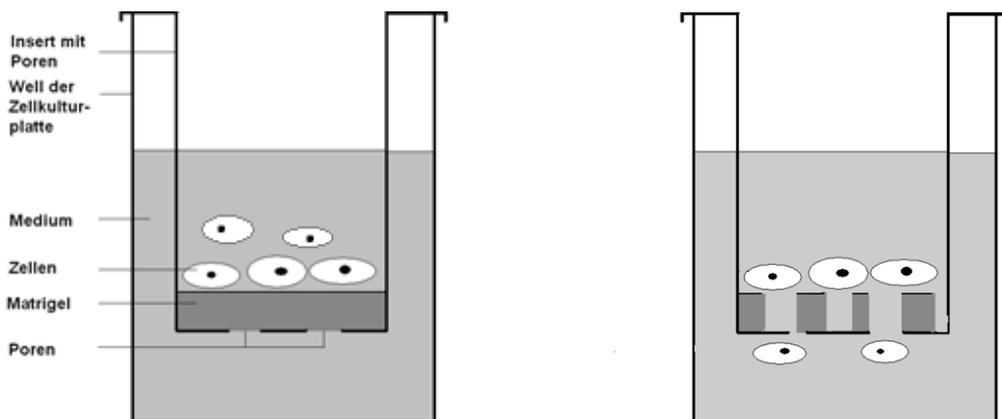


Abb. 2: Darstellung des Prinzips des Invasionsassays mittels Boyden-Kammer vor und nach der Invasion der Zellen durch das Matrigel

2.2.4 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Mit dem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay wurde die durch Stimulation mit Heparin und Wachstumsfaktoren (HGF, EGF, SDF-1a und TGF- β) induzierte Sekretion spezifischer Chemokine und Zytokine nachgewiesen. Dabei sollte überprüft werden, inwieweit diese Stimulationen die Sekretion von IP-10, MIG, MCP-1, RANTES, IL-8 sowie IL-11 der MCF-7- und MDA-MB-231-Zelllinien beeinflusst. Dabei kamen die DuoSet ELISA Kits der Firma R&D gemäß Herstellerangaben zum Einsatz. Anhand der mitgelieferten Arbeitsprotokolle wurden die ELISAs auf 96-Well-Platten pipettiert. Die Durchführung der ELISAs erforderte insgesamt drei Arbeitstage. Am Tag eins wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte mit dem jeweiligen Primärantikörper beschichtet. Nach Lagerung über Nacht bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit 400 µl pro Well Waschpuffer gespült und danach für eine Stunde mit 200 µl pro Well R&D-Puffer geblockt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden zum einen die ELISA-spezifische Standardreihe sowie die auf Eis aufgetauten und gelagerten Proben mit jeweils 100 µl pro Well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Tag wurden die Streifen in der Mikrotiterplatte erneut dreimal mit 400 µl Waschlösung gewaschen. Ein zweiter spezifischer

Detektionsantikörper wurde für zwei Stunden aufgetragen, welcher bei Produktion der Zellen der nachzuweisenden Chemokine bzw. Zytokine an diese binden konnte. Abschließend wurde erneut dreimalig gewaschen und Meerrettich-Peroxidase zum Farbnachweis aufgetragen. Die Farbreaktion wurde mit 50 µl 1 molarer 2 N H₂SO₄ abgestoppt. Es erfolgte eine umgehende Auswertung am FLUOstar Optima Mikroplatten Lesegerät. Für jeden ELISA und jede Zelllinie wurden jeweils mindestens drei Durchläufe durchgeführt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2007 und dem Statistikprogramm Graph Pad Prism 5.01.

2.2.5 Real-time RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNA, in der die Ausgangsprodukte (cDNA) in jedem Zyklus vermehrt werden und die entstandenen DNA-Moleküle wiederum als Ausgangspunkt für weitere Zyklen dienen. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green), welcher durch die DNA-Produktion aktiviert wird, kann auf die amplifizierte DNA-Menge rückgeschlossen werden.

Die real-time Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction (real-time RT-PCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren, bei der eine Umschreibung von mRNA in cDNA erfolgt und sich eine Vervielfältigung der DNA anschließt. Bei einer real-time-PCR wird somit in Echtzeit die produzierte DNA-Menge mittels Fluoreszenz gemessen. SYBR Green lagert sich dabei in die doppelsträngige DNA ein. Mit dieser semiquantitativen Methode ist es möglich, Veränderungen in der Transkription eines bestimmten Gens nachzuweisen.

RNA-Isolation

Die beiden verwendeten Zelllinien wurden mit einer definierten Zellzahl in 48-Well-Platten ausgesät. Dazu wurden pro Well 250 µl Zell-Medium-Suspension (DMEM-F12, 10% FCS und 50 µg/ml Gentamycin) genutzt. Es wurden 20.000 Zellen in 250 µl DMEM/F12 Vollmedium pro Well ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Danach erfolgte die Zellstimulation. Neben den verwendeten Stimulationsfaktoren HGF, EGF, TGF-β und SDF-1α, die jeweils in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml ohne bzw. mit 5 µg/ml Heparin eingesetzt wurden, verwendeten wir zusätzlich reines Nährmedium ohne jeglichen Zusatz eines Stimulus sowie ein Nährmedium, welches einzig mit Heparin versetzt wurde. Nach den Stimulationszeiten von 4, 8, 24 und 48 Stunden wurden die Zellüberstände abpipettiert und verworfen. Auf den verbliebenen Zellrasen wurden jeweils 250 µl TriFast/TRIZOL aufgetragen, die Zellen dadurch lysiert und das entstandene Zelllysate-TriFast-Gemisch bis zur RNA-Isolierung in 1,5 ml

Eppendorfgefäße bei -80°C eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurden bei Raumtemperatur jeweils 24 Reaktionsgefäße mit dem enthaltenen Zellysat-TriFast-Gemisch aufgetaut. Nach Zugabe von $50\ \mu\text{l}$ Chloroform wurden sie gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation bei $12.000\ \text{U}/\text{min}$ bei 4°C . Etwa $100\ \mu\text{l}$ des jeweiligen wässrigen Überstandes wurden abgenommen und in ein neues $2,0\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß überführt. Dabei musste gründlichst beachtet werden, keine Anteile der entstandenen Interphase oder TriFast mit in die Pipettenspitze aufzuziehen. Es wurden $125\ \mu\text{l}$ Isopropanol zugegeben und sorgfältig gemischt. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte erneut eine Zentrifugation bei $12.000\ \text{U}/\text{min}$ und 4°C . Hieraufhin wurden $250\ \mu\text{l}$ 75% Ethanol zugegeben und sofort bei $8.000\ \text{U}/\text{min}$ für sechs Minuten bei 4°C zentrifugiert. Erneut wurden die Überstände abgenommen und die nun entstandenen Pellets, welche die RNA enthalten, für zehn Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Letztlich wurden die trockenen Zellpellets durch wiederholtes Pipettieren in $42\ \mu\text{l}$ ddH_2O gelöst und für 15 Minuten im Thermomixer bei einer Temperatur von 60°C und minimal möglicher Schüttelstärke inkubiert. Abschließend wurden die RNA-Proben auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Transkription der isolierten RNA in cDNA (Reverse Transkriptase-, RT-Reaktion)

Die RNA-Isolation, die im vorherigen Abschnitt bereits beschrieben wurde, ergibt erfahrungsgemäß eine relativ konstante RNA-Konzentration für eine anschließende real-time-PCR. Auf eine RNA-Messung und Konzentrationsanpassung wurde daher im Folgenden verzichtet. Dennoch auftretende Schwankungen können durch die Verwendung unseres housekeeping-Gens β -Aktin ausgeglichen werden. Die bei -80°C gelagerten RNA-Proben wurden jetzt mit einem „High-Capacity-cDNA-Reverse-Transcription-Kit with RNase-Inhibitor“ der Firma Applied Biosystems umgeschrieben. Pro Durchlauf wurde die RNA von je 24 Proben in cDNA transkribiert. Dazu wurden die eingefrorenen Reaktionsgefäße langsam auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde der Master-Mix hergestellt. Dieser setzt sich zusammen aus $2\ \mu\text{l}$ RT-Buffer, $0,8\ \mu\text{l}$ dNTPs, $2\ \mu\text{l}$ Random Hexamer Primers, $9,2\ \mu\text{l}$ ddH_2O , $1\ \mu\text{l}$ RNase-Inhibitor und $1\ \mu\text{l}$ Multiscribe™ Reverse Transkriptase ($50\ \text{U}/\mu\text{l}$). Bis auf den RNase-Inhibitor und Multiscribe™ RT, welche bis zur Verwendung bei -20°C verblieben, wurden alle anderen Materialien aufgetaut. Die Proben sowie Kit-Bestandteile wurden vor dem Pipettieren jeweils noch einmal gevortext. Insgesamt wurden pro Reaktionsgefäß $16\ \mu\text{l}$ Master-Mix benötigt, zu denen jeweils $4\ \mu\text{l}$ einer RNA-Probe pipettiert wurden. Die Berechnung für den Master-Mix erfolgte anhand der benötigten Probenanzahl mit zusätzlichen 10% Reserve für

eventuelle Pipettierungenauigkeiten. Die 24 RNA-Proben plus Master-Mix wurden anschließend in den Eppendorf Mastercycler-Gradient gestellt und das Programm „RT ABI 2007“ und somit die RT-Reaktion gestartet.

Programm RT ABI 2007:

- 1) 10 Minuten 25°C,
- 2) 120 Minuten 37°C,
- 3) 5 Sekunden 85°C,
- 4) 4°C bis zur Probenentnahme aus dem Gerät.

Nach der RT-Reaktion wurde die cDNA in jedem Reaktionsgefäß durch Zugabe von 70 µl ddH₂O verdünnt. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Real-time-PCR

Von der bereits gewonnenen cDNA werden für die real-time-PCR von jeder Probe 3 µl pro PCR-Ansatz eingesetzt. Der verwendete Master-Mix besteht aus 0,5 µl Vorwärtsprimer (6 µM), 0,5 µl Rückwärtsprimer (6 µM), 5 µl SYBR Green PCR Master-Mix und 1 µl ddH₂O. Die real-time-PCR wurde in 96-Well-PCR-Platten pipettiert, in welche 7 µl Master-Mix pro Well vorgelegt wurden. Hierzu kamen jeweils die 3 µl cDNA-Probe. Die PCR-Platte wurde mit einer speziellen Folie luftdicht verschlossen und kurz anzentrifugiert, um etwaig entstandene Luftblasen zu entfernen, die die Messung beeinflussen könnten. Die Polymerasekettenreaktion konnte nun gestartet werden. Bei jeder PCR wurde neben dem Primer des zu untersuchenden Genabschnittes zusätzlich noch der Primer für unser housekeeping-Gen β -Aktin benutzt. Untersucht wurde das IL-8-Gen. Für das zu bestimmende Gen musste ein Master-Mix nach oben beschriebenem Rezept hergestellt werden. Die Messung erfolgte für alle untersuchten Proben jeweils als Duplikate.

Unter Verwendung des Programms ABI PRISM 7000 Standard durchlief jede PCR folgende Zyklen:

	Temperatur und Dauer	Zyklen
Vorinkubation	50°C für 2 Minuten	1
Denaturierung	95°C für 10 Minuten	1
Denaturierung	95°C für 15 Sekunden	40
Annealing und Extension	60°C für 1 Minute	

Tabelle 10: Zyklen der real-time-PCR im Programm ABI PRISM 7000

Daran schloss sich eine Schmelzkurvenanalyse an, durch die die Primer-Spezifität überprüft wurde. Die relativen Veränderungen der Genexpression wurden analysiert unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Formel, wie bereits von Livak und Schmittgen beschrieben (Livak, Schmittgen 2001).

$$x = 2^{-(\text{mRNA-Gehalt IL-8} - \text{mRNA-Gehalt } \beta\text{-Aktin}) - (\text{mRNA-Gehalt IL-8} - \text{mRNA-Gehalt } \beta\text{-Aktin-unbehandelte Zellen})}$$

2.2.6 Life-Cell-Imaging: Wound-Healing-Assay (Scratch-Assay)

Um eine Echtzeit-Beobachtung des Zellverhaltens unter verschiedenen Bedingungen zu ermöglichen, wurde ein Wound-Healing-Assay (Scratch-Assay) verwendet. Es wurden 75.000 MDA-MB-231-Zellen und 250.000 MCF-7-Zellen in einem Volumen von 500 μl pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät und für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, bis der Zellrasen konfluent war. Pro Durchgang wurde immer nur eine der beiden Zelllinien ausgesät. Anschließend wurden die Zellen mit HGF bzw. EGF, 5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin oder mit einer Kombination aus HGF bzw. EGF plus Heparin stimuliert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Konzentration der Wachstumsfaktoren betrug hier für HGF und EGF jeweils 100 ng/ml sowie für Heparin 5 $\mu\text{g/ml}$ und wurde aufgrund der stärksten Effekte auf die Genexpression und Zytokinsekrektion von IL-8 gewählt. Es wurden jeweils drei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

/	/	/	/	/	/
/	No treatment	100 ng/ml HGF	100 ng/ml EGF	/	/
/	5 µg/ml Heparin	100 ng/ml HGF + 5 µg/ml Heparin	100 ng/ml HGF + 5 µg/ml Heparin	/	/
/	/	/	/	/	/

Abb. 3: Pipettierschema zur Zellstimulation für das Wound-Healing-Assay in einer 24-Well-Platte

Nach Herstellung des Stimulationsansatzes wurde das alte Medium abgenommen und verworfen. Das neue Medium, welches nun die Stimulationsfaktoren enthielt, wurde entsprechend des obigen Schemas aufgetragen. Das Medium setzte sich zusammen aus insgesamt 500 µl Vollmedium pro Well sowie den entsprechenden Wachstumsfaktoren mit einer Konzentration von 100 ng/ml. Danach wurde mit einer sterilen 100 µl-Pipettenspitze eine Linie durch den Zellrasen gezogen, sodass dieser danach eine Bruchlinie aufwies. Dies sollte möglichst gerade und bei allen Wells in nahezu gleicher Breite erfolgen, um eine spätere Auswertung möglich zu machen. Dieser so künstlich erzeugte Defekt im Zellrasen konnte nun von den Zellen wieder geschlossen werden. Wie sich dabei die unterschiedlichen Zellen verhielten, wurde über einen Zeitraum von insgesamt 48 Stunden mittels Mikroskop beobachtet. Alle 30 Minuten wurde ein Foto gemacht. Dabei wurde die Zellkulturplatte für diese Zeit kontinuierlich in eine spezielle Brutkammer unter das Mikroskop gestellt. Durch diese Kammer war es möglich, eine Temperatur von 37°C, eine CO₂-Konzentration von 5% und den notwendigen Feuchtigkeitsgrad zu gewährleisten, um optimale Wachstumsbedingungen beizubehalten. Die Auswertung der Fotografien erfolgte mittels des Softwareprogrammes ImageJ 1.51n. Dieses berechnete die Größe der Fläche des künstlich geschaffenen Zellrasendefektes zu

den unterschiedlichen Zeitpunkten des Experimentes in μm^2 . Es wurden hierbei Messungen nach 0 (Ausgangswert), 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden durchgeführt und ausgewertet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens als Triplikate durchgeführt. Dabei wurden die verwendeten Karzinomzellen aus jeweils unterschiedlichen Passagen genutzt. Vor der Auswertung wurden die ermittelten Ergebnisse auf Werte einer unbehandelten Kontrollprobe standardisiert. Die nachfolgenden statistischen Auswertungen der Ergebnisse für die Proliferation, die Zytokinsekretion und das Invasionsassay wurden mit der Software GraphPad Prism 5.01 durchgeführt. Es wurde hierbei der one-way-Anova und Dunnet als Post-Test angewandt. Die Ergebnisse für das Migrationsassay wurden mit der Software ImageJ 1.51n ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Proliferation

Ergebnisse für die MDA-MB-231-Zelllinie

Im Folgenden wird die Proliferation der MDA-MB-231-Zellen im Zeitverlauf von insgesamt 48 Stunden gezeigt. Man erkennt eine Stagnation innerhalb der ersten acht gemessenen Stunden, nach 24 Stunden kam es dann zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl. Weder eine Stimulation mit unfraktioniertem Heparin noch die Zugabe eines Stimulationsfaktors (HGF, EGF, THF- β , SDF-1 α) – mit oder ohne 5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin – hatte einen Einfluss auf die Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Exemplarisch wird hier der Einfluss von 100 ng/ml HGF und 5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin auf die Zellzahl der MDA-MB-231-Zellen gezeigt.

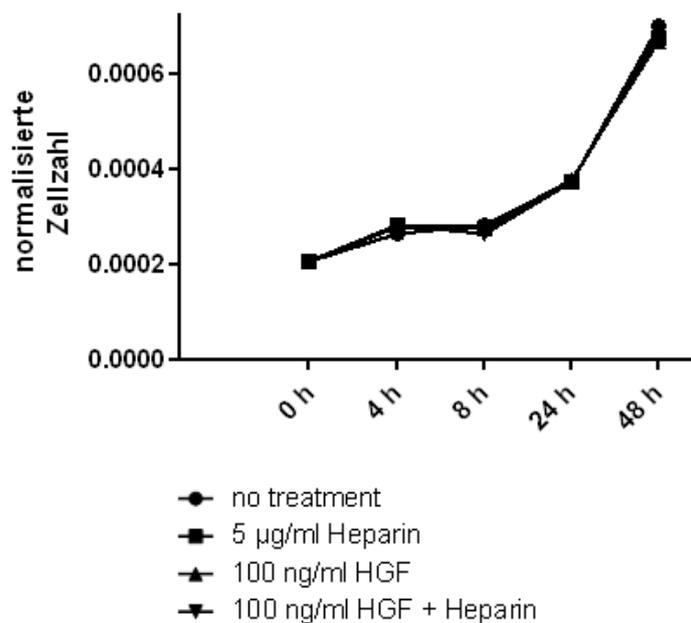


Abb. 4: Zellzahl MDA-MB-231-Zellen im Zeitverlauf über 48 Stunden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml HGF +/- 5 $\mu\text{g/ml}$ Heparin. Messung mittels Vitalitätsassay CTB. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnisse für die MCF-7-Zelllinie

Weiterhin wurde die Proliferation der MCF-7-Zellen im Zeitverlauf von ebenfalls 48 Stunden untersucht. Man erkennt auch hier zunächst, wie bei den MDA-MB-231-Zellen, eine gleichbleibende Zellzahl innerhalb der ersten acht gemessenen Stunden, danach kommt es auch hier zum Anstieg der Zellzahl. Im Gegensatz zu den MDA-MB-231-Zellen konnten aber Veränderungen der Zellzahl durch die unterschiedlichen Stimulationsfaktoren beobachtet werden. Exemplarisch wird im Folgenden der Einfluss von 100 ng/ml HGF auf die Proliferation der MCF-7-Zellen im Verlauf von insgesamt 48 Stunden gezeigt. Sowohl Heparin als auch HGF hatten einen steigernden Einfluss auf die Proliferation der Zellen. Der Einsatz von unfraktioniertem Heparin erhöhte die Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um 8,5%. Die mit HGF behandelten Zellen wiesen eine um 7% gesteigerte Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf. Die Kombination von 100 ng/ml HGF und 5 µg/ml Heparin führte ebenso zu einer Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zu den unbehandelten Zellen um 11%.

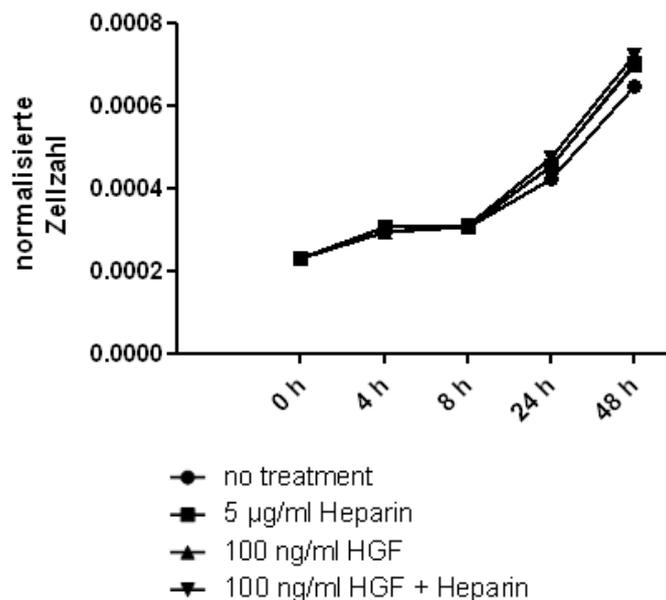


Abb. 5: Zellzahl MCF-7-Zellen im Zeitverlauf über 48 Stunden. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 100 ng/ml HGF +/- 5 µg/ml Heparin. Messung mittels Vitalitätsassay CTB. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

3.2 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Zytokinsekretion

Die Zelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 wurden hinsichtlich ihrer Zytokinsekretion von IL-8, IL-11, RANTES, MCP-1, MIG und IP-10 mittels ELISA untersucht. Zusätzlich setzten wir unfraktioniertes Heparin ein, um zu überprüfen, inwieweit die Zytokinsekretion durch Heparin beeinflusst wird. Parallel zu allen durchgeführten ELISAs wurde eine Analyse des Stoffwechselumsatzes mittels Cell Titer Blue®-Assays durchgeführt. Mit einem solchen Vitalitätsassay kann die relative Zellzahl bestimmt werden. Dies ist insofern wichtig, um festzustellen, ob eine Änderung der Zytokinkonzentration durch eine Beeinflussung der Zytokinsekretion selbst oder aber lediglich durch eine veränderte Zellzahl herrührt. Die gemessenen Werte aus den ELISAs wurden bei jedem Versuchsdurchgang auf die relativen Zellzahlen aus dem Vitalitätsassay bezogen. Alle nachfolgend beschriebenen Veränderungen der Zytokinkonzentration sind somit auf eine tatsächliche Veränderung der Zytokinsekretion zu werten.

3.2.1 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Ergebnisse für die MDA-MB-231-Zelllinie

a) IL-8-ELISA

IL-8-Sekretion nach HGF-Stimulation:

Die Zusammenfassung der Werte aus drei Durchgängen des IL-8-ELISAs zeigte, dass nach einer 24-stündigen Stimulation mit 10 ng/ml HGF die basale IL-8-Sekretion um 26% gesteigert werden konnte. Die Erhöhung des IL-8-Spiegels lag nach einer Stimulation durch HGF mit einer Konzentration von 100 ng/ml in einem signifikanten Bereich von 47%. Der Zusatz von 5 µg/ml unfraktioniertem Heparin konnte die basale IL-8-Sekretion um 45% absenken. Sowohl mit 10 ng/ml als auch mit 100 ng/ml HGF konnte das unfraktionierte Heparin die Sekretion von IL-8 signifikant herunterregulieren. Die zuvor mit 10 ng/ml HGF stimulierten Zellen wiesen durch die Heparinbehandlung eine 51% geringere IL-8-Sekretion auf, die mit 100 ng/ml HGF stimulierten Zellen eine um 53% geringere IL-8-Sekretion.

IL-8-Sekretion nach EGF-Stimulation:

Die Durchführung des IL-8-ELISAs aus den Zellüberständen nach einer Stimulation mit EGF erwies sich ebenfalls als aussagekräftig. Die Werte aus den drei Durchläufen zeigten zusammenfassend alle signifikante Ergebnisse sowohl für die Steigerung der basalen IL-8-Sekretion nach einer Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml EGF als auch für die

Herabregulierung der IL-8-Sekretion durch 5 µg/ml Heparin. Die basale IL-8-Sekretion konnte durch den Heparinzusatz um 37% gesenkt werden. Der Wachstumsfaktor EGF steigerte hingegen die IL-8-Sekretion um 64% bei eingesetzten 10 ng/ml und um 60% bei 100 ng/ml EGF gegenüber den unbehandelten Zellen. Auch der Einfluss des unfraktionierten Heparins auf die zuvor mit EGF stimulierten Zellen war deutlich und lag bei den mit 10 ng/ml behandelten Zellen bei 60% und bei den mit 100 ng/ml stimulierten Zellen 56% unterhalb der IL-8-Konzentration ohne Heparin.

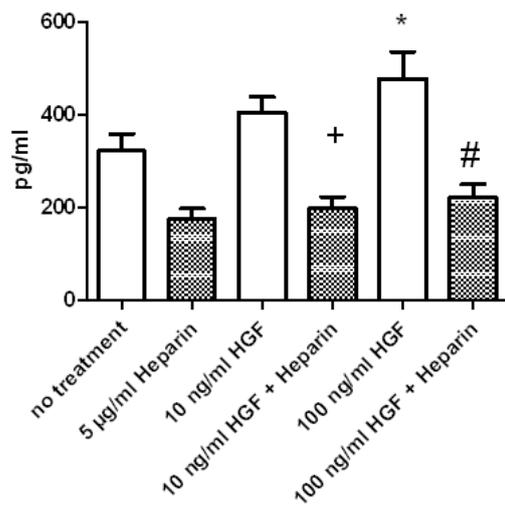
IL-8-Sekretion nach TGF-β-Stimulation:

Die Auswertung der Ergebnisse aus den drei ELISA-Durchgängen zeigte, dass die IL-8-Sekretion nach Stimulation mit TGF-β insgesamt relativ großen Schwankungen unterlag. Zwar konnte die basale IL-8-Sekretion signifikant um 1755% gesteigert werden, eine signifikante Herabregulierung durch den Einsatz von unfraktioniertem Heparin konnte jedoch nicht festgestellt werden.

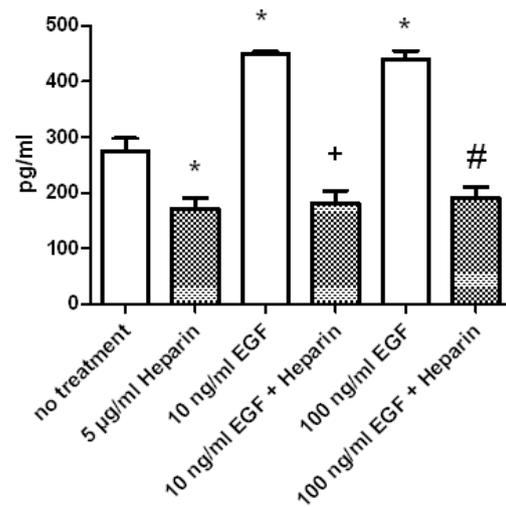
IL-8-Sekretion nach SDF-1α-Stimulation:

Die Auswertung der Ergebnisse aus den insgesamt vier Durchgängen des IL-8-ELISAs zeigte, dass nach 24-stündiger Stimulation mit dem Wachstumsfaktor SDF-1α die basale IL-8-Sekretion nicht gesteigert werden konnte. Sie blieb nahezu konstant auf dem Niveau der basalen Zytokinsekretion. Eine Heparinzugabe in der Konzentration von 5 µg/ml konnte allerdings die IL-8-Sekretion signifikant sowohl gegenüber den unbehandelten Zellen als auch gegenüber jenen, die mit SDF-1α stimuliert wurden, absenken. Die Sekretion von IL-8 wurde unabhängig von der SDF-1α-Konzentration in etwa dem gleichen Maße gesenkt. So ermittelten wir nach Zugabe von Heparin zu den nicht stimulierten Zellen eine um 46% niedrigere IL-8-Konzentration, nach Stimulation mit 10 ng/ml SDF-1α eine um 47% reduzierte Sekretion und nach Stimulation mit 100 ng/ml SDF-1α eine um 44% gesunkene IL-8-Sekretion.

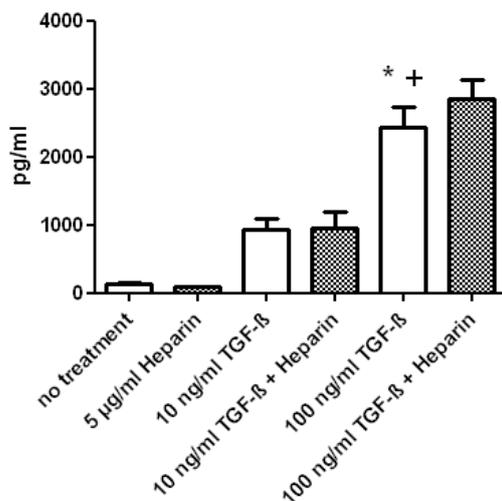
Zusammenfassend konnte beobachtet werden, dass die IL-8-Sekretion durch die Stimulationsfaktoren in unterschiedlich starkem Maße beeinflusst werden konnte. Die Zugabe von HGF, EGF und TGF-β steigerte die basale IL-8-Sekretion signifikant im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Das unfraktionierte Heparin konnte die IL-8-Sekretion wiederum signifikant bei den zuvor mit HGF, EGF und SDF-1α stimulierten MDA-MB-231-Zellen reduzieren. Die mit TGF-β behandelten Zellen konnten durch das UFH nicht beeinflusst werden.

Nach HGF-Stimulation:

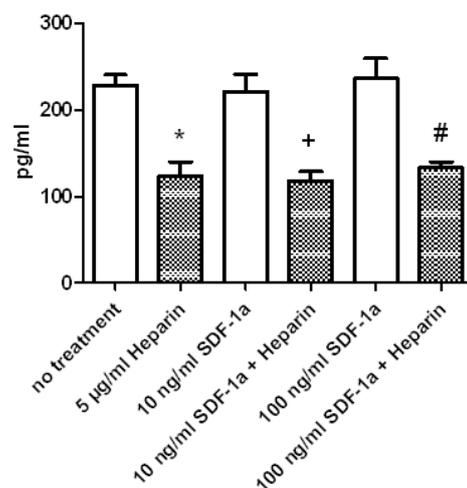
* signifikant gegenüber no treatment
 + signifikant gegenüber 10 ng/ml HGF
 # signifikant gegenüber 100 ng/ml HGF
 (N=3)

Nach EGF-Stimulation:

* signifikant gegenüber no treatment
 + signifikant gegenüber 10 ng/ml EGF
 # signifikant gegenüber 100 ng/ml EGF
 (N=3)

Nach TGF-β-Stimulation:

* signifikant gegenüber no treatment
 + signifikant gegenüber 10 ng/ml TGF-β
 (N=3)

Nach SDF-1α-Stimulation:

* signifikant gegenüber no treatment
 + signifikant gegenüber 10 ng/ml SDF-1α
 # signifikant gegenüber 100 ng/ml SDF-1α
 (N=4)

Abb. 6: IL-8-Sekretion der MDA-MB-231-Zellen. Die Zytokinsekretion von IL-8 wurde bei MDA-MB-231-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF-β und SDF-1α +/- 5 µg/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

b) IL-11-ELISA

IL-11-Sekretion nach HGF-Stimulation:

Die Durchführung des IL-11-ELISAs nach einer Stimulation mit HGF zeigte in drei Experimentdurchgängen keine signifikanten Ergebnisse. Die einzelnen Messwerte in den drei Durchläufen unterlagen einer zu hohen Schwankungsbreite. Es konnten aber dennoch Tendenzen einer Erhöhung der basalen IL-11-Sekretion nach HGF-Stimulation erkannt werden. 10 ng/ml HGF steigerte die IL-11-Sekretion um 57%, eine Stimulation mit 100 ng/ml HGF erhöhte die Sekretion von IL-11 sogar um 61%. Auch der Einsatz von Heparin zeigte die Tendenz einer Herabregulierung der IL-11-Spiegel. Die unbehandelten Zellen sezernierten nach Heparinzugabe 24% weniger IL-11, die mit 10 ng/ml HGF vorbehandelten Zellen 22% und die mit 100 ng/ml HGF stimulierten MDA-MB-231-Zellen 35% weniger IL-11.

IL-11-Sekretion nach EGF-Stimulation:

Auch nach einer Stimulation mit EGF konnten in insgesamt drei Durchläufen keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Es waren auch hier lediglich Tendenzen einer Steigerung der basalen IL-11-Sekretion nach EGF-Zugabe auf einem Level um 25% ersichtlich. Auch der Einsatz von Heparin zeigte nur den Trend einer Herabregulierung der IL-11-Spiegel sowohl bei den unbehandelten als auch bei den stimulierten Zellen um etwa 29%. Insgesamt blieb das IL-11-Sekretionslevel nach Heparinzugabe aber auf einem relativ ähnlichen Niveau unabhängig von der eingesetzten EGF-Konzentration.

IL-11-Sekretion nach TGF- β -Stimulation:

Die Auswertung der Ergebnisse aus den insgesamt drei Durchgängen des IL-11-ELISAs zeigte, dass es nach 24-stündiger Stimulation mit dem Wachstumsfaktor TGF- β zu einem Anstieg der basalen IL-11-Sekretion um 39% kam. Dieser Anstieg erwies sich jedoch aufgrund der Messwertschwankungen in den drei Durchläufen als nicht signifikant. Mit steigender Konzentration an zugegebenem TGF- β kam es auch zunehmend zu einem Anstieg der IL-11-Sekretion. 100 ng/ml ermöglichten eine Steigerung der gemessenen IL-11-Konzentration um 52%. Eine Heparinzugabe in der Konzentration von 5 μ g/ml konnte die IL-11-Sekretion gegenüber den unbehandelten MDA-MB-231-Zellen nicht signifikant reduzieren. Mit einer Abnahme der IL-11-Konzentration um 33% zeigte sich hier aber eine deutliche Tendenz. Unter Zusatz von unfraktioniertem Heparin konnte nach Stimulation mit 10 ng/ml TGF- β eine um 37% reduzierte Sekretion und nach Stimulation mit 100 ng/ml

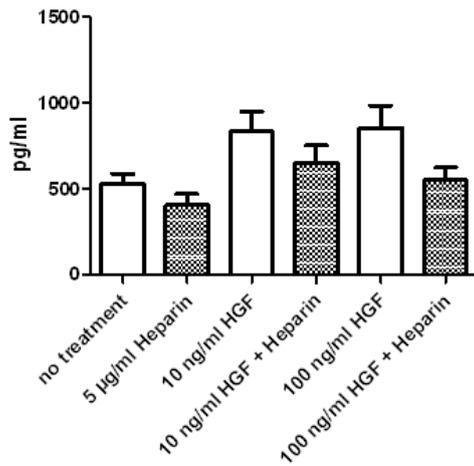
TGF- β eine um 39% gesunkene IL-11-Sekretion gemessen werden. Beide Ergebnisse erwiesen sich als signifikant.

IL-11-Sekretion nach SDF-1 α -Stimulation:

In der Zusammenfassung von insgesamt vier Durchläufen konnte keine Steigerung der IL-11-Sekretion durch den Einsatz von SDF-1 α erreicht werden. Die IL-11-Sekretion erwies sich in der Tendenz sogar als leicht fallend. Unter der Zugabe von 10 ng/ml SDF-1 α sank die IL-11-Sekretion um 5%, mit 100 ng/ml SDF-1 α um 13%. Der Einfluss von Heparin auf die IL-11-Sekretion erwies sich ebenfalls als nicht signifikant, zeigte jedoch auch hier eine Tendenz zur Herabregulierung der IL-11-Sekretion. Heparin reduzierte die IL-11-Sekretion der unbehandelten MDA-MB-231 um 44%. Die vorher mit 10 ng/ml und 100 ng/ml SDF-1 α stimulierten Zellen sezernierten durch die Heparinzugabe jeweils 31% weniger IL-11. Die einzelnen ELISA-Durchläufe zum Einfluss von 0,5 μ g/ml Heparin auf die IL-11-Sekretion zeigten zwar signifikante Ergebnisse, die Abweichungen der einzelnen Durchgänge untereinander waren jedoch zu hoch, um auch in Zusammenschau der Werte dies zu belegen.

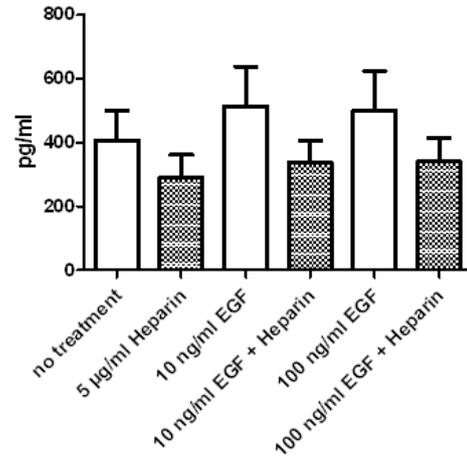
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Aussagekraft der Ergebnisse in den IL-11-ELISAs eingeschränkt ist und demnach nur als Tendenzen zu werten sind. Unfraktioniertes Heparin schafft es zwar, die Zytokinsekretion von IL-11 zu senken, aber nur bei vorangegangener TGF- β -Stimulation gelang dies in einem signifikanten Bereich.

Nach HGF-Stimulation:



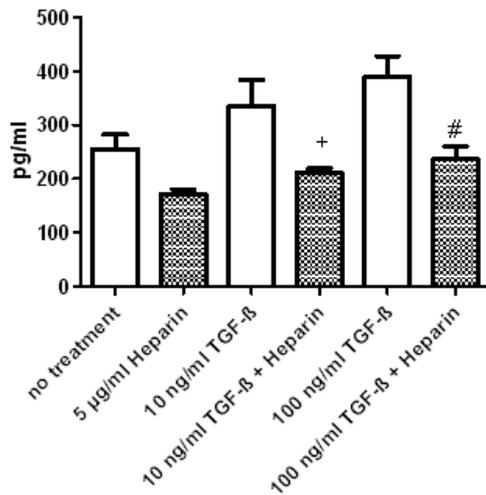
(N=3)

Nach EGF-Stimulation:



(N=3)

Nach TGF-β-Stimulation:

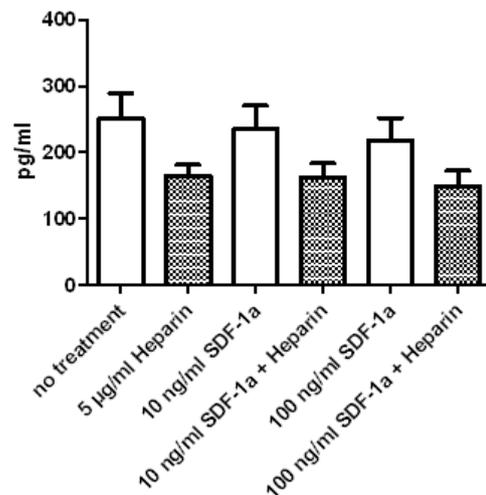


+ signifikant gegenüber 10 ng/ml TGF-β

signifikant gegenüber 100 ng/ml TGF-β

(N=3)

Nach SDF-1α-Stimulation:



(N=4)

Abb. 7: IL-11-Sekretion der MDA-MB-231-Zellen. Die Zytokinsekretion von IL-11 wurde bei MDA-MB-231-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF-β und SDF-1α +/- 5 µg/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden mindestens N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

c) RANTES-ELISA

Weder einer der Stimulationsfaktoren noch unfraktioniertes Heparin zeigte eine signifikante Beeinflussung der RANTES-Sekretion. Auch Tendenzen waren hier nicht festzustellen.

RANTES-Sekretion nach HGF-Stimulation:

Beispielhaft für die erzielten Ergebnisse wird hier nur die zusammenfassende Grafik für die Behandlung der MDA-MB-231-Zellen mit dem Stimulationsfaktor HGF gezeigt.

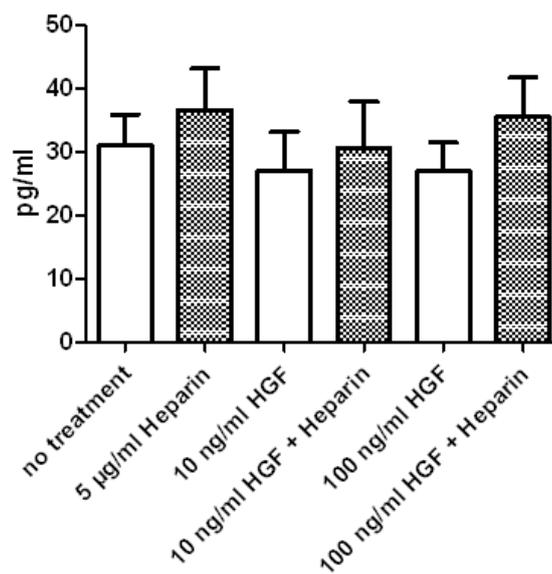


Abb. 8: RANTES-Sekretion der MDA-MB-231-Zellen. Die Zytokinsekretion von RANTES wurde bei MDA-MB-231-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α +/- 5 µg/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Exemplarisch wird die RANTES-Zytokinsekretion nach HGF-Stimulation gezeigt.

d) MIG-ELISA, MCP-1-ELISA, IP-10-ELISA

Der MIG-, MCP- und IP-10-ELISA zeigten auch nach mehrfachen Wiederholungen keine messbaren Ergebnisse. Es wurde weder in der Kontrollgruppe mit den unbehandelten Zellen noch durch die Stimulationsfaktoren oder durch das unfraktionierte Heparin MIG, MCP oder IP-10 von den MDA-MB-231-Zellen sezerniert. Etwaige Messwerte waren kleiner als der kleinste mitgeführte Standard. Somit konnten keine Werte bestimmt werden.

Ergebnisse für die MCF-7-Zelllinie

Hier ergaben sich, auch nach mehrfachen Wiederholungen, keine mess- und auswertbaren Ergebnisse. Die Zahlenwerte lagen stets unter dem niedrigsten Wert der mitgeführten Standardreihe. Der Nachweis einer basalen Sekretion von IL-8, IL-11, MIG, MCP-1 und IP-10 gelang demnach nicht. Auch durch die verwendeten Stimulationsfaktoren bzw. Heparin konnten in keinem Durchgang messbare Werte bestimmt werden.

RANTES-ELISA

Die zusammenfassende Darstellung der RANTES-ELISAs zeigt, dass die MCF-7-Zelllinie eine basale RANTES-Sekretion aufweist. Diese lag nahezu immer auf dem gleichen Niveau, unabhängig davon, ob ein Stimulationsfaktor zugegeben wurde oder nicht. Des Weiteren konnte auch das eingesetzte Heparin die sezernierte Menge an RANTES nicht beeinflussen. Gleichwertige Ergebnisse zeigten sich auch für alle anderen eingesetzten Stimuli (EGF, TGF- β , SDF-1 α).

Exemplarisch wird hier die Zusammenfassung des RANTES-ELISAs für die MCF-7-Zellen dargestellt, welche mit dem Stimulationsfaktor HGF behandelt wurden.

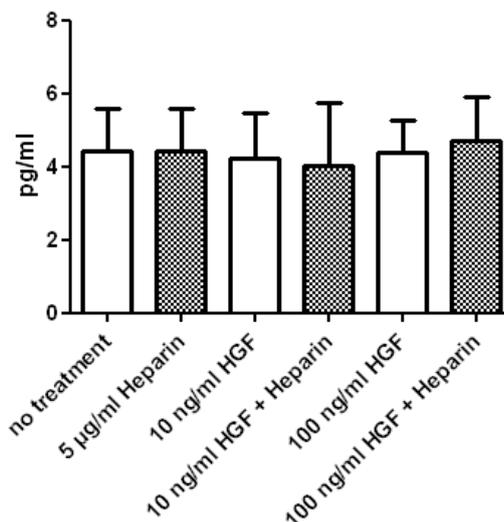


Abb. 9: RANTES-Sekretion der MCF-7-Zellen. Die Zytokinsekretion von RANTES wurde bei MCF-7-Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen mit jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α +/- 5 µg/ml Heparin für 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. P-Werte <0.05 gelten als signifikant verändert. Es wurden N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Exemplarisch wird die RANTES-Zytokinsekretion nach HGF-Stimulation gezeigt.

3.2.2 Real-time RT-PCR

Die durchgeführten ELISAs zeigten Veränderungen in der Zytokinsekretion der MDA-MB-231-Zellen sowohl durch die angewandten Wachstumsfaktoren (HGF, EGF, TGF- β , SDF-1 α) als auch den Einsatz von 5 μ g/ml Heparin. IL-8 erwies sich hierbei mit einer Stimulation von HGF und EGF am aussagekräftigsten und wurde deshalb im Folgenden auf Genexpressionsebene untersucht. Hier sollte überprüft werden, ob die signifikanten Veränderungen der Zytokinsekretion auf einer Neuproduktion beruhen oder bereits produzierte und gespeicherte Zytokine von der Zelle vermehrt oder weniger stark sezerniert wurden. Eine Neuproduktion der Zytokine würde mit einer Änderung des mRNA-Gehaltes für das entsprechende Gen einhergehen. Für IL-8 und wurden real-time-PCRs durchgeführt, um dies genauer zu untersuchen.

Ergebnisse für die MDA-MB-231-Zelllinie

a) IL-8-real-time RT-PCR nach HGF-Stimulation

Nach 4 Stunden:

Die Auswertung der real-time-PCR nach einer vier Stunden Stimulation mit HGF zeigte sehr deutliche Ergebnisse. Es konnte dargelegt werden, dass das eingesetzte Heparin die IL-8-Sekretion hoch signifikant vermindern konnte. Dies traf sowohl für die Kontrolle mit unbehandelten Zellen als auch für die mit 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF stimulierten Zellen zu. Dabei ist zu beobachten gewesen, dass 5 μ g/ml Heparin ausreichen, um nach vier Stunden die IL-8-Sekretion der unbehandelten Zellen um bereits 58% herabzuregulieren. Außerdem konnte Heparin die IL-8-Produktion der mit 10 ng/ml HGF stimulierten Zellen um 62% sowie die mit 100 ng/ml stimulierten MDA-MB-231 um 47% absenken. Die im IL-8-ELISA nach 48 Stunden herbeigeführte signifikante Steigerung der basalen Sekretion des Chemokins konnte nur als Trend gezeigt werden, führte in der PCR nach vier Stunden aber zu keinem signifikanten Ergebnis.

Nach 8 Stunden:

Der nach vier Stunden hoch signifikante Heparineffekt lässt bereits nach acht Stunden deutlich nach. Die IL-8-Produktion der Kontrollzellen konnte durch Heparin zwar auch hier signifikant gesenkt werden, aber nur noch um 29% und betrug hier demnach nur noch die Hälfte verglichen mit dem Wert nach vier Stunden. Die mit 10 ng/ml HGF und Heparin stimulierten Zellen wiesen dagegen keine signifikante Herunterregulierung mehr auf, es ist lediglich ein Trend nachweisbar. Die hier sichtbare Senkung des IL-8-Spiegels beläuft

sich nach Heparinzugabe um 19%, welche aber zu gering waren, um sich als signifikant zu erweisen.

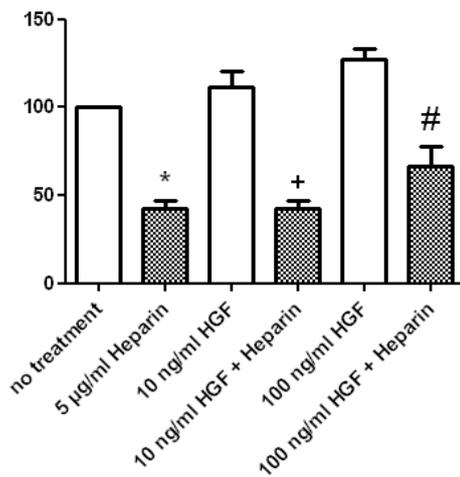
Nach 24 Stunden:

Nach 24 Stunden konnte Heparin die IL-8-Produktion der unbehandelten Zellen um 32% reduzieren. Auffallend ist aber, dass die Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml HGF jetzt eine geringere IL-8-Produktion im Vergleich mit den unbehandelten Zellen zur Folge hatte. Nach vier Stunden HGF-Stimulation war diese noch angestiegen verglichen mit den unbehandelten Zellen. Weiterhin sind keine signifikanten Effekte nach 24 Stunden aufgetreten.

Nach 48 Stunden:

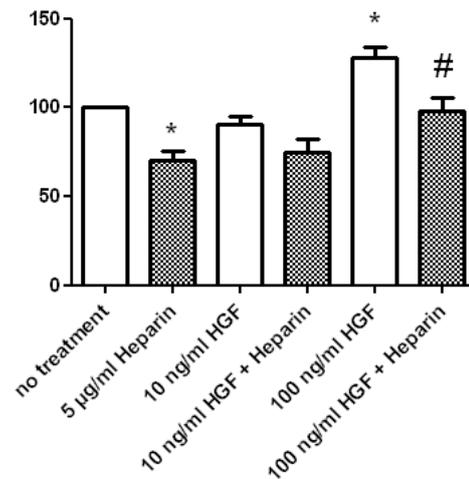
Nach einer 48-stündigen Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF und 5 µg/ml Heparin konnten in der real-time RT-PCR keine signifikanten Effekte mehr gezeigt werden.

Nach 4 h:



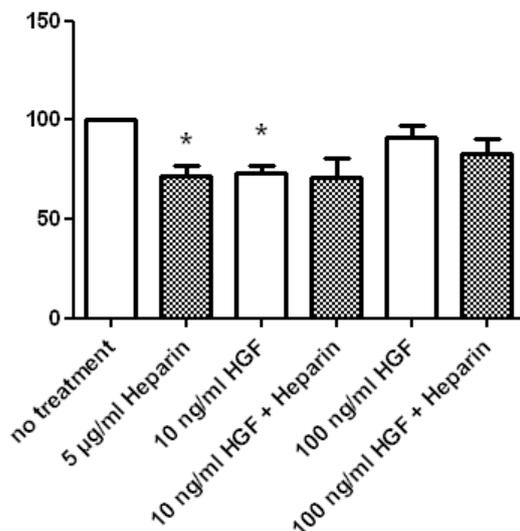
* signifikant gegenüber no treatment
 + signifikant gegenüber 10 ng/ml HGF
 # signifikant gegenüber 100 ng/ml HGF

Nach 8 h:



* signifikant gegenüber no treatment
 # signifikant gegenüber 100 ng/ml HGF

Nach 24 h:



* signifikant gegenüber no treatment

Nach 48 h:

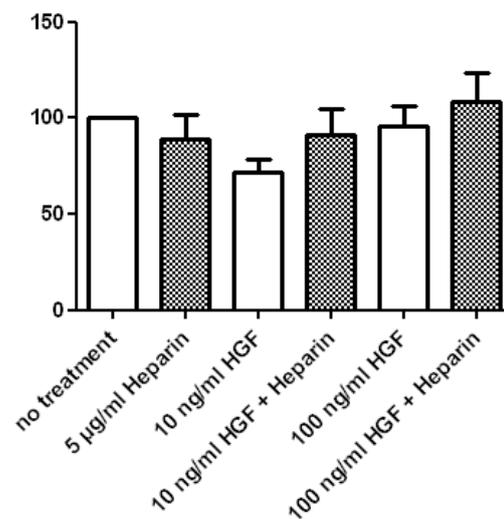


Abb. 10: Zusammenfassung real-time RT-PCR für IL-8 bei MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit HGF +/- 5 µg/ml Heparin für 4, 8, 24, 48 Stunden. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

*b) IL-8-real-time RT-PCR nach EGF-Stimulation**Nach 4 Stunden:*

Es konnte bereits nach vierstündiger Stimulation eine signifikante Herabregulation der IL-8-Produktion durch Heparin bei den MDA-MB-231-Zellen gezeigt werden. Ohne Zugabe eines Wachstumsfaktors kam es zu einer Reduktion um 60%, mit 10 ng/ml EGF um 58% und bei 100 ng/ml EGF um 61%. Die basale IL-8-Produktion wurde dabei durch den Wachstumsfaktor EGF nicht signifikant beeinflusst.

Nach 8 Stunden:

Wurden die Zellen für acht Stunden einer Behandlung mit 100 ng/ml EGF mit und ohne zusätzliches Heparin ausgesetzt, vermochte Heparin die IL-8-Produktion signifikant um 36% zu senken. Die Steigerung der IL-8-Produktion durch Stimulation der MDA-MB-231-Zellen mit EGF gegenüber der basalen Produktion ohne Behandlung mit diesem Stimulationsfaktor konnte hier nur als Trend in den Durchgängen gezeigt werden.

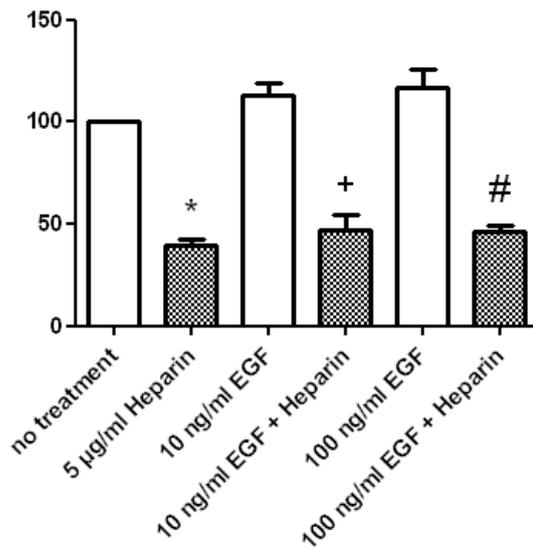
Nach 24 Stunden:

Nachdem die Zellen für 24 Stunden stimuliert wurden, ließ sich kein signifikanter Effekt mehr auf die IL-8-Produktion nachweisen.

Nach 48 Stunden:

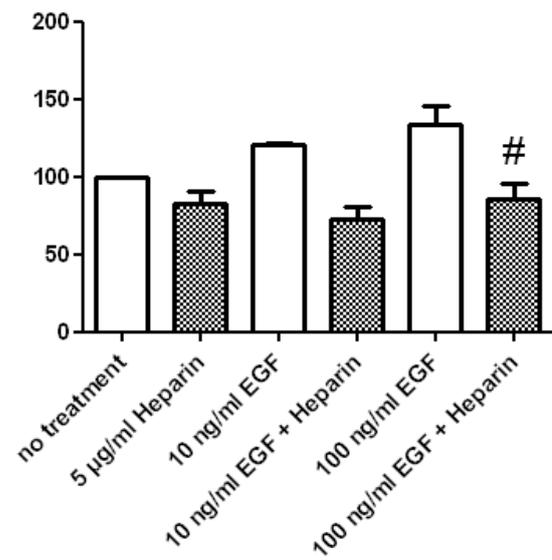
Nach 48 Stunden Stimulation war ebenso kein Effekt mehr auf molekularer Ebene auf das sezernierte Chemokin nachweisbar.

Nach 4 h:



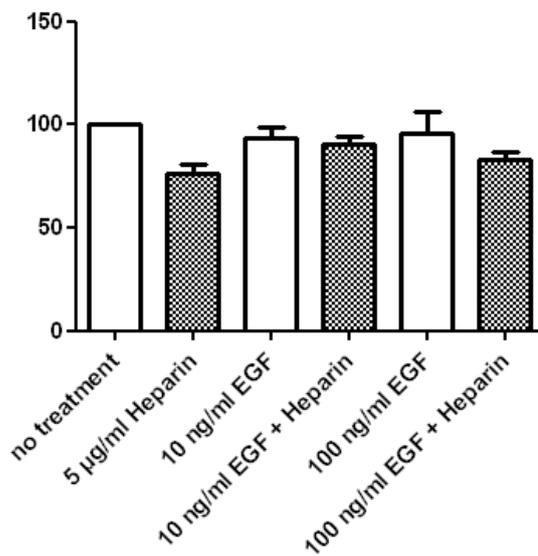
* signifikant gegenüber no treatment
 + signifikant gegenüber 10 ng/ml EGF
 # signifikant gegenüber 100 ng/ml EGF

Nach 8 h:



signifikant gegenüber 100 ng/ml EGF

Nach 24 h:



Nach 48 h:

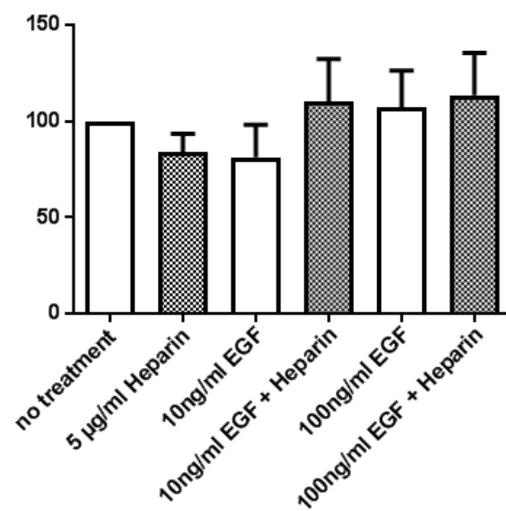


Abb. 11: Zusammenfassung real-time RT-PCR für IL-8 bei MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit EGF +/- 5 µg/ml Heparin für 4, 8, 24, 48 Stunden. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnisse für die MCF-7-Zelllinie

Die für die MDA-MB-231-Zelllinie durchgeführten PCRs führten wir ebenso mit der Kontrollzelllinie MCF-7 durch. Jedoch ergaben sich, auch nach mehrfachen Wiederholungen, keine mess- und auswertbaren Ergebnisse. Die Zahlenwerte lagen stets unterhalb des Detektionsbereichs. Für IL-8 lag demnach eine unzureichende Genexpression der MCF-7-Zelllinie vor.

3.3 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Invasion

Die Methodik für das Invasionsassay wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe unseres Labors etabliert. Aufgrund deren gewonnener Erkenntnisse wurde die Versuchsdurchführung geplant. Dabei wurde die modifizierte Boyden-Kammer genutzt, um das Invasionsverhalten der Karzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 zu untersuchen. Beide Zelllinien wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert und stimuliert. Als Stimuli nutzten wir, wie bereits in den vorangegangenen Versuchen, jeweils 10 ng/ml und 100 ng/ml HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α . Ebenso testeten wir, ob die Invasion auch durch den Zusatz von 5 μ g/ml Heparin beeinflusst wird. Die Zellzahl der invadierten Zellen wurde nach 24, 48 und 72 mittels Cell Titer Blue® bestimmt.

Ergebnisse für die MDA-MB-231-Zelllinie

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen, dass es bei keinem der eingesetzten Stimuli zu einer wesentlichen Veränderung des Invasionsverhaltens der MDA-MB-231-Zellen kam. Weder nach 24, nach 48 noch nach 72 Stunden konnten signifikante Ergebnisse ermittelt werden. HGF, EGF, TGF- β noch SDF-1 α konnten demnach die Invasivität der MDA-MB-231 in den untersuchten Zeiträumen nicht verstärken. Auch der Zusatz von 5 μ g/ml Heparin hatte keinen Einfluss auf die Zahl der invadierten Zellen.

a) Nach HGF-Stimulation:

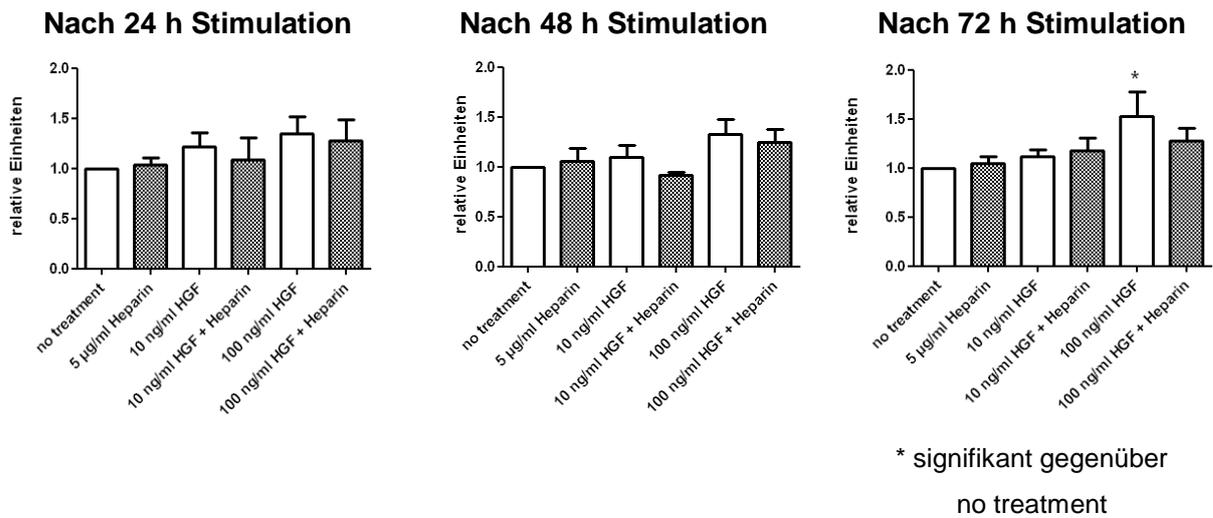


Abb. 12: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit HGF +/- 5 µg/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

b) Nach EGF-Stimulation:

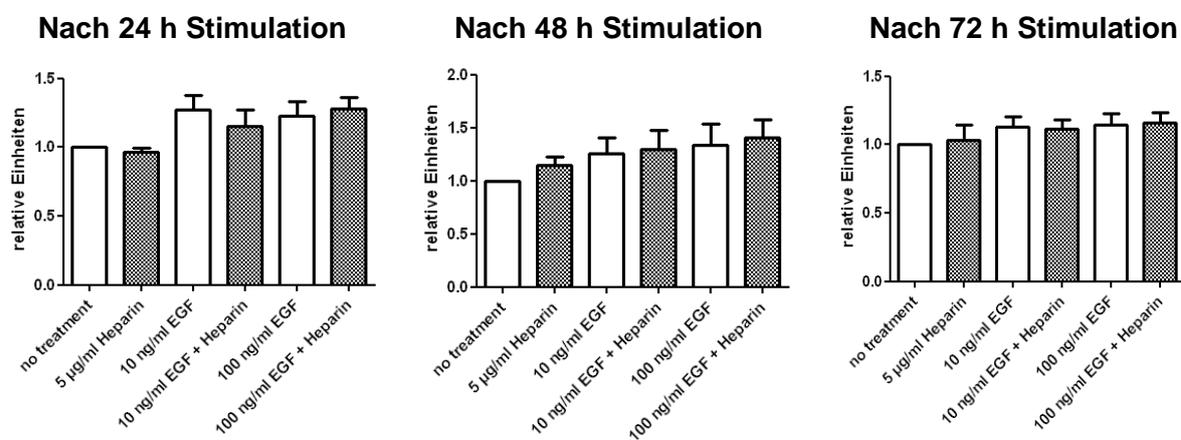


Abb. 13: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit EGF +/- 5 µg/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

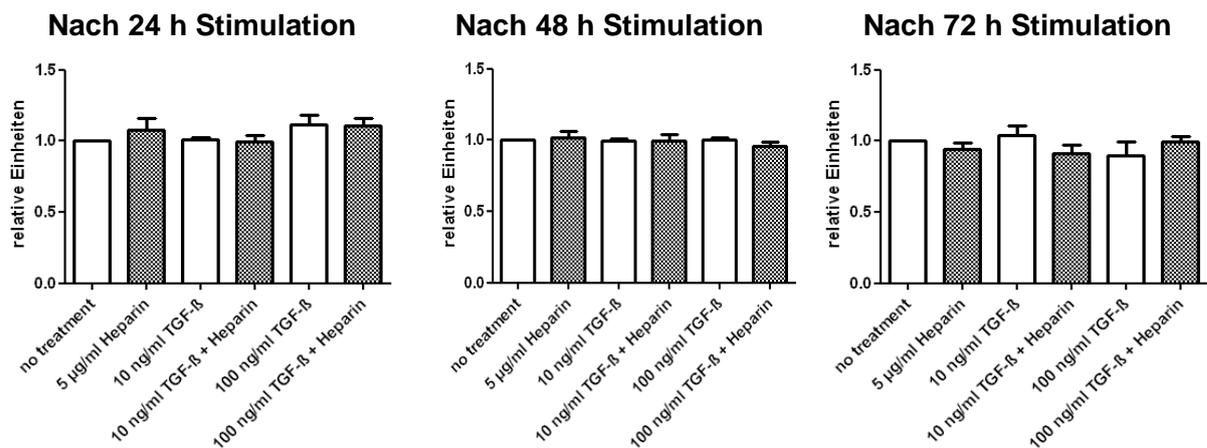
c) Nach TGF- β -Stimulation:

Abb. 14: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit TGF- β +/- 5 µg/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

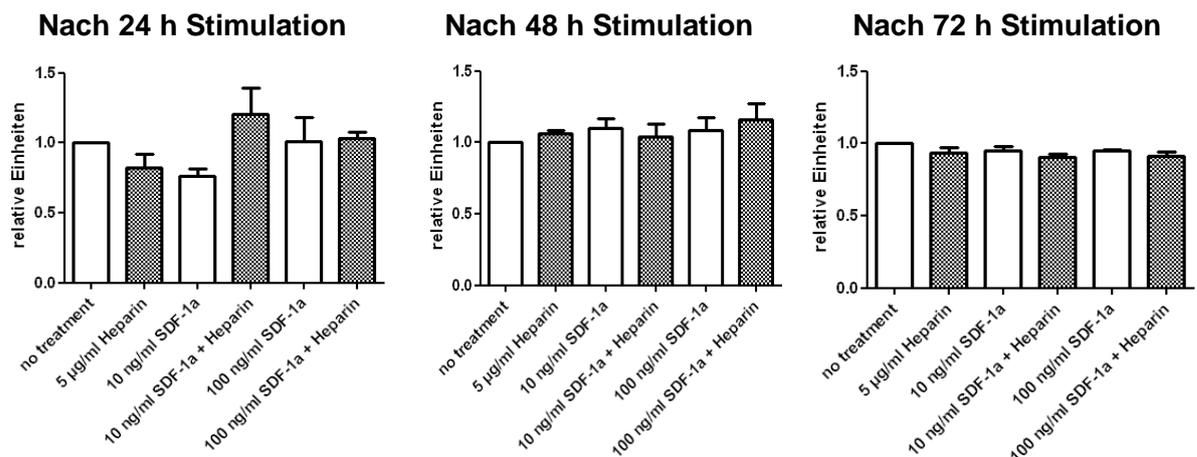
d) Nach SDF-1 α -Stimulation:

Abb. 15: Übersicht Invasionsassay MDA-MB-231-Zellen, Stimulation mit SDF-1 α +/- 5 µg/ml Heparin im Zeitverlauf. Es wurden jeweils N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Ergebnisse für die MCF-7-Zelllinie

Die Invasionsassays führten wir unter gleichen Bedingungen ebenso mit der Kontrollzelllinie MCF-7 durch. Jedoch ergaben sich für diese Zelllinie, auch nach mehrfachen Wiederholungen, keine mess- und auswertbaren Ergebnisse. Die Zahlenwerte lagen stets unterhalb des Detektionsbereichs. Die MCF-7-Zellen zeigten demnach kein Invasionsverhalten in den beobachteten 72 Stunden.

3.4 Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Migration

Die Methode des Wound-Healing-Assays (Scratch-Assay) musste für die Versuchsdurchführung zunächst für unser Labor etabliert werden. Dabei stellten sich zunächst zwei Herausforderungen dar. Zum einen wurde der Zellrasen manuell mittels einer sterilen Pipettenspitze unterbrochen. Dies sollte für alle Versuchsdurchläufe einen nahezu identischen Defekt verursachen. Um dies zu erlangen, musste das Ziehen dieser gewollten Sollbruchlinie wiederholt geübt werden. Des Weiteren musste im ersten Versuchsdurchlauf festgestellt werden, dass die MDA-MB-231- und die MCF-7-Zellen unterschiedlich stark konfluent wuchsen, wenn beide Zelllinien mit der gleichen Zellzahl ausgesät wurden. Dies musste für die nachfolgenden Durchläufe angepasst werden, um vergleichbare Ergebnisse erzielen zu können. Die MDA-MB-231-Zellen wurden daraufhin mit 75.000 Zellen und die MCF-7-Zellen mit 250.000 Zellen in jeweils 500 µl ausgesät.

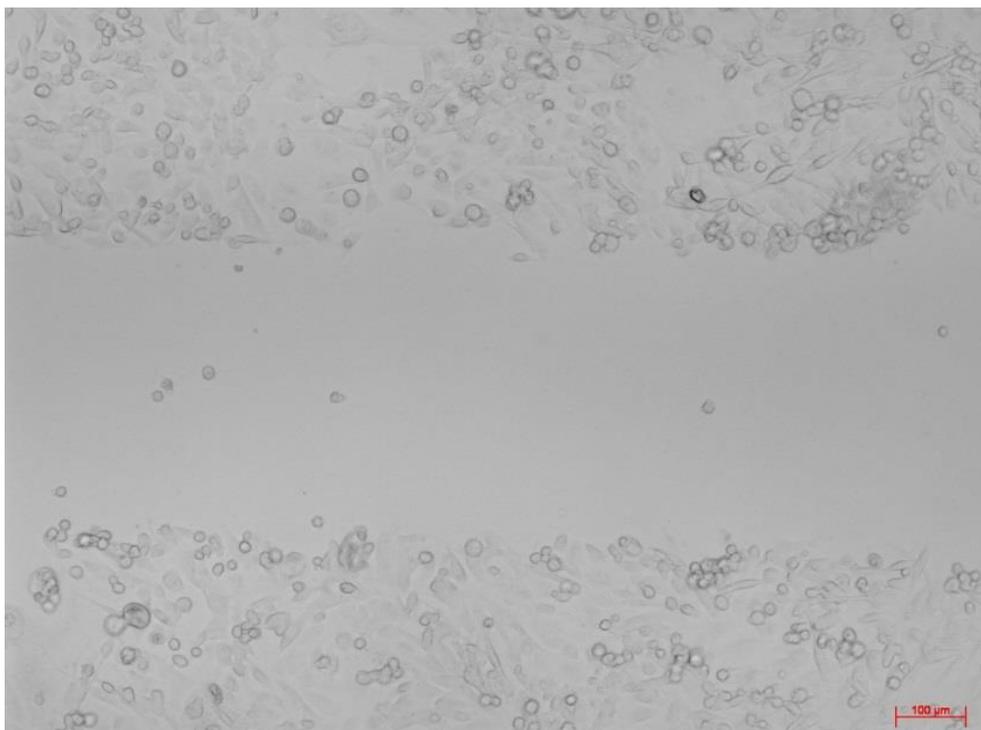


Abb. 16: Wound-Healing-Assay. Mikroskopische Aufnahme von unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. Zellrasen nach manuell geschaffenen Defekt zum Zeitpunkt 0 Stunden (Ausgangswert).

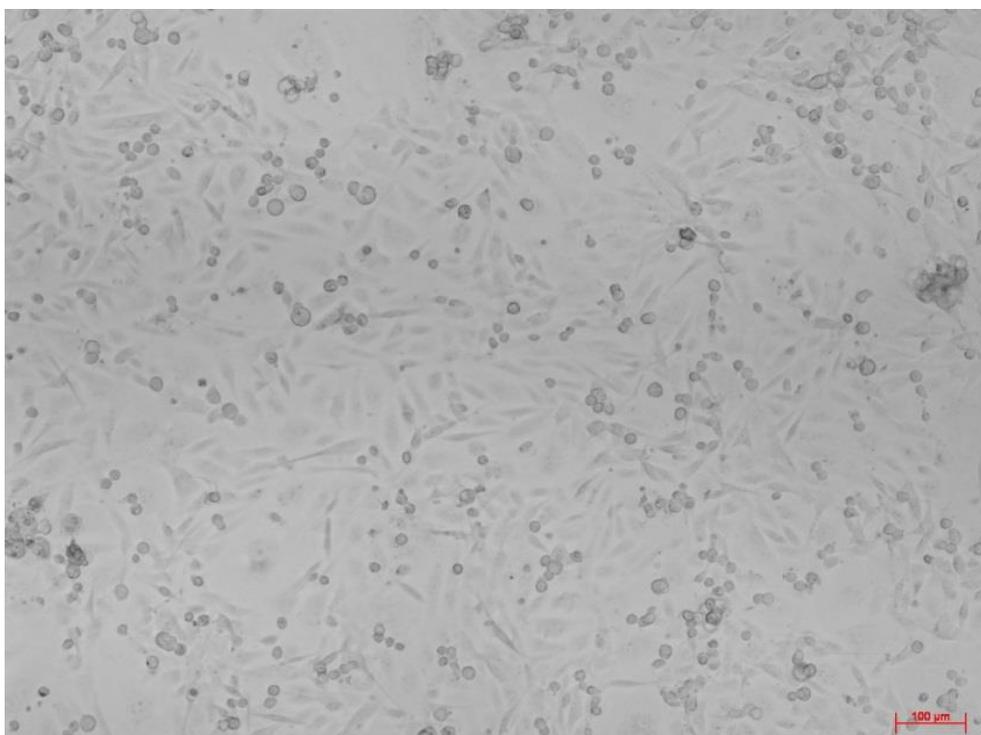


Abb. 17: Wound-Healing-Assay. Mikroskopische Aufnahme von unbehandelten MDA-MB-231-Zellen. Zellrasen zum Zeitpunkt 24 Stunden.

Ergebnisse für die MDA-MB-231-Zelllinie

Für die Auswertung wurde der Defekt im Zellrasen nach jeweils 24 Stunden betrachtet, da sich dieser Zeitraum als am sinnvollsten herausstellte. Unter 24 Stunden war der zu beobachtende Effekt zu gering, um zuverlässige Aussagen treffen zu können. Nach 24 Stunden war bei den MDA-MB-231-Zellen eine deutliche Proliferation erkennbar, sodass nicht mehr nur von einer alleinigen Migration ausgegangen werden konnte.

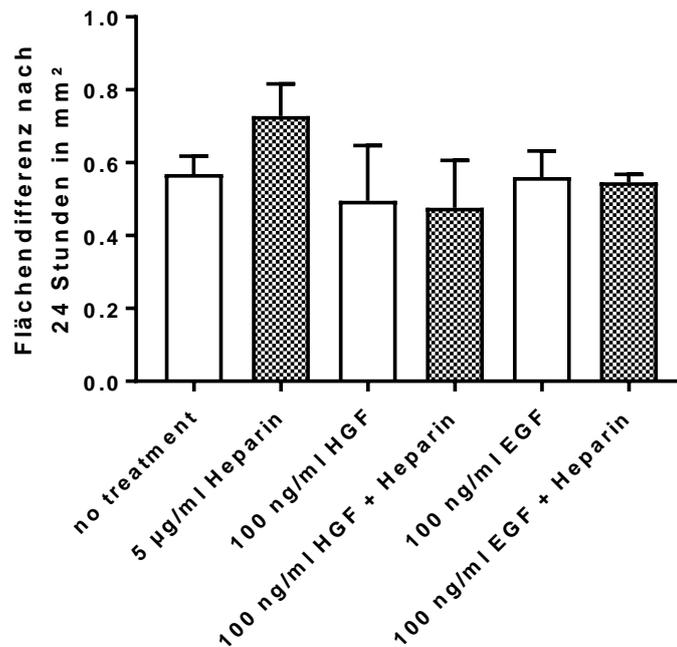


Abb. 18: Darstellung Wound-Healing-Assay nach 24 Stunden. Vergleich unbehandelter MDA-MB-231-Zellen mit MDA-MB-231-Zellen, die nur mit 5 µg/ml Heparin sowie MDA-MB-231-Zellen, die mit den Stimulationsfaktoren HGF und EGF +/- 5 µg/ml Heparin behandelt wurden. Es wurden N=3 voneinander unabhängige Experimente durchgeführt.

Abb. 18 zeigt, dass die Zugabe von 5 µg/ml unfraktioniertem Heparin die Migration der MDA-MB-231-Zellen um etwa 16% gegenüber den unbehandelten Zellen steigern konnte. Die Zugabe von 100 ng/ml HGF vermindert tendenziell die Migration der Karzinomzellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Eine EGF-Stimulation dahingegen hatte keinen merklichen Effekt auf die Migration. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob zusätzlich zu den genutzten Stimuli Heparin zugegeben wurde oder nicht. Insgesamt scheint Heparin als Zusatz ohne weitere Stimuli den größten Effekt auf die Migration zu haben. Aufgrund der zu geringen Effekte und der zu großen Standardabweichung der Messwerte konnten für das Wound-Healing-Assay jedoch keine signifikanten Ergebnisse ermittelt werden.

Ergebnisse für die MCF-7-Zelllinie

Bei Beobachtung der einzelnen MCF-7-Zellen im Zeitverlauf der Videosequenz ist keine wirkliche Migration der Zellen zu erkennen, sondern lediglich deren Teilung. Man kann den Effekt der einzelnen Stimulationsfaktoren auf die MCF-7-Zellen deshalb nicht mit dem auf die MDA-MB-231-Zellen vergleichen. Der Defekt im Zellrasen der MDA-MB-231-Zellen wird durch Migration geschlossen, der Defekt im MCF-7-Zellrasen hingegen durch Proliferation.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Proliferation, die Zytokinsekretion, das Invasions- sowie das Migrationsverhalten auf humane Mammakarzinomzelllinien untersucht.

4.1 Heparin und sein Einfluss auf die Proliferation

Die Spontanproliferation der MDA-MB-231-Zellen konnte durch den Einsatz von unfraktioniertem Heparin in den untersuchten Zeiten von 4, 8, 24 und 48 Stunden nicht wesentlich beeinflusst werden. Beobachtet werden konnte aber die stetige Steigerung der Zellzahl im Zeitverlauf, welche mittels CTB als Vitalitätsassay ermittelt wurde. Die Inkubationszeit hatte hierbei den größten Einfluss. Nach einer zunächst relativ konstanten Zellzahl innerhalb der ersten acht Stunden kam es nach 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg. Die Verdopplungszeit der MDA-MB-231-Zellen beträgt laut Literatur im Schnitt zwischen 14 und 24 Stunden (Posselt 2006). Der Zusatz der Stimulationsfaktoren HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α führte zu keiner signifikanten Steigerung der Proliferation im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Anders als bei den MDA-MB-231-Zellen konnte bei den MCF-7-Zellen eine leichte Veränderung der Proliferation bestimmt werden. Verglichen mit den unbehandelten Zellen steigerten sowohl das unfraktionierte Heparin, 100 ng/ml HGF als auch die Kombination aus Heparin und HGF die Zellzahl, wobei letzteres den größten Effekt erzielte. Soto und Sonnenschein gaben für die MCF-7-Zellen eine Generationszeit von 39 Stunden an (Soto et Sonnenschein 1984).

Bereits in mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Heparin die Spontanproliferation von Zellen auf unterschiedliche Weise beeinflussen kann. So konnte die Proliferation von Epithelzellen aus dem Darm sowie von Magenkarzinomzellen durch Heparin gesteigert werden (Wu et al. 2006). Eine Hemmung der Proliferation durch Heparin wurde dahingegen für glatte Muskelzellen von Gefäßen (Pukac et al. 1990), Endothelzellen der Umbilikalvene (Khorana et al. 2003) und Fibroblasten in der Lunge (Yamashita et al. 1992) beschrieben. Es gibt aber auch mehrere Studien, die zeigten, dass Heparin keinen wesentlichen Einfluss auf das Tumorwachstum hat (Castelli et al. 2004). Insgesamt kann Heparin also sowohl fördernd als auch hemmend auf die Spontanproliferation von Zellen wirken. Niers et al. beschrieben, dass Patienten mit einer aktuell noch nicht fortgeschrittenen Tumorerkrankung mehr von einer Therapie mit Heparin profitieren als jene, welche bereits Fernmetastasen ausgebildet hatten (Niers et al. 2007). Das legt nahe, dass durch Heparin eher Einfluss auf die Entstehung und das

Wachstum von Metastasen genommen werden kann, als den Ursprungstumor selbst zu beeinflussen. Worin liegt nun aber dieser Einfluss auf zellulärer Ebene begründet? Hierzu ist es notwendig, die Protoonkogene c-myc und c-fos zu betrachten, denn sie scheinen entscheidend für den Heparineffekt auf die Proliferation zu sein. Ein Protoonkogen ist ein Gen im Erbgut der Zelle, aus dem durch Mutation ein Onkogen entstehen kann. Dieses ist dann in der Lage, strukturell veränderte Proteine zu synthetisieren, die das Überleben und die Proliferation von Zellen fördern können und so der Tumorzelle Vorteile gegenüber einer Nicht-Tumorzelle verschafft (Weinstein et al. 2006). Die von Wu et al. beschriebene, gesteigerte Proliferation von Magenkarzinomzellen ging mit einer Erhöhung von c-myc einher (Wu et al. 2006). Pukac et al. beschrieben Heparin bereits 1990 als potenten Inhibitor von c-myc und c-fos und eine damit einhergehende Verringerung von glatten Gefäßmuskelzellen in Tierversuchen (Pukac et al. 1990). Auch die Signalkaskade der Proteinkinase C scheint durch Heparin beeinflusst zu werden. So wurde von Castellot et al. die Hemmung der Proteinkinase C durch Heparin und eine damit einhergehende Beeinflussung des Zellzyklus beschrieben (Castellot et al. 1989).

Eine Hemmung der Proliferation der von uns verwendeten humanen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 durch unfraktioniertes Heparin konnten wir nicht beobachten. Die eingesetzte Konzentration von 5 µg/ml könnte möglicherweise zu gering gewesen sein, um einen messbaren Einfluss auf die Proliferation zu nehmen. Gewählt wurde diese Konzentration aufgrund einer im Vorfeld in unserer Arbeitsgruppe erfolgten Heparintitration. Für anschließende Versuche könnte die Heparinkonzentration nun weiter variiert werden, um dadurch für die beiden Mammakarzinomzelllinien gegebenenfalls eine signifikante Beeinflussung der Proliferation festzustellen.

4.2 Heparin und sein Einfluss auf die Zytokine

Die von uns untersuchte Zelllinie MDA-MB-231 wies eine basale Sekretion von IL-8, IL-11 und RANTES auf. MIG, MCP-1 und IP-10 wurden dagegen nicht auf Proteinebene exprimiert, was auch mittels PCR bestätigt werden konnte. Die MCF-7-Zelllinie wies dagegen lediglich eine basale Sekretion des Chemokins RANTES auf. Alle anderen untersuchten Chemokine wurden von den MCF-7-Zellen nicht sezerniert. Beide Zelllinien wurden zusätzlich mit den Stimulationsfaktoren HGF, EGF, TGF-β und SDF-1α behandelt, um potentielle Veränderungen gegenüber der basalen Zytokinsekretion zu prüfen. HGF, EGF und TGF-β konnten bei den MDA-MB-231-Zellen die IL-8-Sekretion mit beiden eingesetzten Konzentrationen, 10 ng/ml und 100 ng/ml, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen steigern. Beim Zusatz von SDF-1α blieb die IL-8-Konzentration

dahingegen etwa auf dem Niveau der Kontrollzellen, unabhängig von der SDF-1 α -Konzentration. Durch das eingesetzte unfraktionierte Heparin (UFH) zeigte sich im ELISA eine deutliche Herabregulation des Zytokinspiegels von IL-8 sowohl bei den unbehandelten MDA-MB-231-Zellen als auch bei denen zuvor mit HGF, EGF und SDF-1 α stimulierten Zellen. Auf die zuvor mit TGF- β behandelten MDA-MB-231-Zellen hatte die Zugabe von UFH keinen Einfluss. Die Ergebnisse der durchgeführten ELISAs konnten mittels PCR bestätigt werden. Hierbei fiel die Zeit als wesentlicher Faktor für die Herabregulation des IL-8-Spiegels durch UFH auf. Nach vier Stunden war der Heparineffekt auf die Zytokinsekretion der MDA-MB-231-Zellen am größten und wurde mit Zunahme der Stimulationszeit kontinuierlich geringer. Nach 48 Stunden war kein Effekt mehr nachweisbar. Die Wirkung von UFH war demnach am größten, je kürzer die Einwirkungszeit des Heparins auf die Zellen war. In der Literatur fanden sich vergleichbare Ergebnisse, was den zeitlichen Effekt von Heparin auf Tumoren betrifft. Injizierte man Mäusen Tumorzellen und verabreichte ihnen zeitgleich Heparin, kam es zu einer geringeren Absiedlung von Tumorzellen im Vergleich zur Gabe von Heparin 24 Stunden vor oder nach der Applikation der Karzinomzellen (Vlodavsky et al. 1994-1995; Ludwig et al. 2004). Auch in unseren Versuchen war nach 24 Stunden nahezu kein Effekt mehr auf mRNA-Ebene durch das Heparin messbar. Das lässt vermuten, dass der Effekt von Heparin zeitlich begrenzt zu sein scheint und somit auch sein Einfluss auf die Zytokine.

IL-8 und seine Bedeutung für Tumoren

IL-8 ist ein proinflammatorisches Zytokin. Die Heparinwirkung kann demnach durch die Senkung des IL-8-Spiegels als antiinflammatorisch bezeichnet werden und somit auch seine Wirkung auf die Tumorzellen und das umgebende Gewebe.

Nelson et al. beschrieben 1993, dass Heparin Leukozyten an der Endotheladhäsion während akuter Entzündungsvorgänge zu hindern vermag (Nelson et al. 1993). Nach der initialen Adhäsion der Leukozyten erfolgt das sog. „rolling“, bei dem sich die Leukozyten langsam entlang des Gefäßendothels bewegen. Dieser Vorgang wird durch verschiedene Oberflächenmoleküle und Chemokine gesteuert. Die Botenstoffe werden physiologisch vom Endothel sezerniert, können aber auch von Tumorzellen produziert werden. IL-8 und RANTES gehören zu eben diesen Chemokinen, die eine (sekundäre) Adhäsion fördern können (Webb et al. 1993; Tanaka et al. 1993). Außerdem wirkt IL-8 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und Histiozyten (Mukaida et al. 1992).

Entzündungsinfiltrate in und um Tumoren wurden mit einem schnellen Tumorwachstum und einer schlechteren Prognose für die Patienten gewertet (Coussens et Werb 2002).

Yuan et al. beschrieben einen potentiellen Einfluss von IL-8 auf das Tumorzellwachstum selbst, die Angiogenese, die Motilität der Tumorzellen und die Leukozyteninfiltration ins tumorumgebende Gewebe (Yuan et al. 2005).

Die Bedeutung von IL-8 in Zusammenhang mit dem Mammakarzinom wurde dahingehend untersucht, inwieweit IL-8-Rezeptoren im Karzinomgewebe exprimiert werden. IL-8 kann an den beiden Rezeptoren CXCR-1 und CXCR-2 binden, wobei das Chemokin mit einer höheren Spezifität an CXCR-1 (Holmes et al. 1991) und weniger spezifisch an CXCR-2 (Brat et al. 2005) bindet. Miller et al. zeigten, dass alle Tumorzellen im Karzinomgewebe der Brust beide Rezeptoren exprimieren, wohingegen in benignem Mammagewebe lediglich zu 50% entweder CXCR-1 oder CXCR-2 exprimiert wird (Miller et al. 1998). In einer Vielzahl von bösartigen Tumoren konnte bislang eine Überexpression von IL-8 nachgewiesen werden. So wurden bereits für das Pankreaskarzinom (Chen et al. 2012), das Nasopharynxkarzinom (Li et al. 2012), das maligne Melanom (Singh et al. 2010), das Lungenkarzinom (Lagiou et Trichopoulos 2011), das Kolonkarzinom (Nastase et al. 2011) und das Harnblasenkarzinom (Urquidi et al. 2012) die prognostische Bedeutung von IL-8 und seinen Rezeptoren untersucht. Zusammenfassend stellte sich in diesen Untersuchungen IL-8 als entscheidender Prognosefaktor für das Überleben der Tumorpatienten heraus. Je höher sich der Serumspiegel von IL-8 erwies, umso schlechter war die Prognose und umso kürzer letztlich auch das Überleben der Patienten (Chen et al. 2012; Singh et al. 2010; Li et al. 2012).

In einer anderen Studie wurde die Bedeutung von IL-8 anhand des Serumspiegels von Patienten mit operablem Mammakarzinom, nicht therapiertem metastasierten Mammakarzinom und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Der IL-8-Spiegel im Serum der Patienten mit einer fortgeschrittenen Erkrankung erwies sich als signifikant erhöht gegenüber dem der gesunden Probanden. Ein hoher IL-8-Spiegel ist beim Mammakarzinom des Weiteren assoziiert mit einem raschen Krankheitsverlauf, einer größeren Tumorlast sowie der Ausbreitung von Tumorzellen in die Lymphknoten und in die Leber (Gayther et al. 1997). Hohe IL-8-Spiegel korrelieren zudem mit einem früheren Auftreten von Rezidiven (Chen et al. 2011; Zarogoulidis et al. 2014). Wie allerdings IL-8 genau das Wachstum maligner Tumoren fördert, ist bisher nicht genau geklärt. Als starkes Chemoattraktant ist IL-8, wie bereits erwähnt, mit für die Infiltration von Entzündungszellen des Tumorgewebes und dessen Umgebung verantwortlich (Mukaida et al. 1992). Außerdem sind Chemokine wie IL-8 basische Proteine und damit positiv geladen (Baggiolini et Clark-Lewis 1992). Das negativ geladene Heparinmolekül (Shriver et al. 2012) könnte somit gut an das positive IL-8-Molekül binden, wodurch dieses nicht mehr zur Verfügung stünde, um neutrophile Granulozyten oder seine Rezeptoren auf

Tumorzellen zu binden. Die Entzündungsreaktion im Gewebe könnte dadurch hemmend beeinflusst werden. Weniger Inflammation in und um das Tumorgewebe wären eine mögliche Folge und damit auch eine erschwerte Ausbreitung der Tumorzellen. Ob und wie allerdings dies genau durch IL-8 erfolgt, ist bisher nicht geklärt.

IL-11 und seine Bedeutung für Tumoren

Das unfraktionierte Heparin hatte in unseren Versuchen auch Einfluss auf die Sekretion von Interleukin-11. Bei allen genutzten Stimulationsfaktoren konnte das UFH die Expression von IL-11 in der Tendenz senken. IL-11 beeinflusst physiologisch die Megakaryozytopoese und damit die Blutgerinnung (Johnstone et al. 2015). Es ist, wie IL-8, ein positiv geladenes Molekül (Nguyen et Vogel 2012), welches gut von Heparin gebunden werden kann. In der Folge steht IL-11 nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung. Dadurch könnte die Bildung von Thrombozyten aus Megakaryozyten verringert werden, eine verstärkte Blutungsneigung würde resultieren. Heparin könnte sich in diesem Fall zusätzlich zu seiner eigenständigen, gerinnungshemmenden Funktion über den Einfluss auf IL-11 auf die Hämostase auswirken.

Außerdem kann IL-11 sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken (Xu et al. 2016; Prasas et al. 2015). Eine Senkung des IL-11-Spiegels durch die Bindung an Heparin könnte den proinflammatorischen Effekt von IL-11 auf das Gewebe mindern, was einer Tumorausbreitung entgegen wirken würde.

IL-11 fördert zudem die Tumorgenese über den JAK-STAT3-Signalweg (Xu et al. 2016). So ist es denkbar, dass bei Mangel an IL-11 auch die Tumorgenese über den JAK-STAT3-Signalweg hemmend beeinflusst werden könnte.

RANTES, MCP-1, MIG und IP-10 und deren Bedeutung für Tumoren

Das Chemokin RANTES wurde sowohl von den MDA-MB-231- als auch von den MCF-7-Zellen sezerniert. UFH scheint tendenziell die Expression von RANTES in den MDA-MB-231-Zellen zu fördern. Bei den MCF-7-Zellen fand sich dieser beobachtete Effekt nicht.

Die Expression der Chemokine MCP-1, MIG und IP-10 konnte bei beiden Zelllinien nicht nachgewiesen werden. Weder zeigten die MDA-MB-231-Zellen und MCF-7-Zellen eine basale Sekretion dieser Chemokine, noch konnte diese durch Zugabe der Stimulationsfaktoren HGF, EGF, TGF- β , SDF- α oder UFH gefördert werden. Die tatsächlich sezernierte Menge dieser Chemokine könnte möglicherweise auch zu gering für eine Detektion mittels ELISA in den Versuchsdurchläufen gewesen sein.

Um die Wirkung von unfraktioniertem Heparin auf die Zytokinsekretion genauer zu verstehen, müssen seine Eigenschaften näher betrachtet werden. So können sowohl seine antikoagulatorischen Fähigkeiten als auch das Heparinmolekül selbst mit seinem Molekulargewicht, seiner Molekülgröße und seiner Molekülladung einen Anteil an der Veränderung der gemessenen Zytokinspiegel haben. Die negative Ladung von Heparin, die damit mögliche Bindung an Zytokine und die anschließende Senkung der Zytokinsekretion ist ein möglicher Wirkungsmechanismus. Denkbar ist außerdem, dass das unfraktionierte Heparin auch direkt mit der DNS der Karzinomzellen interagieren könnte und auch so Einfluss auf die Tumorzellen und deren Metastasierungsverhalten nehmen könnte.

4.3 Heparin und sein Einfluss auf Migration und Invasion

Zur Untersuchung des Invasionsverhaltens wurde die modifizierte Boyden-Kammer als Modell genutzt. Hier zeigte sich, dass das unfraktionierte Heparin keinen wesentlichen Einfluss auf das Invasionsverhalten von MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen in unseren Versuchen hatte. Die Zahl der durch das Matrigel gewanderten Zellen blieb bei allen bestimmten Zeiten (24, 48 und 72 Stunden) und allen getesteten Stimulationsfaktoren nahezu unverändert. Eine vermehrte Invasivität durch die zugegebenen Stimulationsfaktoren HGF, EGF, TGF- β und SDF-1 α konnte ebenso wenig gezeigt werden wie eine Verminderung der Invasion durch das eingesetzte unfraktionierte Heparin. Fraglich ist nun, ob zum Zeitpunkt der ersten Bestimmung bereits alle Zellen durch das Matrigel gewandert waren. Eine Zellzahlmessung vor Zugabe der einzelnen Stimulationsfaktoren, also nach der 18-stündigen Anwachsphase, hätte die Frage klären können, wie viele Zellen sich bereits ohne Stimulation an der Unterseite des Inserts befunden haben. Es ist weiterhin möglich, dass die Zellzahlen bei kürzer gewählten Messintervallen durchaus Unterschiede aufgewiesen hätten. Dies sollte in einem weiteren Versuch überprüft werden. Die von uns für das Invasionsassay erhaltenen Werte unterlagen zudem einer großen Schwankungsbreite. Mögliche Ursachen könnten hierfür im Vorgang des Zellabschabens oder Abtrypsiniens der Zellen liegen. Womöglich wurden nicht alle tatsächlich durch das Matrigel gewanderten Zellen von der Unterseite der Inserts abgelöst und in das Medium übertragen. Auch beim Folgeschritt des Versuches kann es zu Fehlern gekommen sein. Für die Bestimmung der Zahl abgeschabter Zellen wurden diese mittels CTB bestimmt. Kleinste Zellzahlunterschiede könnten möglicherweise nicht sensitiv genug erfasst worden sein. In weiteren Versuchsdurchführungen könnte man demnach die Methode der Zellzahlbestimmung variieren. Denkbar wäre beispielsweise der Einsatz einer Fluoreszenzfärbung mit einem

Vitalfarbstoff oder die direkte lichtmikroskopische Auszählung der sich am Insertboden befindenden Zellen. Auch die Konzentration von 5 µg/ml des UFH könnte zu niedrig gewesen sein, um einen deutlichen Effekt zu erzielen. Voudouri et al. nutzten mit 10 µg/ml die doppelte Konzentration für einen Versuch mit B6F6-Zellen, einer Fibrosarkomzelllinie, und erzielten damit deutliche Ergebnisse für das Invasionsverhalten (Voudouri et al. 2016).

Die Auswertung der Ergebnisse des Wound-Healing-Assays zeigte, dass sich MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen in ihrem Migrationsverhalten deutlich unterscheiden. Über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet, wiesen MDA-MB-231-Zellen abhängig von der Zeit und je nach eingesetztem Stimulus ein differenziertes Migrationsverhalten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf. Dabei ist zu beachten gewesen, dass die Effekte im Zeitraum unter 24 Stunden zu gering waren, um sie aussagekräftig vergleichen zu können. Nach 24 Stunden begannen die MDA-MB-231-Zellen zusätzlich zu proliferieren. Auf den Einbezug der Flächen wurde deshalb für die Zeit nach 48 Stunden im Weiteren verzichtet, da der Defekt des Zellrasens nicht mehr allein nur durch Migration, sondern zusätzlich durch Proliferation geschlossen wurde. Betrachtete man dahingegen im Vergleich dazu die MCF-7-Zellen, so wurde in der Videosequenz deutlich, dass sie allein durch Proliferation den Zelldefekt schlossen und es zu keiner echten Migration gekommen ist. Dies ist ein entscheidender Unterschied beider Mammakarzinomzelllinien.

Auffallend bei den MDA-MB-231-Zellen war, dass das eingesetzte unfraktionierte Heparin die Migration im Vergleich zu den unbehandelten Zellen steigern konnte. Der Zusatz von HGF bzw. EGF als alleiniger Stimulus hatte keinen signifikanten Einfluss. Kombinierte man nun die Stimuli jeweils mit Heparin, zeigte sich ein nahezu identisches Migrationsverhalten wie bei den unbehandelten Zellen. Heparin konnte also in Kombination mit HGF bzw. EGF die Migration nicht mehr forcieren, wie es unter alleinigem Einsatz möglich war. Die MDA-MB-231-Zellen migrierten durch Stimulation mit HGF bzw. EGF in Kombination mit Heparin nur noch mit ihrer basalen Geschwindigkeit. So ist es denkbar, dass die durch Heparin geförderte Migration durch HGF bzw. EGF so weit unterdrückt werden konnte, dass sie wieder etwa auf dem Level der unbehandelten Zellen lag. Zusätzlich zeigte sich in der Tendenz, dass HGF als Stimulus sogar die Migration unterdrücken kann. Aufgrund der Standardabweichung lässt sich dies aber nicht signifikant feststellen und müsste in weiteren Durchführungen näher untersucht werden.

Heparin ist in der Lage, an HGF zu binden (Basilico et al. 2008). Letzteres selbst hat wiederum eine hohe Affinität zu Heparin (Naka et al. 1993). Entgegen unseren Ergebnissen zeigte Desiderio, dass HGF in der Lage ist, die Migration der Zellen zu

fördern (Desiderio 2007). Unsere Ergebnisse des Wound-Healing-Assays ergaben, dass auch Heparin allein in der Lage ist, die Migration der MDA-MB-231-Zellen zu forcieren. Dies lässt die Annahme zu, dass nach Bindung von Heparin an HGF beide Liganden nicht mehr in ausreichender Menge zur Verfügung stehen und es somit zu keiner Förderung der Migration kommt, diese sogar in der Tendenz vermindert wird. In weiteren Versuchen könnte dem nun genauer nachgegangen werden. So könnte überprüft werden, ob dieser Effekt auch für niedermolekulare Heparine zu beobachten ist. In den Versuchen zur Zytokinsekretion und -expression dieser Arbeit fiel des Weiteren auf, dass das unfraktionierte Heparin einen deutlichen Effekt auf die IL-8-Sekretion hatte und dieser auch auftrat, wenn die MDA-MB-231-Zellen zuvor mit HGF stimuliert wurden. Die Erkenntnisse aus den Migrationsversuchen lassen nun aber vermuten, dass es sich beim Wound-Healing-Assay um IL-8-unabhängige Effekte handelt. Um das nachzuweisen, könnte man das IL-8-Gen in künftigen Untersuchungen ausknocken, bevor der eigentliche Migrationsversuch erneut durchgeführt wird.

Die Invasion von Tumorzellen ist ein komplexer Prozess, der sich aus mehreren Schritten zusammensetzt. Gewebestrukturen und Zellbarrieren müssen durchbrochen bzw. überwunden werden, Tumorzellen müssen sich aus dem Zellverband lösen und anschließend wieder in einem entfernten Gewebe ansiedeln (Friedl et Wolf 2003). Da sie unmittelbar miteinander gekoppelt sind, lassen sich die Aspekte „Migration“ und „Invasion“ nur zusammen erläutern. Betrachtet man in-situ Mammakarzinome wie z. B. das DCIS, so handelt es sich hier zunächst um Karzinomzellen, die sich innerhalb der Milchgänge befinden und noch vom Milchgangepithel begrenzt werden. Erst mit dem Übertritt von Tumorzellen durch die Basalmembran der Milchgänge gelangen sie ins umgebende Brustgewebe und der Tumor gilt von da an als invasives Karzinom (McSherry et al. 2007). Für das Herauslösen der Tumorzellen aus dem Gewebeverband, um schließlich in Blut- und Lymphgefäße zu gelangen, ist es notwendig, dass die Zellen zu Migration und Invasion fähig sind (Chambers et al. 2002). Die Tumorzellen nutzen dabei ähnliche Mechanismen, wie sie physiologisch auch in der Embryogenese und Wundheilung vorkommen (Friedl et Bröcker 2000). Der Vorgang der Invasion von Tumorzellen und damit die Entstehung von Metastasen wird üblicherweise als Migration einzelner Zellen verstanden. Losgelöst aus dem Zellverband gelangen sie in Blut- und Lymphgefäße und somit zu weiter entfernten Organen, um sich in diesen anzusiedeln (Friedl et Wolf 2003). Dies trifft aber nicht für alle Tumorentitäten gleichermaßen zu. Beispiele für die Migration einzelner Tumorzellen sind Lymphome und Leukämien. Hierfür müssen sich Tumorzellen bspw. über den Verlust von Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin aus dem Zellverband

herauslösen. Die Tumorzellen können sich dann amöboidartig durch das Gewebe bewegen (Thiery 2002). Für epitheliale Tumoren wie das Mammakarzinom ist es im Gegensatz dazu typisch, in einem kleineren Zellverband strang- oder haufenartig zu wandern. Die Migration von Tumorzellen wird sowohl durch extrazelluläre Komponenten wie Integrine, Adhäsionsmoleküle und Proteasen als auch durch intrazelluläre Bestandteile wie das Zytoskelett und sezernierte Zytokine beeinflusst (Friedl et Wolf 2003). Arihiro et al. beschrieben eine Sklerosierung und ein lymphozytäres Infiltrat in malignen Mammatumoren (Arihiro et al. 2000). Dieses Infiltrat kann durch Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. IL-8 ebenfalls Einfluss auf die Migration nehmen. Wandern Tumorzellen in Gruppen, so ist zudem eine Kommunikation der Zellen untereinander anzunehmen. Als Vorteil wäre denkbar, dass die Tumorzellen in der Gruppe mehr jener Faktoren produzieren können, welche die Migration erleichtern, wie z. B. Proteasen zur Überwindung von Gewebsbarrieren oder proinflammatorische Zytokine, um das Umgebungsgewebe durch eine lokale Inflammation aufzulockern. Außerdem wären die Zellen im Inneren der Gruppe vor Angriffen durch das Immunsystem des Patienten geschützt.

Für die MDA-MB-231-Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie die proinflammatorisch wirksamen Zytokine IL-8 und IL-11 sezernieren. Zytokine, welche von den Tumorzellen selbst produziert werden, haben ebenfalls das Potential, die Invasion und Migration autokrin zu beeinflussen. Von mehreren Zytokinen ist bekannt, dass sie auch die Motilität von Mammakarzinomzellen verändern können. HGF (Matsumoto et Nakamura 1996), EGF (Price et al. 1996), TGF- β (Padua et Massagué 2009) und SDF-1 α (Kang et al. 2005) wirken migrations- und somit auch invasionsfördernd auf Tumorzellen. In der Arbeit von Desiderio wurde in Zusammenhang mit HGF eine verminderte Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin beschrieben, was somit sowohl die Migration als auch die Invasion beeinflussen kann (Desiderio 2007). Wir haben HGF zusätzlich zu den Zellen als Stimulationsfaktor hinzugegeben. Wie hoch die basale HGF-Sekretion der MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen war, wurde nicht bestimmt. Da bei Patienten mit höher malignen Tumoren bereits mehr HGF nachgewiesen werden konnte (Jin et al. 1997), ist aber anzunehmen, dass die niedrig differenzierte Zelllinie MDA-MB-231 (Lin et al. 2003; Chavez et al. 2010) eine höhere basale HGF-Sekretion aufweist als die besser differenzierte MCF-7-Zelllinie. Auch EGF und sein Rezeptor EGFR wurden als wichtige Faktoren für die Tumorgenese beschrieben (Normanno et al. 2006). Im Tumorgewebe liegt eine Dauerstimulation des EGFR vor, da das kanzeröse Gewebe in der Lage ist, kontinuierlich Liganden für diesen Rezeptor zu produzieren (Hynes et Lane 2005; Mendelsohn et Baselga 2000). In allen

Arten von Mammakarzinomen kommt es zu einer Überexpression von EGFR, wobei die höchste Expression bei triple-negativen Tumoren nachweisbar ist. Eine Überexpression von EGFR ist zudem mit einer großen Tumormasse und einer schlechten Prognose assoziiert (Masuda et al. 2012).

Das eingesetzte unfraktionierte Heparin konnte die Zytokinsekretion von IL-8 und IL-11 reduzieren. Es ist bekannt, dass auch NFκ-B, ein Transkriptionsfaktor, die IL-8-Produktion beeinflussen kann. So führt eine Hemmung von NFκ-B zu einer verringerten Expression von IL-8 (Freund et al. 2003). In unserer Arbeitsgruppe zeigten Spratte et al. bereits, dass unfraktioniertes Heparin die NFκ-B-vermittelte Sekretion und Expression von IL-8 in humanen Stromazellen des Endometriums senken konnte (Spratte et al. 2013). NFκ-B ist außerdem in der Lage die Zellmorphologie, die Proliferation, die Migration und die Invasion von Tumorzellen zu beeinflussen (Kuai et al. 2012). Für Östrogenrezeptor-negative Mammakarzinomzelllinien wie MDA-MB-231 konnte eine kontinuierliche Aktivität von NFκ-B gezeigt werden, wohingegen es normalerweise inaktiv im Gewebe vorliegt (Nakshatri et al. 1997). So könnte Heparin auch in Mammakarzinomzellen am NFκ-B-Signalweg angreifen und über den Zwischenschritt der Zytokinregulation, die Migration und Invasion herabregulieren.

Syndekane, eine Familie membranständiger Proteoglykane (Syndekan-1, -2, -3 und -4), scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Migration zu spielen. Man nimmt an, dass es ihnen möglich ist, extrazelluläre Signale auf das Zellinnere zu übertragen (Lories et al. 1992). Sie sind fähig, die Zellbeweglichkeit sowie die Haftung von Zellen untereinander sowie an der extrazellulären Matrix zu verändern, indem sie Einfluss auf das Zytoskelett nehmen können (Morgan et al. 2007; Couchman 2010). Abhängig vom Syndekantyp haben sie unterschiedliche Effekte auf das Mammakarzinom. So fördert Syndekan-1 die Ausbreitung von Tumorzellen im Brustgewebe, aber auch die Bindung von Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix, was wiederum das Invasionsverhalten hemmt (Beauvais et Rapraeger 2003). Kontroverserweise gilt Syndekan-1 beim Mammakarzinom als Marker für eine schlechtere Prognose (Lendorf et al. 2001; Stanley et al. 1999). Syndekan-4 ist im Gegensatz dazu mit einem positiven Rezeptorstatus für Östrogen und Progesteron und somit mit einer besseren Prognose für das Mammakarzinom verbunden (Lendorf et al. 2001). Auch Syndekan-2 wurde vermehrt in Mammatumoren nachgewiesen und ist ebenfalls mit dem Invasionsverhalten und somit mit der Entstehung von Metastasen verbunden. Lim et al. zeigten zudem, dass eine Verminderung von Syndekan-2 das Invasionsvermögen der Zellen deutlich reduzierte (Lim et al. 2015). Die Migration und Invasion von Mammakarzinomzellen könnte somit auch über die Hemmung der Signalwege der Syndekane erfolgen. Sie besitzen eine

extrazelluläre und eine zytoskelettassoziierte Domäne. Heparin, als exogener kompetitiver Hemmer gegenüber Syndekan eingesetzt, könnte über diesen Weg das Zytoskelett und damit die Zellform beeinflussen, die Morphologie der Tumorzelle verändern und somit ihr Invasionspotential verringern.

Henrikson et al. zeigten in ihren Experimenten, dass auch Thrombin in der Lage ist, das Invasionsverhalten der MDA-MB-231-Zellen zu fördern. Diese tragen auf ihrer Zelloberfläche den Thrombinrezeptor PAR-1, einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (Hernández et al. 2009). MCF-7-Zellen weisen diesen Rezeptor jedoch nicht auf und werden folglich nicht von Thrombin beeinflusst (Henriksen et al. 1999). In einer klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor PAR-1 bei fortgeschrittenen, metastasierten Mammakarzinomen überexprimiert vorlag und somit mit einer deutlich schlechteren Prognose einherging. Wiesen Tumoren neben PAR-1 auch EGFR auf, so hatten die Patienten ein besonders hohes Metastasierungsrisiko (Hernández et al. 2009). Thrombin ist in der Lage, das Wachstum des Tumors, die Angiogenese und die Metastasierung zu beeinflussen (Nierodzik et Karpatkin 2006). Heparin bildet im Körper einen Komplex mit Antithrombin III (Niers et al. 2006). Dieser Heparin-ATIII-Komplex inaktiviert wiederum Thrombin (Liu et al. 1995). Heparin könnte so im Organismus auch die Aktivität von PAR-1 regulieren und damit Einfluss auf das Migrations- und Invasionsverhalten nehmen.

Des Weiteren zeigten Lim et al. 2015, dass Heparin auch Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett von MDA-MB-231-Zellen nehmen kann. Die Zellen wiesen nach der Heparinbehandlung mehr intrazelluläre Mikrofilamentbündel und erheblich mehr Zell-Zell-Kontakte auf als die unbehandelte Kontrollgruppe. Dabei wurden für Cadherin-11 die höchsten Werte gemessen (Lim et al. 2015). Cadherin-11 ist ein Protein der Zellmembran, das u. a. für die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten verantwortlich ist (Pishvaian et al. 1999). Der Verlust von Zell-Zell-Kontakten ist ein wesentlicher Faktor für die Fähigkeit von Tumorzellen, sich aus dem Zellverband zu lösen und sich in weiter entfernten Geweben anzusiedeln (Friedl et Wolf 2003). Weisen Mammakarzinomzellen nun nach einer Behandlung mit Heparin mehr Zell-Zell-Kontakte auf, würde eine Metastasierung dadurch erschwert werden.

Eine stattgehabte Metastasierung geht immer mit einer schlechteren Prognose für die Patienten einher. Liegen Fernmetastasen vor, ist die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt nicht mehr heilbar und es wird ein palliatives Therapiekonzept empfohlen (Cristofanilli et al. 2005). So ist es von enormer Wichtigkeit, frühzeitig, also bevor eine Ausbreitung der Tumorzellen in weitere Gewebe erfolgt ist, therapeutisch anzugreifen. Ein wichtiger Aspekt scheint hierbei die Motilität der Tumorzellen selbst zu sein.

In den zu dieser Arbeit durchgeführten Experimenten stellten sich deutliche Unterschiede im Verhalten der MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen dar. Schlecht differenzierte Tumorzellen, zu denen auch die MDA-MB-231-Zellen zählen (Liu et al. 2003; Chavez et al. 2010), haben bekanntermaßen ein höheres Migrationspotential als besser differenzierte Zellen wie die Gruppe der MCF-7. In dieser Arbeit konnte dies bestätigt und darüber hinaus gezeigt werden, dass die MCF-7-Zellen kein „echtes“ Migrationsverhalten aufweisen. Die Beobachtung der MCF-7-Zellen zeigte, dass sie nicht wirklich migrierten, sondern den künstlich geschaffenen Defekt im Zellrasen allein durch Proliferation schlossen. Die MDA-MB-231-Zellen migrierten im Gegensatz dazu nachweislich, was einen entscheidenden Unterschied zwischen beiden Zelllinien darstellt.

Unfraktioniertes Heparin konnte in unseren Untersuchungen verschiedene Aspekte der MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen teilweise signifikant beeinflussen. Die Ergebnisse unterschieden sich dabei erheblich zwischen den einzelnen Zelllinien, sodass die beschriebenen Effekte als zelllinienspezifisch zu werten sind. In weiteren sich anschließenden Versuchen könnten niedermolekulare Heparine wie Enoxaparin oder Dalteparin genauer betrachtet werden, um auch deren Einfluss auf die Zytokinsekretion, Proliferation, Invasion und Migration von humanen Mammakarzinomzellen zu untersuchen und etwaige Unterschiede für beide Zelllinien beschreiben und weiter diskutieren zu können.

4.4 Heparin und Tumoren

Tumorpatienten werden zur Thromboseprophylaxe oftmals mit Heparinen behandelt (Lyman et al. 2007). Schon 1865 wurde eine erhöhte Inzidenz von Venenthrombosen bei Patienten mit Magenkarzinomen beschrieben (Donati 2009). Dass Thrombosen mitunter sogar tödliche Komplikation bei Tumorerkrankungen darstellen, wurde bereits in den 1930er Jahren beschrieben (Khorana 2004; Sproul 1938). Des Weiteren können Thrombosen auch Hinweis für eine bislang nicht bekannte Krebserkrankung sein (Elyamany et al. 2014; Vavlukis et al. 2016). Dass Heparine in der Lage sind, sich positiv auf die Überlebenszeit der Patienten auszuwirken, konnte zudem in retrospektiven Studien anhand verschiedener Tumoren, inklusive dem Mammakarzinom, gezeigt werden. Den größten Nutzen scheinen laut Studienlage Patienten zu haben, die sich in einem sehr frühen Krankheitsstadium befinden (Zhang et al. 2016; Sandford et al. 2014). Der genaue Mechanismus, wie Heparin und seine Derivate das Tumorstadium und die Metastasierung beeinflussen, ist noch nicht abschließend geklärt. Fest steht aber, dass Heparin neben seinen antikoagulatorischen Eigenschaften noch weitere Fähigkeiten besitzt.

Eine Möglichkeit ist z. B., dass Heparin die Bildung von Metastasen durch eine Beeinflussung der Blutplättchen-Tumorzell-Interaktion hemmt und so bspw. verhindert, dass Plättchen-Tumorzell-Aggregate in Gefäße gelangen (Rickles et al. 2003). Borsig et al. beschrieben, dass Heparin in der Lage ist, die Selektin-vermittelten Zell-Zell-Interaktionen zu hemmen und somit das Auswandern von Tumorzellen in den Blutstrom zu verhindern (Borsig et al. 2001). Der Einsatz von Heparinen bei Tumorpatienten ist jedoch aufgrund seiner Eigenschaft, die Hämostase zu beeinflussen, streng limitiert. Eine Förderung der Blutungsneigung ist bei Tumorpatienten von entscheidendem Nachteil, da sich dadurch potentielle Komplikationen wie Blutungen nicht mehr so gut kontrollieren lassen. Es wird daher an modifizierten, chemisch hergestellten Heparinen geforscht, welche sowohl antimetastatische als auch antiangiogenetische Eigenschaften besitzen sollen, deren antikoagulatorisches Potential jedoch deutlich reduziert oder ganz eliminiert wäre (Casu et al. 2009). Solche neuen, nicht antikoagulatorisch wirksamen Heparine könnten klinisch völlig anders eingesetzt werden. So wäre der Einsatz höherer Dosierungen möglich, um die antitumorösen Eigenschaften ohne Blutungskomplikationen voll auszunutzen. Damit könnten demnach auch Patienten mit gesteigerter Blutungsneigung oder bereits stattgehabten Blutungskomplikationen von deren Einsatz profitieren. Auch in Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Heparin neben seiner antikoagulatorischen Wirkung weitere nutzbare Eigenschaften besitzt. In unseren Versuchen konnte u. a. gezeigt werden, dass unfraktioniertes Heparin Einfluss auf die Zytokinsekretion von IL-8 nehmen kann, darüber hinaus kann es P- und L-Selektine blockieren (Stevenson et al. 2007) und die Angiogenese hemmen (Shen et al. 2011).

Im Fall des humanen Mammakarzinoms scheint nicht nur die Art des eingesetzten Heparins, sondern auch seine Konzentration, die Anwendungsdauer sowie die Molekülgröße Einfluss auf die Tumorzellen zu nehmen (Fluhr et al. 2013). Außerdem ist der Zeitpunkt der Heparinapplikation von entscheidender Bedeutung. Auch hierzu wurde bereits im Tiermodell gezeigt, dass die Gabe von Heparin parallel zur Injektion von Tumorzellen ins Tier die Zahl der Metastasen verringerte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei wurden neben der Metastasierung des Mammakarzinoms auch die der Kolonkarzinome, Melanome und Lungenkarzinome im Mausmodell untersucht (Vlodavsky et al. 1994-1995; Ludwig et al. 2004).

Zusammenfassend lässt sich somit bisher sowohl ein antiinflammatorischer als auch ein antiinvasiver Effekt für Heparine in Bezug auf Tumoren festhalten.

4.5 Methodik Zellkultur

Diese Arbeit wurde auf der Grundlage von Zellkulturen durchgeführt. Alle in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften der humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 beruhen somit auf in-vitro-Versuchen und die dadurch gewonnenen Erkenntnisse. Zellkulturen haben eine Vielzahl von Vorteilen. So können die Zelllinien weltweit erworben, für Versuche eingesetzt und die Ergebnisse mit denen anderer Forschungsgruppen verglichen werden. Die gekauften Zelllinien werden mit einer exakten Charakterisierung, einer Art Steckbrief, geliefert und man erfährt somit genau, welche Kulturbedingungen nötig sind und welche Eigenschaften die Zellen haben (z. B. Morphologie und Rezeptorstatus). Man erlangt durch die Zellkultur aus erworbenen Zellen eine gewisse Art von Unabhängigkeit, da man nicht auf frische Patientenproben angewiesen ist. Zellkulturen, welche aus Frischzellen aus Patientenmaterial gewonnen worden sind, sind weniger gut miteinander vergleichbar, da jeder Patient andere Spezifikationen aufweist. Es müssten das Tumorstadium, die Tumorart, das Alter der Patienten, genetische Eigenschaften, eventuelle bereits stattgehabte Therapien und der aktuelle Hormonstatus beachtet werden. So kann man zwar darauf achten, dass z. B. Tumorzellen aus immer der gleichen Tumorentität isoliert werden, dennoch sind die komplexen Eigenschaften eines jeden Organismus ständigen Veränderungen ausgesetzt. Dies erschwert die Bewertung der Ergebnisse einer solchen Zellkultur aus Frischzellen. In-vitro-Versuche sind in der medizinischen Forschung ein etabliertes Modell, um Krankheitsprozesse im Organismus nachzuvollziehen. Sie legen oftmals den Grundstein für weitere Versuchsreihen. Nach Experimenten mit Zellkulturen können auf deren Grundlage weitere Versuche im Tierexperiment und danach in klinischen Studien geplant und durchgeführt werden. Trotz vieler Möglichkeiten ist die Aussagekraft von Zellkulturen zwar begrenzt, sie sind jedoch eine unverzichtbare Methode, um mit ihren Ergebnissen weitere Versuche planen zu können. Auch der Einsatz von Heparin als potentiell wirksames Therapeutikum im Kampf gegen Tumorerkrankungen könnte weiterhin in tierexperimentellen Versuchen und klinischen Studien erprobt werden. Zu beachten ist aber, dass eine Zellkultur nur eine Richtung weist, wohin der therapeutische Weg eines Tages führen könnte. Für Tierversuche und klinische Studien müssten jedoch die Konzentrationen der genutzten Substanzen angepasst werden. Auch wenn man in den Experimenten mittels Zellkulturen aussagekräftige Ergebnisse gewonnen hat, gilt es diese weiter zu hinterfragen und zu prüfen, ob sie auch auf den menschlichen Organismus zu übertragen sind. Ein beständiges, kritisches Auseinandersetzen mit den eigenen Versuchen und Ergebnissen ist in der Forschung unumgänglich. Sind die gewonnenen Erkenntnisse in

Zusammenschau der Ergebnisse relevant und sinnvoll? Können die Ergebnisse in weiteren Versuchen bestätigt werden? Und wie kann man die Ergebnisse mit der klinischen Praxis in Einklang bringen? Nur durch die Beantwortung dieser Fragen können die klinisch tätigen Ärzte und die Forscher von- und miteinander profitieren, um neue Erkenntnisse zu gewinnen und anwenden zu können. In der klinischen Forschung ist man folglich nie auf sich allein gestellt, vielmehr ist man auf eine gute, kollegiale Zusammenarbeit angewiesen, um seine Ergebnisse verstehen und die richtigen Rückschlüsse ziehen zu können. Auch dies kann dann auf den klinischen Alltag übertragen werden, da eine interdisziplinäre Zusammenarbeit in der Behandlung von Tumoren besonders wichtig ist.

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Heparin einen Einfluss auf das Überleben von Tumorpatienten hat. Heparin ist ein stark negativ geladenes Molekül, dadurch kann es Komplexe mit basischen Proteinen bilden. Neben seiner Wirkung auf die Blutgerinnung wurden bei Heparin antikanzerogene Effekte beobachtet, wobei diese nicht in Zusammenhang mit den antikoagulatorischen Eigenschaften zu stehen scheinen. Zytokine, kleine lösliche Proteine, können Einfluss auf die Interaktion und Kommunikation von Zellen nehmen. Des Weiteren sind sie an der Immunantwort unseres Körpers beteiligt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von unfraktioniertem Heparin auf die Proliferation, Zytokinsekretion, Invasion und Migration von humanen Mammakarzinomzelllinien untersucht. Es wurden die humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 eingesetzt. Die Zellen wurden ohne bzw. mit unfraktioniertem Heparin in der Dosierung 5 µg/ml sowie mit den Stimulationsfaktoren HGF, EGF, SDF-1α und TGF-β in den Dosierungen 10 ng/ml und 100 ng/ml inkubiert. Im Anschluss erfolgte zunächst mittels Cell Titer Blue® eine Bestimmung der relativen Zellzahl, um Rückschlüsse auf die Spontanproliferation erhalten zu können. Des Weiteren wurden mittels ELISA die Zytokinsekretion von IL-8, IL-11, RANTES, MCP-1, IP-10 und MIG sowie mittels real-time RT-PCR die Zytokinexpression von IL-8 untersucht. Darüber hinaus wurden der Einfluss von Heparin auf das Invasionsverhalten ermittelt und, zur Echtzeit-Beobachtung der Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen, ein Wound-Healing-Assay (Scratch-Assay) durchgeführt.

Weder die eingesetzten Stimulationsfaktoren HGF, EGF, SDF-1α und TGF-β noch Heparin hatten einen signifikanten Einfluss auf die Spontanproliferation der MDA-MB-231-Zellen. Bei den MCF-7-Zellen konnte sowohl durch HGF als auch durch Heparin die Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe innerhalb von 48 Stunden gesteigert werden.

Heparin konnte die Zytokinsekretion sowohl auf Protein- als auch auf Genebene beeinflussen, dieser Effekt war zelllinien- sowie zytokinspezifisch. Bei den MDA-MB-231-Zellen konnte das eingesetzte Heparin die Zytokinsekretion von IL-8 signifikant und von IL-11 in der Tendenz herabregulieren. Für die MCF-7-Zellen konnte eine basale Sekretion von RANTES nachgewiesen werden, wobei diese nicht durch Heparin oder die Stimulationsfaktoren beeinflusst wurde.

Für IL-8 wurde diese Beobachtung zudem mittels real-time RT-PCR untersucht. Die größten Effekte konnten hier bei den MDA-MB-231-Zellen nach vier und acht Stunden festgestellt werden. Bei den MCF-7-Zellen zeigte sich dahingegen eine unzureichende IL-8-Expression auf Genebene.

Das eingesetzte Heparin hatte keinen wesentlichen Einfluss auf das Invasionsverhalten der MDA-MB-231-Zellen. Auch der Einsatz der Stimulationsfaktoren konnte das Invasionsverhalten der Zellen nicht verstärken. Bei den MCF-7-Zellen konnte innerhalb von 72 Stunden kein Invasionsverhalten beobachtet werden. Im Wound-Healing-Assay konnten für die MDA-MB-231-Zellen keine signifikanten Ergebnisse erreicht werden, wobei Heparin ohne weitere Zusätze in der Tendenz den größten Effekt auf das Migrationsverhalten der Zellen hatte und dieses steigerte. Bei den MCF-7-Zellen konnte dahingegen kein Migrationsverhalten, sondern lediglich Zellproliferation beobachtet werden.

Heparin konnte sowohl die Spontanproliferation, die Zytokinsekretion sowie das Migrationsverhalten der verwendeten humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und MCF-7 zelllinienspezifisch modulieren. Hiermit konnte gezeigt werden, dass Heparin in der Lage ist, das Tumormikromilieu humaner Mammakarzinomzelllinien zu beeinflussen. Heparin kann somit wiederum sowohl in das Tumorstadium selbst als auch in den Metastasierungsprozess eingreifen. Zum weiteren Verständnis, wie Heparin auch weitere Prozesse der Karzinogenese beeinflussen kann, müssten weitere, an diese Arbeit anknüpfende Untersuchungen erfolgen. Es konnte aber gezeigt werden, dass Heparin in der Lage ist, unabhängig von seinen antikoagulatorischen Eigenschaften, auf viele Schritte der Tumorentstehung, des Tumorstadiums und der Ausbreitung der Karzinomzellen Einfluss zu nehmen.

Literaturverzeichnis

- Ahuja SK, Murphy PM. The CXC chemokines growth-regulated oncogene (GRO) alpha, GRO-beta, GRO-gamma, neutrophil-activating peptide-2, and epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide-78 are potent agonists for the type B, but not the type A, human interleukin-8 receptor. *J Biol Chem.* 1996; 271:20,545. doi: 10.1074/jbc.271.34.20545. PMID: 8702798.
- Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, Klunker S, Meyer N, O'Mahony L, Palomares O, Rhyner C, Ouaked N, Schaffartzik A, Van De Veen W, Zeller S, Zimmermann M, Akdis CA. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol.* 2011 Mar;127(3):701-21. doi: 10.1016/j.jaci.2010.11.050.
- Alban S. Pharmakologie der Heparine und der direkten Antikoagulanzen. Hämostaseologie, Schattauer Verlag. 2008; 28: 400-420.
- Alroy I. and Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett.* 1997 Jun 23;410(1):83-6. doi: 10.1016/s0014-5793(97)00412-2. PMID: 9247128.
- Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br J Cancer.* 2000 Nov;83(10):1301-8. doi: 10.1054/bjoc.2000.1407. PMID: 11044354; PMCID: PMC2408797.
- Arihiro K, Oda H, Kaneko M, Inai K. Cytokines facilitate chemotactic motility of breast carcinoma cells. *Breast Cancer.* 2000;7(3):221-30. doi: 10.1007/BF02967464. PMID: 11029802.
- Aust G, Steinert M, Kiessling S, Kamprad M, Simchen C. Reduced expression of stromal-derived factor 1 in autonomous thyroid adenomas and its regulation in thyroid-derived cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jul;86(7):3368-76. doi: 10.1210/jcem.86.7.7654. PMID: 11443213.

- Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 1992 Jul 27;307(1):97-101. doi: 10.1016/0014-5793(92)80909-z. PMID: 1639201.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001 Feb 17; 357(9255):539-45. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0. PMID: 11229684.
- Basham VM, Lipscombe JM, Ward JM, Gayther SA, Ponder BA, Easton DF, Pharoah PD. BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based study of male breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2002;4(1):R2. doi: 10.1186/bcr419. Epub 2001 Nov 21. PMID: 11879560; PMCID: PMC83848.
- Beauvais DM, Rapraeger AC. Syndecan-1-mediated cell spreading requires signaling by alphavbeta3 integrins in human breast carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2003 Jun 10;286(2):219-32. doi: 10.1016/s0014-4827(03)00126-5. PMID: 12749851.
- Benoy I, Salgado R, Van Dam P, Geboers K, Van Marck E, Scharpe S, Vermeulen P, Dirix L. Increased Serum Interleukin-8 in Patients with Early and Metastatic Breast Cancer Correlates with Early Dissemination and Survival. *Clin Cancer Res.* 2004 Nov 1;10(21):7157-62. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0812. PMID: 15534087.
- Bodnar R. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *AdvWound Care (New Rochelle).* 2013; 2(1): 24–29. doi: 10.1089/wound.2011.0326. PMID: 24527320; PMCID: PMC3840479.
- Böcker W, Denk H, Heitz Ph. U, Höfler G, Kreipe H, Moch H. *Pathologie. 5., vollständig überarbeitete Auflage 2012. ©Elsevier GmbH, München. Kapitel 42: Mamma. 42.1. Normale Struktur und Funktion.*
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* 2005 Apr;7(2):122-33. doi: 10.1215/S1152851704001061. PMID: 15831231; PMCID: PMC1871893.

- Bronger H, Kraeft S, Schwarz-Boeger U, Cerny C, Stöckel A, Avril S, Kiechle M, Schmitt M. Modulation of CXCR3 ligand secretion by prostaglandin E2 and cyclooxygenase inhibitors in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012 Feb 14;14(1):R30. doi: 10.1186/bcr3115. PMID: 22333315; PMCID: PMC3496148.
- Brown Z, Strieter RM, Neild GH, Thompson RC, Kunkel SL, Westwick J. IL-1 receptor antagonist inhibits monocyte chemotactic peptide 1 generation by human mesangial cells. *Kidney Int.* 1992 Jul;42(1):95-101. doi: 10.1038/ki.1992.266. PMID: 1386129.
- Burstein HJ, Prestrud AA, Seidenfeld J, Anderson H, Buchholz TA, Davidson NE, Gelmon KE, Giordano SH, Hudis CA, Malin J, Mamounas EP, Rowden D, Solky AJ, Sowers MR, Stearns V, Winer EP, Somerfield MR, Griggs JJ; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline: update on adjuvant endocrine therapy for women with hormone receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010 Aug 10;28(23):3784-96. doi: 10.1200/JCO.2009.26.3756. Epub 2010 Jul 12. PMID: 20625130; PMCID: PMC5569672.
- Cailleau R, Olivé M, Cruciger QV. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin: preliminary characterization. *In Vitro.* 1978 Nov;14(11):911-5. doi: 10.1007/BF02616120. PMID: 730202.
- Calon A, Espinet E, Palomo-Ponce S, Tauriello DV, Iglesias M, Céspedes MV, Sevillano M, Nadal C, Jung P, Zhang XH, Byrom D, Riera A, Rossell D, Mangués R, Massagué J, Sancho E, Batlle E. Dependency of colorectal cancer on a TGF- β -driven program in stromal cells for metastasis initiation. *Cancer Cell.* 2012 Nov 13;22(5):571-84. doi: 10.1016/j.ccr.2012.08.013. PMID: 23153532; PMCID: PMC3512565.
- Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 1990 May 15;265(14):7709-12. PMID: 2186024.
- Castelli R, Porro F, Tarsia P. The heparins and cancer: review of clinical trials and biological properties. 2004 May;9(3):205-13. doi: 10.1191/1358863x04vm566ra. PMID: 15675186.

- Castellot JJ Jr, Pukac LA, Caleb BL, Wright TC Jr, Karnovsky MJ. Heparin selectively inhibits a protein kinase C-dependent mechanism of cell cycle progression in calf aortic smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 1989 Dec;109(6 Pt 1):3147-55. doi: 10.1083/jcb.109.6.3147. Erratum in: *J Cell Biol* 1990 Mar;110(3):863. PMID: 2592420; PMCID: PMC2115892.
- Casu B, Vlodaysky I, Sanderson RD. Non-Anticoagulant Heparins and Inhibition of Cancer. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2009 Jan; 36(3-4): 195–203. doi: 10.1159/000175157. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19176992; PMCID: PMC2768601.
- Chavey C, Bibeau F, Gourgou-Bourgade S, Burlincho S, Boissière F, Laune D, Roques S, Lazennec G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* 2007; 9(1):R15. doi: 10.1186/bcr1648. PMID: 17261184; PMCID: PMC1851386.
- Chavez KJ, Garimella SV, Lipkowitz S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* 2010; 32(1-2): 35–48. doi: 10.3233/BD-2010-0307. PMID: 21778573; PMCID: PMC3532890.
- Chen WY, Manson JAE, Hankinson SE, Rosner B, Holmes MD, Willett WC, Colditz GA. Unopposed estrogen therapy and the risk of invasive breast cancer. *Arch Intern Med.* 2006 May 8;166(9):1027-32. doi: 10.1001/archinte.166.9.1027. PMID: 16682578.
- Chen Y, Shi M, Yu GZ, Qin XR, Jin G, Chen P, Zhu MH. Interleukin-8, a promising predictor for prognosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2012 Mar 14;18(10):1123-9. doi: 10.3748/wjg.v18.i10.1123. PMID: 22416189; PMCID: PMC3296988.
- Chen Y, Chen L, Li JY, Mukaida N, Wang Q, Yang C. ERbeta and PEA3 co-activate IL-8 expression and promote the invasion of breast cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2011 Mar 1;11(5):497-511. doi: 10.4161/cbt.11.5.14667. Epub 2011 Mar 1. PMID: 21266854.

- Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, Waring P, Cummings M, Brinkworth R, Deffenbaugh AM, Burbidge LA, Pruss D, Judkins T, Scholl T, Bekessy A, Marsh A, Lovelock P, Wong M, Tesoriero A, Renard H, Southey M, Hopper JL, Yannoukakos K, Brown M, Easton D, Tavtigian SV, Goldgar D, Spurdle AB; kConFab Investigators. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):2019-27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3546. PMID: 16489001.
- Chuntharapai A, Lee J, Hebert CA, Kim KJ. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J Immunol.* 1994 Dec 15;153(12):5682-8. PMID: 7527448.
- Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, Monteiro AN, Greenblatt MS, de Wind N; IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1314-26. doi: 10.1002/humu.20899. PMID: 18951449; PMCID: PMC2771414.
- Couchman JR. Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:89-114. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104126. PMID: 20565253.
- Coussens L M, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature.* 2002 Dec 19-26;420(6917):860-7. doi: 10.1038/nature01322. PMID: 12490959; PMCID: PMC2803035.
- Cristofanilli M, Hayes DF, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Reuben JM, Doyle GV, Matera J, Allard WJ, Miller MC, Fritsche HA, Hortobagyi GN, Terstappen LW. Circulating tumor cells: a novel prognostic factor for newly diagnosed metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Mar 1;23(7):1420-30. doi: 10.1200/JCO.2005.08.140. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2005 Jul 20;23(21):4808. PMID: 15735118.
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jul;87(13):5134-8. doi: 10.1073/pnas.87.13.5134. PMID: 1695010; PMCID: PMC54276.

- Darby S, McGale P, Correa C, Taylor C, Arriagada R, Clarke M, Cutter D, Davies C, Ewertz M, Godwin J, Gray R, Pierce L, Whelan T, Wang Y, Peto R. Effect of radiotherapy after breast-conserving surgery on 10-year recurrence and 15-year breast cancer death: meta-analysis of individual patient data for 10,801 women in 17 randomised trials. *Lancet*. 2011 Nov 12;378(9804):1707-16. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61629-2. Epub 2011 Oct 19. PMID: 22019144; PMCID: PMC3254252.
- Datta D, Flaxenburg JA, Laxmanan S, Geehan C, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S. Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res*. 2006 Oct 1;66(19):9509-18. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4345. PMID: 17018607.
- David H. Rudolf Virchow and modern aspects of tumor pathology. *Pathol Res Pract*. 1988 Jun;183(3):356-64. doi: 10.1016/S0344-0338(88)80138-9. PMID: 3047716.
- Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, McGale P, Pan HC, Taylor C, Wang YC, Dowsett M, Ingle J, Peto R. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011 Aug 27;378(9793):771-84. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60993-8. Epub 2011 Jul 28. PMID: 21802721; PMCID: PMC3163848.
- Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, Budczies J, Darb-Esfahani S, Kronenwett R, Hanusch C, von Törne C, Weichert W, Engels K, Solbach C, Schrader I, Dietel M, von Minckwitz G. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 1;28(1):105-13. doi: 10.1200/JCO.2009.23.7370. Epub 2009 Nov 16. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):708. PMID: 19917869.
- Desiderio MA. Hepatocyte growth factor in invasive growth of carcinomas. *Cell Mol Life Sci*. 2007 Jun;64(11):1341-54. doi: 10.1007/s00018-007-7050-x. PMID: 17415522.

- Deutsche Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe e. V. (2009). Peri- and Postmenopause – Diagnosis and Interventions. Guideline of the DGGG, SGGG and OEGGG (S3 Level, AWMF Registry No. 015-062, January 2020). <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/015-062.html> (abgerufen am: 02.02.2020)
- Dietel M, Lewis MA, Shapiro S. Hormone replacement therapy: pathological aspects of hormone-sensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Hum Reprod.* 2005 Aug;20(8):2052-60. doi: 10.1093/humrep/dei043. Epub 2005 Jun 2. PMID: 15932918.
- Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest.* 2000 Aug;118(2):503-8. doi: 10.1378/chest.118.2.503. PMID: 10936147.
- Donati MB. Thrombosis and cancer: Trousseau syndrome revisited. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2009 Mar;22(1):3-8. doi: 10.1016/j.beha.2009.01.005. PMID: 19285268.
- Dunn BK, Wickerham DL, Ford LG. Prevention of hormonereLATED cancers: breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 10;23(2):357-67. doi: 10.1200/JCO.2005.08.028. PMID: 15637398.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 1998 Sep 19;352(9132):930-42. PMID: 9752815.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005 May 14-20;365(9472):1687-717. doi: 10.1016/S0140-6736(05)66544-0. PMID: 15894097.
- Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, Hankinson SE. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Oct 4;98(19):1406-15. doi: 10.1093/jnci/djj376. PMID: 17018787.

- Elyamany G, Alzahrani AM, Bukhary E. Cancer-Associated Thrombosis: An Overview. *Clin Med Insights Oncol.* 2014 Dec 4;8:129-37. doi: 10.4137/CMO.S18991. PMID: 25520567; PMCID: PMC4259501.
- European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Capri Workshop Group. Hormones and breast cancer. *Hum Reprod Update.* 2004 Jul-Aug;10(4):281-93. doi: 10.1093/humupd/dmh025. Epub 2004 Jun 10. PMID: 15192054.
- Ferguson T, Wilcken N, Vagg R, Gherzi D, Nowak AK. Taxanes for adjuvant treatment of early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct 17;(4):CD004421. doi: 10.1002/14651858.CD004421.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Sep 02;9:CD004421. PMID: 17943815.
- Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2002;42:469-99. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091901.115838. PMID: 11807180.
- Fisher B, Anderson S. Conservative surgery for the management of invasive and noninvasive carcinoma of the breast: NSABP trials. National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project. *World J Surg.* 1994 Jan-Feb; 18(1):63-9. doi: 10.1007/BF00348193. PMID: 8197778.
- Fisher B, Anderson S, Tan-Chiu E, Wolmark N, Wickerham DL, Fisher ER, Dimitrov NV, Atkins JN, Abramson N, Merajver S, Romond EH, Kardinal CG, Shibata HR, Margolese RG, Farrar WB. Tamoxifen and chemotherapy for axillary node-negative, estrogen receptor-negative breast cancer: findings from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-23. *J Clin Oncol.* 2001 Feb 15;19(4):931-42. doi: 10.1200/JCO.2001.19.4.931. PMID: 11181655.
- Floyd SR, Taghian AG. Post-mastectomy radiation in large node-negative breast tumors: does size really matter? *Radiother Oncol.* 2009 Apr;91(1):33-7. doi: 10.1016/j.radonc.2008.09.015. Epub 2009 Feb 7. PMID: 19201501.

- Fluhr H, Seitz T, Zygmunt M. Heparins modulate the IFN- γ -induced production of chemokines in human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Jan; 137(1):109-18. doi: 10.1007/s10549-012-2334-8. Epub 2012 Nov 18. PMID: 23160925.
- Freund A, Chauveau C, Brouillet JP, Lucas A, Lacroix M, Licznar A, Vignon F, Lazennec G. IL-8 expression and its possible relationship with estrogen-receptor-negative status of breast cancer cells. *Oncogene.* 2003 Jan 16;22(2):256-65. doi: 10.1038/sj.onc.1206113. PMID: 12527894; PMCID: PMC2034407.
- Gayther SA, Mangion J, Russell P, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. *Nat Genet.* 1997 Jan;15(1):103-5. doi: 10.1038/ng0197-103. PMID: 8988179.
- Grunfeld E, Dhesy-Thind S, Levine M. Clinical practice guidelines for the care and treatment of breast cancer: follow-up after treatment for breast cancer (summary of the 2005 update). *CMAJ.* 2005 May 10;172(10):1319-20. doi: 10.1503/cmaj.045062. PMID: 15883407; PMCID: PMC557103.
- Harenberg J, Huhle G, Piazzolo L, Malsch R. Niedermolekulare Heparine. Prophylaxe und Therapie thromboembolischer Erkrankungen. *Hautarzt.* 1997 Nov;48(11):852-64. German. doi: 10.1007/s001050050676. PMID: 9518253.
- Hart IR, Fidler IJ. Role of organ selectivity in the determination of metastatic patterns of B16 melanoma. *Cancer Res.* 1980 Jul;40(7):2281-7. PMID: 7388794.
- Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW 2nd, Pentecost BT. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *Br J Cancer.* 1999 Feb;79(3-4):401-6. doi: 10.1038/sj.bjc.6690063. PMID: 10027305; PMCID: PMC2362433.
- Hernández NA, Correa E, Avila EP, Vela TA, Pérez VM. PAR1 is selectively over expressed in high grade breast cancer patients: a cohort study. *J Transl Med.* 2009 Jun 18;7:47. doi: 10.1186/1479-5876-7-47. PMID: 19538737; PMCID: PMC2704182.

- Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and Low-Molecular-Weight Heparin Mechanisms of Action, Pharmacokinetics, Dosing, Monitoring, Efficacy, and Safety. *Chest*. 2001 Jan;119(1 Suppl):64S-94S. doi: 10.1378/chest.119.1_suppl.64s. PMID: 11157643.
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*. 1991 Sep 13;253(5025):1278-80. doi: 10.1126/science.1840701. PMID: 1840701.
- Hornung D, Bentzien F, Wallwiener D, Kiesel L, Taylor RN. Chemokine bioactivity of RANTES in endometriotic and normal endometrial stromal cells and peritoneal fluid. *Mol Hum Reprod*. 2001 Feb;7(2):163-8. doi: 10.1093/molehr/7.2.163. PMID: 11160842.
- Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids*. 1975 Dec;26(6):785-95. doi: 10.1016/0039-128x(75)90110-5. PMID: 175527.
- Houssami N, Macaskill P, Marinovich ML, Dixon JM, Irwig L, Brennan ME, Solin LJ. Meta-analysis of the impact of surgical margins on local recurrence in women with early-stage invasive breast cancer treated with breast-conserving therapy. *Eur J Cancer*. 2010 Dec;46(18):3219-32. doi: 10.1016/j.ejca.2010.07.043. PMID: 20817513.
- Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2005 May;5(5):341-54. doi: 10.1038/nrc1609. Erratum in: *Nat Rev Cancer*. 2005 Jul;5(7):580. PMID: 15864276.
- Ikeda A, Aoki N, Kido M, Iwamoto S, Nishiura H, Maruoka R, Chiba T, Watanabe N. Progression of autoimmune hepatitis is mediated by IL-18-producing dendritic cells and hepatic CXCL9 expression in mice. *Hepatology*. 2014 Jul;60(1):224-36. doi: 10.1002/hep.27087. Epub 2014 May 28. PMID: 24700550.
- Jin L, Fuchs A, Schnitt SJ, Yao Y, Joseph A, Lamszus K, Park M, Goldberg ID, Rosen EM. Expression of scatter factor and c-met receptor in benign and malignant breast tissue. *Cancer*. 1997 Feb 15;79(4):749-60. doi: 10.1002/(sici)1097-0142(19970215)79:4<749::aid-cnrc12>3.0.co;2-#. PMID: 9024713.

- Johnstone CN, Chand A, Putoczki TL and Ernst M. Emerging roles for IL-11 signaling in cancer development and progression: Focus on breast cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct;26(5):489-98. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.015. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26209885.
- Kang H, Watkins G, Parr C, Douglas-Jones A, Mansel RE, Jiang WG. Stromal cell derived factor-1: its influence on invasiveness and migration of breast cancer cells in vitro, and its association with prognosis and survival in human breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005;7(4):R402-10. doi: 10.1186/bcr1022. Epub 2005 Apr 4. PMID: 15987445; PMCID: PMC1175055.
- Khatcheressian JL, Wolff AC, Smith TJ, Grunfeld E, Muss HB, Vogel VG, Halberg F, Somerfield MR, Davidson NE; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2006 update of the breast cancer follow-up and management guidelines in the adjuvant setting. *J Clin Oncol.* 2006 Nov 1;24(31):5091-7. doi: 10.1200/JCO.2006.08.8575. Epub 2006 Oct 10. PMID: 17033037.
- Khorana AA, Fine RL. Pancreatic cancer and thromboembolic disease. *Lancet Oncol.* 2004 Nov;5(11):655-63. doi: 10.1016/S1470-2045(04)01606-7. PMID: 15522652.
- Khorana AA, Sahni A, Altland OD, Francis CW. Heparin inhibition of endothelial cell proliferation and organization is dependent on molecular weight. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Nov 1;23(11):2110-5. doi: 10.1161/01.ATV.0000090671.56682.D7. Epub 2003 Aug 14. PMID: 12920044.
- Kreienberg R, Möbius V, Jonat W, Kühn T. Mammakarzinom Interdisziplinär. Kapitel 9 Morphologische Grundlagen, 9.2. Histologische Klassifikation. 4. Auflage. ©Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2010. Seiten 84-88.
- Kunkler I. Adjuvant chest wall radiotherapy for breast cancer: black, white and shades of grey. *Eur J Surg Oncol.* 2010 Apr;36(4):331-4. doi: 10.1016/j.ejso.2009.11.004. Epub 2009 Nov 24. PMID: 19932946.

- Lagiou P, Trichopoulos D. Inflammatory biomarkers and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2011 Jul 20;103(14):1073-5. doi: 10.1093/jnci/djr220. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21685358.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Kurzversion 4.1, 2018, AWMF Registernummer: 032-045OL, 3.3. Frauen mit erhöhtem Risiko für Brustkrebs. 3.3.1. Familiäres Mammakarzinom, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 09.11.2019)
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, Kurzversion 4.1, 2018, AWMF Registernummer: 032-045OL, 4.7. Systemische adjuvante Therapie (endokrine, Chemo- und Antikörpertherapie), <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (abgerufen am: 09.11.2019)
- Lendorf ME, Manon-Jensen T, Kronqvist P, Multhaupt HAB, Couchman JR. Syndecan-1 and Syndecan-4 are independent indicators in breast Carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2011 Jun;59(6):615-29. doi: 10.1369/0022155411405057. Epub 2011 Mar 23. PMID: 21430259; PMCID: PMC3201194.
- Li XJ, Peng LX, Shao JY, Lu WH, Zhang JX, Chen S, Chen ZY, Xiang YQ, Bao YN, Zheng FJ, Zeng MS, Kang TB, Zeng YX, Teh BT, Qian CN. As an independent unfavorable prognostic factor, IL-8 promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition and activation of AKT signaling. *Carcinogenesis.* 2012 Jul;33(7):1302-9. doi: 10.1093/carcin/bgs181. Epub 2012 May 18. PMID: 22610073; PMCID: PMC3405654.
- Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol.* 2004 Feb 15;22(4):735-42. doi: 10.1200/JCO.2004.05.055. PMID: 14966099.

- Linhardt R J, Rice K G, Kim Y S, Lohse D L, Wang H M, and Loganathan D. Mapping and quantification of the major oligosaccharide components of heparin. *Biochem J.* 1988 Sep 15;254(3):781-7. doi: 10.1042/bj2540781. PMID: 3196292; PMCID: PMC1135151.
- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO and Stiles JK. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011 Jun;22(3):121-30. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.06.001. Epub 2011 Jul 29. PMID: 21802343; PMCID: PMC3203691.
- Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E. PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Res Treat.* 2003 May;79(1):63-74. doi: 10.1023/a:1023366117157. PMID: 12779083.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
- Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Aug 15;93(16):1215-23. doi: 10.1093/jnci/93.16.1215. PMID: 11504767.
- Lories V, Cassiman JJ, Van der Berghe H and David G. (1992). Differential expression of cell surface heparan sulfate proteoglycans in human mammary epithelial cells and lung fibroblasts. *J Biol Chem.* 1992 Jan 15;267(2):1116-22. PMID: 1339431.
- Luboshits G, Shina S, Kaplan O, Engelberg S, Nass D, Lifshitz-Mercer B, Chaitchik S, Keydar I, Ben-Baruch A. Elevated expression of the CC chemokine regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) in advanced breast carcinoma. *Cancer Res.* 1999 Sep 15;59(18):4681-7. PMID: 10493525.
- Ludwig RJ, Boehme B, Podda M, Henschler R, Jager E, Tandl C, Boehncke WH, Zollner TM, Kaufmann R, Gille J. Endothelial P-selectin as a target of heparinaction in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res.* 2004 Apr 15;64(8):2743-50. doi: 10.1158/0008-5472.can-03-1054. PMID: 15087389.

- Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature*. 1985 Jun 20-26;315(6021):672-6. doi: 10.1038/315672a0. PMID: 3925348.
- Luster AD, Ravetch JV: Biochemical characterization of a gamma interferon inducible cytokine (IP 10). *J Exp Med*. 1987 Oct 1;166(4):1084-97. doi: 10.1084/jem.166.4.1084. PMID: 2443596; PMCID: PMC2188708.
- Lyman GH, Khorana AA, Falanga A, Clarke-Pearson D, Flowers C, Jahanzeb M, Kakkar A, Kuderer NM, Levine MN, Liebman H, Mendelson D, Raskob G, Somerfield MR, Thodiyil P, Trent D, Francis CW; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology guideline: recommendations for venous thromboembolism prophylaxis and treatment in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Dec 1;25(34):5490-505. doi: 10.1200/JCO.2007.14.1283. Epub 2007 Oct 29. PMID: 17968019.
- Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, Bronson RT, Springer TA. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 4;95(16):9448-53. doi: 10.1073/pnas.95.16.9448. PMID: 9689100; PMCID: PMC21358.
- Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. Oral contraceptives and the risk of breast cancer. 2002. *N Engl J Med*. 2002 Jun 27;346(26):2025-32. doi: 10.1056/NEJMoa013202. PMID: 12087137.
- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of Epidermal Growth Factor Receptor in Breast Cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Nov;136(2):331-45. doi: 10.1007/s10549-012-2289-9. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23073759; PMCID: PMC3832208.
- Matsumoto K, Nakamura T. Emerging multipotent aspects of hepatocyte growth factor. *J Biochem*. 1996 Apr;119(4):591-600. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021283. PMID: 8743556.

- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ*. 2000 Sep 9;321(7261):624-8. doi: 10.1136/bmj.321.7261.624. PMID: 10977847; PMCID: PMC1118507.
- Melillo RM, Castellone MD, Guarino V, De Falco V, Cirafici AM, Salvatore G, Caiazzo F, Basolo F, Giannini R, Kruhoffer M, Orntoft T, Fusco A, Santoro M. RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1;126(4):1603. doi: 10.1172/JCI87345. Epub 2016 Apr 1. PMID: 27035814; PMCID: PMC4811160.
- Mendelsohn J, Baselga J. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene*. 2000 Dec 27;19(56):6550-65. doi: 10.1038/sj.onc.1204082. PMID: 11426640.
- Miller LJ, Kurtzman SH, Wang Y, Anderson KH, Lindquist RR, Kreutzer DL. Expression of interleukin-8 receptors on tumor cells and vascular endothelial cells in human breast cancer tissue. *Anticancer Res*. 1998 Jan-Feb;18(1A):77-81. PMID: 9568059.
- Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD. Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Dec;8(12):957-69. doi: 10.1038/nrm2289. PMID: 17971838; PMCID: PMC3329926.
- Möller A, Lippert U, Lessmann D, Kolde G, Hamann K, Welker P, Schadendorf D, Rosenbach T, Luger T, Czarnetzki BM. Human mast cells produce IL-8. *J Immunol*. 1993 Sep 15;151(6):3261-6. PMID: 8376778.
- Mukaida N, Harada A, Yasumoto K, Matsushima K. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol Immunol*. 1992;36(8):773-89. doi: 10.1111/j.1348-0421.1992.tb02080.x. PMID: 1474930.
- Murdoch C and Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3032-43. PMID: 10807766.

- Muthuswamy R, Urban J, Lee JJ, Reinhart TA, Bartlett D, Kalinski P. Ability of mature dendritic cells to interact with regulatory T cells is imprinted during maturation. *Cancer Res.* 2008 Jul 15;68(14):5972-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6818. PMID: 18632653; PMCID: PMC2905229.
- Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature.* 2001 Mar 1;410(6824):50-6. doi: 10.1038/35065016. PMID: 11242036.
- Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature.* 1996 Aug 15;382(6592):635-8. doi: 10.1038/382635a0. PMID: 8757135.
- Nakshatri H, Bhat-Nakshatri P, Martin DA, Goulet RJ Jr, Sledge GW Jr. Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth. *Mol Cell Biol.* 1997 Jul;17(7):3629-39. doi: 10.1128/MCB.17.7.3629. PMID: 9199297; PMCID: PMC232215.
- Nastase A, Pâslaru L, Niculescu AM, Ionescu M, Dumitraşcu T, Herlea V, Dima S, Gheorghe C, Lazar V, Popescu I. Prognostic and predictive potential molecular biomarkers in colon cancer. *Chirurgia (Bucur).* 2011 Mar-Apr;106(2):177-85. PMID: 21696062.
- National Breast and Ovarian Cancer Centre (NBOCC). Recommendations for follow-up of women with early breast cancer, Surry Hills. 2010b.
- National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Clinical Practice Guidelines in Oncology: Breast Cancer - Version V.1. 2007.
- National Institute for Clinical Excellence (NICE): Advanced breast cancer: diagnosis and treatment. 2009.

- Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*. 1993 Dec 1;82(11):3253-8. PMID: 7694675.
- Newman B, Mu H, Butler LM, Millikan RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to BRCA1 in a population-based series of American women. *JAMA*. 1998 Mar 25;279(12):915-21. doi: 10.1001/jama.279.12.915. PMID: 9544765.
- New Zealand Guidelines Group: Management of early breast cancer. Wellington: 2009.
- Niers TM, Klerk CP, DiNisio M, Van Noorden CJ, Büller HR, Reitsma PH, Richel DJ. Mechanisms of heparin induced anti-cancer activity in experimental cancer models. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2007 Mar;61(3):195-207. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.007. Epub 2006 Oct 30. PMID: 17074500.
- Normanno N, de Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, Carotenuto A, De Feo G, Caponigro F, Salomon DS. Epidermal growthfactor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006 Jan 17;366(1):2-16. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.018. Epub 2005 Dec 27. PMID: 16377102.
- Nguyen LT, Vogel HJ. Structural perspectives on antimicrobial chemokines. *Front Immunol*. 2012 Dec 28;3:384. doi: 10.3389/fimmu.2012.00384. PMID: 23293636; PMCID: PMC3531597.
- Ohta M, Kitadai Y, Tanaka S, Yoshihara M, Yasui W, Mukaida N, Haruma K, Chayama K. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with macrophage infiltration and tumor vascularity in human gastric carcinomas. *Int J Oncol*. 2003 Apr;22(4):773-8. PMID: 12632067.
- Ono K, Ishihara M, Ishikawa K, Ozeki Y, Deguchi H, Sato M, Hashimoto H, Saito Y, Yura H, Kurita A, Maehara T. Periodate-treated, non-anticoagulant heparin-carrying polystyrene (NAC-HCPS) affects angiogenesis and inhibits subcutaneous induced tumour growth and metastasis to the lung. *Br J Cancer*. 2002 Jun 5;86(11):1803-12. doi: 10.1038/sj.bjc.6600307. PMID: 12087470; PMCID: PMC2375397.

- Organ SL. An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol*. 2011 Nov;3(1 Suppl):S7-S19. doi: 10.1177/1758834011422556. PMID: 22128289; PMCID: PMC3225017.
- Padua D, Massagué J. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Res*. 2009 Jan;19(1):89-102. doi: 10.1038/cr.2008.316. PMID: 19050696.
- Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M. A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med*. 1988 May 1;167(5):1547-59. doi: 10.1084/jem.167.5.1547. PMID: 2835419; PMCID: PMC2188939.
- Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jun 15;167(12):1676-86. doi: 10.1164/rccm.200301-071OC. Epub 2003 Mar 5. PMID: 12626353.
- Phipps RF, Perry PM. Familial breast cancer. *Postgrad Med J*. 1988 Nov;64(757):847-9. doi: 10.1136/pgmj.64.757.847. PMID: 3076666; PMCID: PMC2429045.
- Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):947-52. PMID: 10029089.
- Posselt D. Eisen(diarylsalen)-Komplexe als neuartige Zytostatika: Synthese, pharmakologische und biochemische Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus. Dissertation an der Freien Universität Berlin, Berlin 2006. Seite 50.
- Prandoni P, Lensing AW, Büller HR, Carta M, Cogo A, Vigo M, Casara D, Ruol A, ten Cate JW. Comparison of subcutaneous low-molecular-weight heparin with intravenous standard heparin in proximal deep-vein thrombosis. *Lancet*. 1992 Feb 22;339(8791):441-5. doi: 10.1016/0140-6736(92)91054-c. PMID: 1346817.

- Price JT, Wilson HM, Haites NE. Epidermal growth factor (EGF) increases the in vitro invasion, motility and adhesion interactions of the primary renal carcinoma cell line, A704. *Eur J Cancer*. 1996 Oct;32A(11):1977-82. doi: 10.1016/0959-8049(96)00207-9. PMID: 8943684.
- Pukac LA, Castellot JJ Jr, Wright TC Jr, Caleb BL, Karnovsky MJ. Heparin inhibits c-fos and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Cell Regul*. 1990 Apr;1(5):435-43. doi: 10.1091/mbc.1.5.435. PMID: 2099192; PMCID: PMC361524.
- Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, Jack E, Vesprini DJ, Kuperstein G, Abrahamson JL, Fan I, Wong B, Narod SA. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 2001 Mar;68(3):700-10. doi: 10.1086/318787. Epub 2001 Feb 15. PMID: 11179017; PMCID: PMC1274482.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). *Krebs in Deutschland 2013/2014. Kapitel 3.14: Brustdrüse. Seite 72.11. Ausgabe. Berlin, 2017.* https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2017/krebs_in_deutschland_2017.pdf?__blob=publicationFile (abgerufen am: 11.09.2019)
- Rojas MP, Telaro E, Russo A, Moschetti I, Coe L, Fossati R, Palli D, del Roselli TM, Liberati A. Follow-up strategies for women treated for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005 Jan 25;(1):CD001768. doi: 10.1002/14651858.CD001768.pub2. Update in: *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;(5):CD001768. PMID: 15674884.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997 Aug 1;90(3):909-28. PMID: 9242519.
- Samanta AK, Oppenheim JJ, Matsushima K. Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem*. 1990 Jan 5;265(1):183-9. PMID: 2403554.

- Sanford D, Naidu A, Alizadeh N, Lazo-Langner A. The effect of low molecular weight heparin on survival in cancer patients: an updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *J Thromb Haemost.* 2014 Jul;12(7):1076-85. doi: 10.1111/jth.12595. Epub 2014 Jun 19. PMID: 24796727.
- San-Miguel T, Pinto S, Navarro L, Callaghan RC, Monteagudo C, López-Ginés C, Cerdá-Nicolás M, Gil-Benso R. Expression of the Chemokine Receptors CXCR3, CXCR4, CXCR7 and Their Ligands in Rhabdomyosarcoma. *Pathol Oncol Res.* 2015 Sep;21(4):1191-9. doi: 10.1007/s12253-015-9947-2. Epub 2015 Jun 3. PMID: 26037167.
- Sato K, Kuratsu J, Takeshima H, Yoshimura T, Ushio Y. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in meningioma. *J Neurosurg.* 1995 May;82(5):874-8. doi: 10.3171/jns.1995.82.5.0874. PMID: 7714614.
- Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie. Kapitel 7 Wie wird eine Immunantwort koordiniert?, Kapitel 7.1. Zytokine und Zytokinrezeptoren.* 3. Auflage. ©Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 2011. Seiten 71-74.
- Sciumbata T, Caretto P, Pirovano P, Pozzi P, Cremonesi P, Galimberti G, Leoni F, Marcucci F. Treatment with modified heparins inhibits experimental metastasis formation and leads, in some animals, to long-term survival. *Invasion Metastasis.* 1996;16(3):132-43. PMID: 9186548.
- Schwarz U. Einfluss von Heparin auf die Proliferation, Zytokinsekretion und Invasion humaner endometrialer Karzinomzelllinien. Dissertation an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität. 2014. Seiten 42-77.
- Shen X, Fang J, Lv X, Pei Z, Wang Y, Jiang S, Ding K. Heparin Impairs Angiogenesis through Inhibition of MicroRNA-10b. *J Biol Chem.* 2011 Jul 29;286(30):26616-27. doi: 10.1074/jbc.M111.224212. Epub 2011 Jun 3. PMID: 21642433; PMCID: PMC3143626.

- Shriver Z, Capila I, Venkataraman G, Sasisekharan R. Heparin and heparan sulfate: analyzing structure and microheterogeneity. *Handb Exp Pharmacol.* 2012;(207):159-76. doi: 10.1007/978-3-642-23056-1_8. PMID: 22566225; PMCID: PMC3755452.
- Singh S, Singh A P, Sharma B, Owen L B, Singh Rakesh K. CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. *Future Oncol.* 2010 Jan;6(1):111-6. doi: 10.2217/fon.09.128. PMID: 20021212; PMCID: PMC2822445.
- Smit MJ, Verdijk P, van der Raaij-Helmer EM, Navis M, Hensbergen PJ, Leurs R, Tensen CP. CXCR3- mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi-and phospholipase C-dependent pathway and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood.* 2003 Sep 15;102(6):1959-65. doi: 10.1182/blood-2002-12-3945. Epub 2003 May 15. PMID: 12750173.
- Soria G, Ben-Baruch A. The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. *Cancer Lett.* 2008 Aug 28;267(2):271-85. doi: 10.1016/j.canlet.2008.03.018. Epub 2008 Apr 24. PMID: 18439751.
- Soto AM, Sonnenschein C. Mechanism of estrogen action on cellular proliferation: Evidence for indirect and negative control on cloned breast tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 16;122(3):1097-103. doi: 10.1016/0006-291x(84)91204-x. PMID: 6477550.
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973 Nov;51(5):1409-16. doi: 10.1093/jnci/51.5.1409. PMID: 4357757.
- Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell.* 2004 Nov;6(5):447-58. doi: 10.1016/j.ccr.2004.09.028. PMID: 15542429.

- Specht K, Harbeck N, Smida J, Annecke K, Reich U, Naehrig J, Langer R, Mages J, Busch R, Kruse E, Klein-Hitpass L, Schmitt M, Kiechle M, Hoefler H. Expression profiling identifies genes that predict recurrence of breast cancer after adjuvant CMF-based chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Nov;118(1):45-56. doi: 10.1007/s10549-008-0207-y. Epub 2008 Oct 17. PMID: 18925433.
- Spratte J, Meyer zu Schwabedissen H, Endlich N, Zygmunt M, Fluhr H. Heparin inhibits TNF- α signaling in human endometrial stromal cells by interaction with NF- κ B. *Mol Hum Reprod.* 2013 Apr;19(4):227-36. doi: 10.1093/molehr/gas060. Epub 2012 Dec 4. PMID: 23211566.
- Sproul E. Carcinoma and venous thrombosis: the frequency of association of carcinoma in the body or tail of the pancreas with multiple venous thrombosis. *Am J Cancer* 34, 1938. doi: 10.1158/ajc.1938.566
- Standiford TJ, Kunkel SL, Phan SH, Rollins BJ, Strieter RM. Alveolar macrophage-derived cytokines induce monocyte chemoattractant protein-1 expression from human pulmonary type II-like epithelial cells. *J Biol Chem.* 1991 May 25;266(15):9912-8. PMID: 2033076.
- Stanley MJ, Stanley MW, Sanderson RD, Zera R. Syndecan-1 expression is induced in the stroma of infiltrating breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1999 Sep;112(3):377-83. doi: 10.1093/ajcp/112.3.377. PMID: 10478144.
- Stevenson JL, Varki A, Borsig L. Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects. *Thromb Res.* 2007;120 Suppl 2:S107-11. doi: 10.1016/S0049-3848(07)70138-X. Erratum in: *Thromb Res.* 2008;123(1):187-90. PMID: 18023703.
- Subik K, Lee JF, Baxter L, Strzepek T, Costello D, Crowley P, Xing L, Hung MC, Bonfiglio T, Hicks DG, Tang P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl).* 2010 May 20;4:35-41. Erratum in: *Breast Cancer (Auckl).* 2018 Oct 16;12:1178223418806626. PMID: 20697531; PMCID: PMC2914277.

- Sweeney EE, McDaniel RE, Maximov PY, Fan P, Jordan VC. Models and Mechanisms of Acquired Antihormone Resistance in Breast Cancer: Significant Clinical Progress Despite Limitations. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2012 Feb;9(2):143-163. doi: 10.1515/hmbci-2011-0004. PMID: 23308083; PMCID: PMC3539798.
- Tanaka Y, Adams DH, Shaw S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today.* 1993 Mar;14(3):111-5. doi: 10.1016/0167-5699(93)90209-4. PMID: 8466625.
- Taniguchi T, Toi M, Inada K, Imazawa T, Yamamoto Y, Tominaga T. Serum concentrations of hepatocyte growth factor in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1995 Sep;1(9):1031-4. PMID: 9816076.
- The Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Aug 4;91(15):1310-6. doi: 10.1093/jnci/91.15.1310. PMID: 10433620.
- Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002 Jun;2(6):442-54. doi: 10.1038/nrc822. PMID: 12189386.
- Toi M, Taniguchi T, Ueno T, Asano M, Funata N, Sekiguchi K, Iwanari H, Tominaga T. Significance of circulating hepatocyte growth factor level as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Mar;4(3):659-64. PMID: 9533534.
- Tworek D, Kuna P, Mlynarski W, Gorski P, Pietras T, Antczak A. MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) and I-TAC (CXCL11) concentrations after nasal allergen challenge in patients with allergic rhinitis. *Arch Med Sci.* 2013 Oct 31;9(5):849-53. doi: 10.5114/aoms.2013.37198. Epub 2013 Aug 26. PMID: 24273568; PMCID: PMC3832822.
- Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):3282-9. PMID: 10955814.

- Umekita Y, Ohi Y, Sagara Y and Yoshida H. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor-predicts worse prognosis in breast cancer patients. *Int J Cancer*. 2000 Nov 20;89(6):484-7. doi: 10.1002/1097-0215(20001120)89:6<484::aid-ijc3>3.0.co;2-s. PMID: 11102891.
- Urquidi V, Chang M, Dai Y, Kim J, Wolfson ED, Goodison S, Rosser CJ. IL-8 as a urinary biomarker for the detection of bladder cancer. *BMC Urol*. 2012 May 4;12:12. doi: 10.1186/1471-2490-12-12. PMID: 22559832; PMCID: PMC3404900.
- Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett*. 2008 Aug 28;267(2):226-44. doi: 10.1016/j.canlet.2008.04.050. Epub 2008 Jun 24. PMID: 18579287.
- Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2015 Jun;26(3):311-27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.11.009. Epub 2014 Nov 22. PMID: 25498524.
- Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood*. 2007 Sep 15;110(6):1723-9. doi: 10.1182/blood-2006-10-053736. Epub 2007 May 11. PMID: 17496204; PMCID: PMC1976377.
- Vavlukis M, Kotlar I, Chaparoska E, Antova E, Kedev S. Diffuse Arterial Thrombosis as a First Manifestation of Occult Malignancy. *Case Rep Med*. 2016;2016:1658392. doi: 10.1155/2016/1658392. Epub 2016 Oct 5. PMID: 27799941; PMCID: PMC5069387.
- Velasco-Velazquez M, Pestell RG. The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer. *Oncoimmunology*. 2013 Apr 1;2(4):e23660. doi: 10.4161/onci.23660. PMID: 23734321; PMCID: PMC3654591.
- Veronesi U, Cascinelli N, Mariani L, Greco M, Saccozzi R, Luini A, Aguilar M, Marubini E. Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Oct 17;347(16):1227-32. doi: 10.1056/NEJMoa020989. PMID: 12393819.

- Vlodavsky I, Mohsen M, Lider O, Svahn CM, Ekre HP, Vigoda M, Ishai-Michaeli R, Peretz T. Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Invasion Metastasis*. 1994-1995;14(1-6):290-302. PMID: 7657522.
- von Minckwitz G, Untch M, Nuesch E, Loibl S, Kaufmann M, Kummel S, Fasching PA, Eiermann W, Blohmer JU, Costa SD, Mehta K, Hilfrich J, Jackisch C, Gerber B, du Bois A, Huober J, Hanusch C, Konecny G, Fett W, Stickeler E, Harbeck N, Muller V, Juni P. Impact of treatment characteristics on response of different breast cancer phenotypes: pooled analysis of the German neo-adjuvant chemotherapy trials. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jan;125(1):145-56. doi: 10.1007/s10549-010-1228-x. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21042932.
- Voogd AC, Nielsen M, Peterse JL, Blichert-Toft M, Bartelink H, Overgaard M, van Tienhoven G, Andersen KW, Sylvester RJ, van Dongen JA. Danish Breast Cancer Cooperative Group. Breast Cancer Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. Differences in risk factors for local and distant recurrence after breast-conserving therapy or mastectomy for stage I and II breast cancer: pooled results of two large European randomized trials. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1688-97. doi: 10.1200/JCO.2001.19.6.1688. Erratum in: *J Clin Oncol* 2001 May 1;19(9):2583. PMID: 11250998.
- Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 1;90(15):7158-62. doi: 10.1073/pnas.90.15.7158. PMID: 8346230; PMCID: PMC47095.
- Weinberger V, Zikán M. Karcinom prsu - specifika gynekologické péče a poradenství [Breast Cancer - Specifics of Gynecological Care and Counseling]. *Klin Onkol*. 2016 Fall;29 Suppl 3:S7-15. Czech. doi: 10.14735/amko20163S7. PMID: 28118719.
- Weinstein IB, Joe AK. Mechanisms of disease: Oncogene addiction – a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 Aug;3(8):448-57. doi: 10.1038/ncponc0558. PMID: 16894390.

- Weitzel JN, Lagos V, Blazer KR, Nelson R, Ricker C, Herzog J, McGuire C, Neuhausen S. Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Jul;14(7):1666-71. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0072. PMID: 16030099.
- Wieduwilt MJ, Moasser MM. The epidermal growth factor receptor family: biology driving targeted therapeutics. *Cell Mol Life Sci.* 2008 May;65(10):1566-84. doi: 10.1007/s00018-008-7440-8. PMID: 18259690; PMCID: PMC3060045.
- Wittekind C. TNM Klassifikation maligner Tumoren, 8. Auflage, Seiten 7-10. 2017. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Wu WK, Shin VY, Ye YN, Wong HP, Huang FY, Hui MK, Lam EK, Cho CH. Heparin increases human gastric carcinoma cell growth. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1A):439-43. PMID: 16475731.
- Xia Y, Frangogiannis NG. MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007 Jun;6(2):101-7. doi: 10.2174/187152807780832265. PMID: 17692033.
- Yamashita Y, Nakagomi K, Takeda T, Hasegawa S, Mitsui Y. Effect of heparin on pulmonary fibroblasts and vascular cells. *Thorax.* 1992 Aug;47(8):634-9. doi: 10.1136/thx.47.8.634. PMID: 1412122; PMCID: PMC463927.
- Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T, Shin S. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7):1630-3. PMID: 8137271.
- Yao Y, Jin L, Fuchs A, Joseph A, Hastings HM, Goldberg ID, Rosen EM. Scatter factor protein levels in human breast cancers: clinicopathological and biological correlations. *Am J Pathol.* 1996 Nov;149(5):1707-17. PMID: 8909259; PMCID: PMC1865271.

- Yoshitomi Y, Nakanishi H, Kusano Y, Munesue S, Oguri K, Tatematsu M, Yamashina I, Okayama M. Inhibition of experimental lung metastases of Lewis lung carcinoma cells by chemically modified heparin with reduced anticoagulant activity. *Cancer Lett.* 2004 Apr 30;207(2):165-74. doi: 10.1016/j.canlet.2003.11.037. PMID: 15072825.
- Yuan A, Chen JJ, Yao PL, Yang PC. The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction. *Front Biosci.* 2005 Jan 1;10:853-65. doi: 10.2741/1579. PMID: 15569594.
- Yun HJ, Jo DY. Production of stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and expression of CXCR4 in human bone marrow endothelial cells. *J Korean Med Sci.* 2003 Oct;18(5):679-85. doi: 10.3346/jkms.2003.18.5.679. PMID: 14555820; PMCID: PMC3055109.
- Zarogoulidis P, Katsikogianni F, Tsiouda T, Sakkas A, Katsikogiannis N, Zarogoulidis K. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer. *Cancer Invest.* 2014 Jun;32(5):197-205. doi: 10.3109/07357907.2014.898156. Epub 2014 Mar 26. PMID: 24669909.
- Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007 Spring;45(2):27-37. doi: 10.1097/AIA.0b013e318034194e. PMID: 17426506; PMCID: PMC2785020.
- Zhang N, Lou W, Ji F, Qiu L, Tsang BK, Di W. Low molecular weight heparin and cancer survival: clinical trials and experimental mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016 Aug;142(8):1807-16. doi: 10.1007/s00432-016-2131-6. Epub 2016 Feb 24. PMID: 26912316.
- Zhang W, Chen H. The study on the interleukin-8 (IL-8). *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 2002 Dec;19(4):697-702. Chinese. PMID: 12561382.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Danksagung

Mein Dank richtet sich an erster Stelle an Prof. Herrn Dr. med. Marek Zygmunt, ohne dessen Unterstützung und Vertrauen in seine Doktoranden ein so umfangreiches Forschen niemals möglich gewesen wäre. Vielen Dank!

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei Prof. Dr. med. Herbert Fluhr, welcher durch seine Ideen das Thema dieser Dissertation entwickelte und durch seinen Forschungsdrang unserer Arbeitsgruppe stets ein Vorbild war.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. rer. nat. Daniela Brünnert, die mich immer motiviert und neue Ideen zur Verbesserung der Arbeit hatte, mich unermüdlich auf Fehler aufmerksam gemacht hat und – egal wo sie sich gerade örtlich befunden hat, immer ein offenes Ohr und E-Mail-Postfach für mich hatte. Ohne dich wäre diese Arbeit absolut nicht möglich gewesen und ich kann dir nicht genug dafür danken!

Das Laborleben wäre ohne die zwei besten Laborassistenten der Welt nicht dasselbe gewesen! Stephanie Heidrich und Jens Ehrhardt – ihr wusstet immer, was bei Pipettierfehlern, falscher Zentrifugation oder schlechter Laune zu tun ist. Ihr seid einfach unersetzlich! Und ich bin froh, dass ihr mich so herzlich in eure Laborwelt aufgenommen habt, als wäre ich immer schon da gewesen!

Meinen Freunden und ehemaligen Kollegen Dr. med. Patrick Würfel, Dr. med. Sascha Brückmann, Johannes Holm und Dr. med. Artur Gontarewicz danke ich für die kreativen Diskussionen rund um diese Arbeit, das Anregen neuer Gedankenexperimente und einfach dafür, dass sie mir beim Schreiben so oft über die Schulter geblickt und mich immer wieder aufs Neue motiviert haben.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Familie. Meinem Bruder Dirk danke ich dafür, dass er sich immer wieder Zeit genommen hat, diese Arbeit zu lesen, obwohl er stets selbst in seinen eigenen Projekten fest eingebunden war. Ohne meine Eltern wären mein Studium und auch die Arbeit an dieser Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Ihr wart und seit immer für mich da, zusammen haben wir so manches Tief während dem Studium, im Arbeitsleben oder bei Schreibblockaden bei der Doktorarbeit besiegt. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt! Ich habe euch lieb!

Meinem Lebensgefährten Maximilian Geiger danke ich vor allem dafür, dass er immer an meiner Seite ist und mich in jeder Lebenslage sowohl während des Studiums und auch danach unterstützt hat und dies auch weiterhin tut. Ohne sein ständiges Nachfragen, „ob die Doktorarbeit nun endlich fertig sei“, würde ich wahrscheinlich immer noch daran schreiben. Du bist das Beste, was mir je passiert ist!