

Aus dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Etablierung eines zellbasierten Reporter-Modells  
zur Untersuchung regulatorischer Mechanismen der  
Genexpression von Prothrombin

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Lina Katharina Schott  
aus Köln

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 07. Dezember 2021

## **Danksagung**

## **Erklärung**

Ich, Lina Katharina Schott, erkläre, dass ich die experimentelle Arbeit in der vorgelegten Dissertation im Labor von Prof. Dr. Sven Danckwardt im Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz selbstständig durchgeführt habe. Die schriftliche Arbeit habe ich ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Grundordnung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz § 39 - Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in Forschung und Lehre gemäß § 4 Abs.2 HochSchG an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz“ niedergelegt sind, eingehalten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Thrombin in Hämostase und Fibrinolyse .....	1
1.1.1 Primäre Hämostase .....	1
1.1.2 Sekundäre Hämostase (Gerinnungskaskade).....	2
1.1.3 Fibrinolyse .....	4
1.1.4 Mechanismen zur Regulation der Hämostase.....	4
1.2 Weitere Funktionen des Thrombins .....	5
1.2.1 Thrombin in Immunologie und Inflammation.....	7
1.2.2 Thrombin in der Tumorbilogie.....	7
1.3 Die Serinprotease Thrombin .....	8
1.3.1 Schematischer Aufbau.....	8
1.3.2 Vitamin K-abhängige $\gamma$ -Carboxylierung .....	9
1.3.3 Thrombingenerierung .....	10
1.3.4 Strukturgebundene Substratspezifität.....	11
1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs).....	12
1.4.1 Aufbau der PARs .....	12
1.4.2 Mechanismus der PAR-Aktivierung und Signalterminierung .....	13
1.4.3 Komplexität und Einflussfaktoren der PAR-Signalgebung.....	14
1.5 Das Prothrombin Gen .....	14
1.6 Pathologien mit Dysregulation der Prothrombin Genexpression .....	15
1.6.1 Prothrombindefizit-Erkrankungen .....	15
1.6.2 Hyper-Prothrombinämien.....	16
1.7 Ziel .....	16
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Puffer und Lösungen.....	18
2.2 Reagenzien.....	18
2.3 Primer .....	19
2.4 Geräte und Software.....	20
2.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	21
2.5.1 Proteinisolation und -konzentrationsmessung .....	21
2.5.2 RNA-Isolation.....	22
2.5.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese).....	23
2.5.4 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR).....	23
2.6 Luciferase Assay.....	24
2.6.1 Firefly Luciferase Assay.....	24
2.6.2 Renilla Luciferase Assay .....	24

2.7	IVIS Spectrum Instrument.....	24
2.8	Tier- und Zellkulturmodelle .....	25
2.8.1	Mauslinien.....	25
2.8.2	Zellkulturen .....	26
2.8.3	Pelletieren und Einfrieren von Zellkulturen .....	26
2.8.4	Primäre Hepatozytenkultur .....	27
2.9	Aufbau und Versuchsdurchführung .....	28
2.9.1	Verdünnungsreihen .....	28
2.9.2	Co-Kulturen der Hepatozyten mit HeLas bzw. MEFs .....	28
2.9.3	Methoden- und Modelloptimierung .....	29
2.9.4	Compound Screening .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1	Etablierung der Zellkulturen und Evaluierung des Luciferase Assays.....	31
3.2	Analyse möglicher Regulationsmechanismen der F2 Expression.....	35
3.2.1	Verschiedene Inkubations- und Zellkulturbedingungen.....	36
3.2.2	Korrelation der Expression und Konzentration im Medium.....	37
3.2.3	Einstellung konstanter Prothrombinspiegel im Medium.....	38
3.2.4	Co-Kultivierung mit nicht-hepatozytären Zellen.....	40
3.3	Evaluierung potentieller Stimulanzen auf die F2 Genexpression .....	41
3.3.1	Weiterentwicklung des Zellkulturmodells.....	42
3.3.2	Einfluss des Thrombins auf die F2 Genexpression .....	43
3.3.3	Einfluss weiterer Substanzen auf die Genexpression .....	45
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>46</b>
4.1	Regulationsmechanismen der F2 Genexpression .....	46
4.2	Regulationsmechanismen auf Umgebungsbedingungen .....	47
4.3	Modell eines autoregulatorischen Feedback-Mechanismus .....	50
4.4	Limitation des Zellkulturmodells.....	53
4.5	Ausblick.....	53
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>76</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Gerinnungskaskade .....	3
Abbildung 2: Aktivitäten des Thrombins in der Hämostase.....	5
Abbildung 3: Funktionen des Thrombins in Physiologie und Pathophysiologie .....	6
Abbildung 4: Schematische Repräsentation von Prothrombin .....	9
Abbildung 5: Vitamin K-abhängige $\gamma$ -Carboxylierung .....	10
Abbildung 6: Prothrombin Aktivierung .....	11
Abbildung 7: Struktur des Thrombins .....	12
Abbildung 8: Mechanismen der Signaltransduktion über PAR-Rezeptoren.....	13
Abbildung 9: Aufbau des humanen Prothrombin-Gens.....	15
Abbildung 10: Schematische Darstellung des D-Insight Mausmodells .....	26
Abbildung 11: Isolierung der Hepatozyten und Etablierung der Zellkultivierung .....	32
Abbildung 12: Validierung der Funktionalität des D-Insight-Zellkultursystems .....	34
Abbildung 13: Detektion der F2 Expression und Prothrombin Sekretion .....	35
Abbildung 14: F2 Expression unter variierenden Zellkulturbedingungen.....	37
Abbildung 15: Korrelation der Prothrombinspiegel im Kulturmedium mit der F2 Expression.	38
Abbildung 16: Konstante Prothrombinspiegel im Kulturmedium über die Zeit .....	39
Abbildung 17: Co-Kultivierungen mit MEF und HeLa induzieren die F2 Expression .....	41
Abbildung 18: Optimierung des Hepatozytenmodells für das Compound Screening .....	43
Abbildung 19: Thrombin führt zur Induktion der F2 Genexpression.....	44
Abbildung 20: Einfluss weiter Substanzen auf die F2 Genexpression .....	45
Abbildung 21: Modell potentieller Regulationsfaktoren auf die F2 Genexpression .....	46
Abbildung 22: Induktion der F2 Genexpression durch p38 MAPK Aktivierung .....	49
Abbildung 23: Modell eines autoregulatorischen Feedbackmechanismus .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Aktiviertes Protein C
cDNA	komplementäre DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DTR	Diphtherie Toxin-Rezeptor
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F2	Prothrombin-Gen
FII	Prothrombin
FIIa	Thrombin
FIII	Tissue Factor
FIV	Faktor IV
FLuc	Firefly luciferase
FLuc2CP	Firefly Luciferase
FV	Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FX	Faktor X
FXI	Faktor XI
GAG	Glucosaminoglykane
GGCX	Gamma-Glutamylcarboxylase
Gla	Gamma-Carboxyglutamatreste
Glu	Glutamatreste
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCII	Heparin-Cofaktor II
iRFP	Infrarot Fluoreszenzprotein
k	Tausend
KH <sub>2</sub>	Reduzierte Form des Vitamin K
KO	Vitamin K-2,3-Epoxid
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEF	murine embryonische Fibroblasten
mRNA	messengerRNA
nt	Nukleotide



O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PAI-2	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 2
PARs	Protease aktivierte-Rezeptoren
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PTI	Proteintransport-Inhibitoren
qRT-PCRs	Real Time Quantitative PCR
RLU	Relative Lichteinheiten
RLuc	Renilla Luciferase
RLuc8.6	Renilla Luciferase
Suppl.	Supplements
TM	Thrombomodulin
tPA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator
TR	Transferrinrezeptor
uPA	Urokinase-Plasminogen-Aktivator
UTR	Untranslatierte Region
VKA	Vitamin K-Antagonist
VKAs	Vitamin K-Antagonisten
VKOR	Vitamin K-Epoxidreduktase, Vitamin K-Epoxidreduktase
VKR	Vitamin K-Reduktase
vWF	von-Willebrand-Faktor
β-TG	Beta-Thromboglobuline

## 1 Einleitung

### 1.1 Thrombin in Hämostase und Fibrinolyse

Eine lokale und schnell einsetzende Blutgerinnung war im Laufe der Entwicklungsgeschichte bei Verletzung des Gefäßsystems vieler Spezies überlebensnotwendig (1). Evolutionär entstand das Blutgerinnungssystem aus Mechanismen des Komplementsystems als Teil des Immunsystems, das ebenfalls eng mit dem Ablauf enzymatischer Kaskaden assoziiert ist (2, 3). Die für die Hämostase maßgebend wichtigen Proteine Prothrombin (FII) und Fibrinogen existierten vermutlich bereits vor ca. 430 Mio. Jahren. Im weiteren evolutionären Verlauf entwickelte sich das Blutgerinnungssystem zu einem komplexen und effizienten Mechanismus gegen Blutverlust (2, 4, 5). Das heute etablierte Modell der Blutgerinnung wurde erstmals 1964 als Wasserfall-/Kaskadenmodell beschrieben (6, 7), welches später unter Ergänzung zellbasierter Faktoren und weiterer Modifikationen erweitert wurde (8, 9).

Klassischerweise werden drei Phasen unterschieden: die primäre, die sekundäre und die tertiäre Hämostase (letztere wird auch als Fibrinolyse bezeichnet) (10). Die primäre Hämostase umfasst den zellbasierten Teil der Gerinnung und kann in die Thrombozytenadhäsion sowie in die Thrombozytenaggregation unterteilt werden (1, 11). Auch die Vasokonstriktion spielt an Gefäßen eine Rolle. Es erfolgt eine initiale Blutstillung, wobei sich mehrere Thrombozyten (Blutplättchen) zusammenlagern und die Verletzung gegen weiteren Blutverlust abdichten. Dabei entsteht zunächst ein weißer Thrombus (5, 11). Die sekundäre Hämostase erfolgt durch Aktivierung eines Netzwerkes verschiedener Gerinnungsfaktoren mit umfangreichen prokoagulatorischen Interaktionen und führt letztlich zur Entstehung eines Fibrinnetzes, in das sich Erythrozyten unter Entstehung eines roten Thrombus einlagern (10, 12). Die Fibrinolyse führt als dritter Teil der Hämostase zu einer Auflösung des Fibrins (10, 13). Neuere Erkenntnisse weisen allerdings darauf hin, dass ein komplexeres Zusammenspiel zwischen Komponenten der Gefäßwand, den Thrombozyten, den Erythrozyten, den Gerinnungsfaktoren sowie auch dem Immunsystem und der Fibrinolyse vorliegt, welches diese strikte Unterteilung der primären, sekundären und tertiären Hämostase zunehmend infrage stellt (1, 8, 14, 15).

Unter physiologischen Umständen herrscht ein Gleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen, sodass es weder zur Blutungsneigung noch zur Thrombusbildung kommt. Diese Balance wird durch ein komplexes Zusammenspiel zwischen Plättchen, dem vaskulären Endothel, der Gerinnungskaskade und dem fibrinolytischen System aufrechterhalten (16). In Kapitel 1.6 wird zudem auf die Rolle einer adäquaten Expression des Prothrombin-Gens (F2) als Basis zur Erhaltung dieses Equilibriums eingegangen.

#### 1.1.1 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase dient der initialen Blutstillung bei Verletzung der Gefäßintegrität. Hier repräsentieren Thrombozyten (weiße Blutplättchen) den Hauptakteur (11). Thrombozyten sind 2–3 µm große, kernlose, diskoide Zellen, die durch Abspaltung aus kernhaltigen Zellen des Knochenmarks, den 30–100 µm großen Megakaryozyten, entstehen. Sie enthalten zahlreiche Organellen mit prokoagulatorischen Substanzen: darunter Fibrinogen, Thrombospondin, Faktor V (FV) von-Willebrand-Faktor (vWF), Beta-Thromboglobuline (β-TG) und Faktor IV (FIV) sowie ADP, Serotonin und Ca<sup>2+</sup> (17).

Bei Verletzung eines Blutgefäßes kommt es durch die Freilegung subendothelialer Kollagenfasern und anderer subintimaler Makromoleküle zunächst zu einer transienten Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand (Thrombozytenadhäsion) (5, 11). Diese

## Einleitung

initiale Anheftung ist abhängig vom überwiegend endothelialen von-Willebrand-Faktor (vWF), der auch als „Damage Sensor“ bezeichnet wird (18). Mithilfe des vWF kommt es zu einer starken Interaktion der oberflächlichen Glykoproteine der Thrombozyten mit den freigelegten Kollagenfasern (19). Diese Interaktion führt zu einer Bindung von Fibrinogen auf der Thrombozytenmembran (20, 21). Alternativ können verschiedene Oberflächenproteine auch direkt mit Kollagen bzw. weiteren Bestandteilen der subendothelialen Matrix, wie Vitronektin oder Laminin interagieren. Durch diese Rezeptor-Ligand-Interaktionen werden intrazelluläre Signalkaskaden über die Aktivierung thrombozytärer Integrine initiiert, die ihrerseits zur Thrombozytenaktivierung führen (22, 23). Nachfolgend kommt es zu einer Formveränderung der Thrombozyten mit der Ausbildung von Pseudopodien zur Erleichterung der Aggregation. Zudem erfolgt die Freisetzung der gerinnungsfördernden Mediatoren aus den Granula der Thrombozyten (24). Dies verstärkt die Rekrutierung, Aggregation und Aktivierung weiterer Thrombozyten im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus. Daneben findet die Exposition negativ geladener Phosphatidylserine, die für die Initiierung der sekundären Hämostase notwendig sind, auf der Thrombozytenoberfläche statt (5, 11). Durch die sekundäre Hämostase mit der Entstehung quervernetzten Fibrins kann der so entstandene primäre Wundverschluss konsolidiert werden (17).

### 1.1.2 Sekundäre Hämostase (Gerinnungskaskade)

Die sekundäre Hämostase wird durch die zellbasierten Mechanismen der primären Hämostase eingeleitet. Sie wird auch plasmatische Gerinnung genannt und kann in eine Initiierungsphase, eine Amplifikationsphase und eine Propagationsphase eingeteilt werden (25). Im Allgemeinen liegen die löslichen Gerinnungsfaktoren zunächst in einer inaktiven Form (Precursor) im Blut vor. Das grundlegende Prinzip liegt in einer „Schritt-für-Schritt“-artigen Konversion und damit Aktivierung der Faktoren durch limitierte Proteolyse (8). Dieser Teil der Gerinnung, der auch Kaskadenmodell genannt wird, umfasst sowohl den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg, die beide letztlich in eine gemeinsame Endstrecke mit der Generierung von Thrombin (FIIa) münden. Thrombin wird in diesem Prozess als Schlüsselenzym rasch am Ort der Gefäßverletzung gebildet und katalysiert die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, welches letztlich unter Einbeziehung weiterer Faktoren (s.u.) zur stabilen Gerinnung des Blutes führt (siehe Abbildung 1).

Der extrinsische Weg wird als der biologisch relevante Prozess zur Initiierung der sekundären Hämostase angesehen (Initiierungsphase). Durch Gefäßverletzung kommt es zur Exponierung des membrangebundenen und normalerweise nur extravaskulär vorliegenden Rezeptorproteins Tissue Factor (FIII), welches unter physiologischen Umständen inaktiv vorliegt und entweder durch Kompartimentalisierung gespeichert oder durch Regulationsprozesse bei Bedarf vermehrt exprimiert wird (26-28). Als Kofaktor von Faktor VII (FVII) fördert Tissue Factor die Proteolyse und Aktivierung von FVII zu FVIIa (29). Factor VIIa, ebenfalls eine Proteinase, bindet an den bei Gefäßverletzung exponierten Tissue Factor, wodurch proteolytisch der Gerinnungsfaktor X (FX) zu FXa aktiviert wird (25). Nachfolgend bildet sich aus FXa und FVa der Prothrombinase-Komplex, der den Beginn der gemeinsamen Endstrecke des extrinsischen und intrinsischen Weges repräsentiert und Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) konvertiert (25).

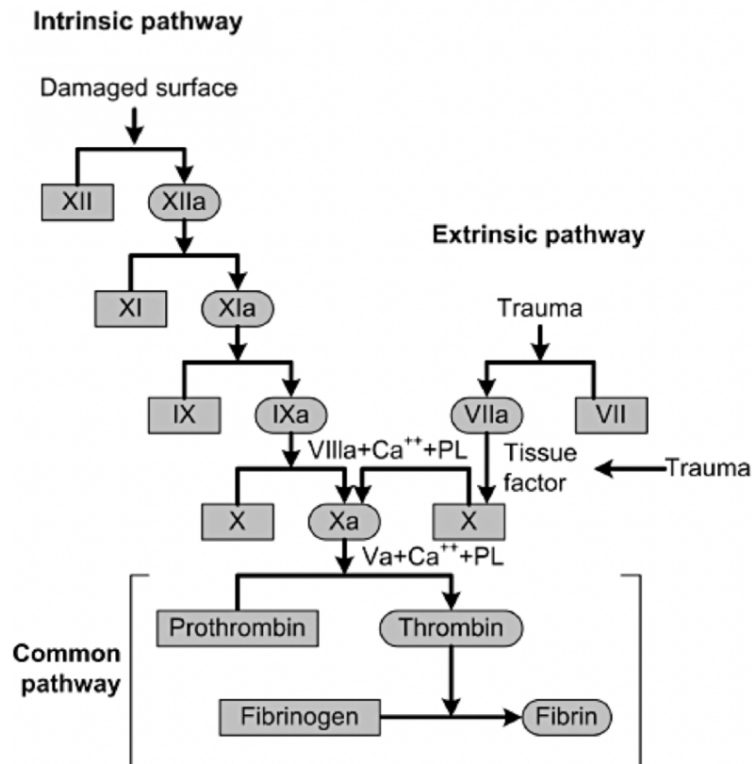
Im intrinsischen Weg konvertiert FXIa den Gerinnungsfaktor IX zu FIXa, welches sodann mit FVIII assoziiert. Es entsteht der Tenase-Komplex (30). Dieser aktiviert FX zu FXa, sodass mit FVa dieser Weg ebenfalls im Rahmen der gemeinsamen Endstrecke zum Prothrombinase-Komplex führt, der aus Prothrombin Thrombin generiert (1, 25). Der Prothrombinase-Komplex setzt sich neben FV und FX auch aus Ca<sup>2+</sup> und negativ geladenen Phospholipiden zusammen, die von Thrombozyten zur Verfügung gestellt werden (31). Thrombin induziert am Ende der Gerinnungskaskade einerseits weiter die Aggregation von Thrombozyten im

## Einleitung

Rahmen eines verstärkenden Effekts und überführt andererseits Fibrinogen in Fibrinmonomere (32).

Das entstandene Thrombin führt zunächst zur Aktivierung mehrerer Gerinnungsfaktoren mit unterschiedlichen Auswirkungen unter Einbeziehung eines verstärkenden Effekts des intrinsischen Wegs, der die Faktoren XII, XI, IX und VIII umfasst. Erstens führt Thrombin durch proteolytische Aktivierung weiterer Mengen FVa zusammen mit FXa über den Prothrombinase-Komplex zu einer vermehrten Thrombinaktivierung (Amplifikationsphase). Zweitens aktiviert es den Faktor XI (FXI) zu FXIa und initiiert dadurch den Beginn der intrinsischen Gerinnungskaskade. Drittens wird Faktor VIII (FVIII) durch Thrombin zu FVIIIa aktiviert, der als Kofaktor von Faktor IX an der Generierung von FXa beteiligt ist. Daneben kann Thrombin autokatalytisch zur Verstärkung dieses Mechanismus seine eigene Aktivierung bewirken (32).

Fibrinogen ist in der gemeinsamen Endstrecke beider oben genannten Wege das Hauptziel des Thrombins für die Generierung eines Thrombus. Es handelt sich um ein lösliches 340 kDa schweres Protein, das aus zwei Anteilen je drei unterschiedlicher Disulfidbrücken-verknüpfter Polypeptidketten ( $A\alpha$ ,  $B\beta$ , und  $\gamma$ ) besteht. Erreicht die lokale Plasmakonzentration von Thrombin eine Höhe von 5-10 nM beginnt die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin (33). Fibrinmonomere entstehen durch die Abspaltung der N-terminalen Fibrinopeptide A und B durch Thrombin und bestehen aus den Domänen D-E-D. Sie lagern sich aufgrund ihrer linearen Struktur durch laterale Aggregation als Protofibrillen zusammen, wobei sich die E-Domäne eines Homodimers an die D-Domäne eines weiteren Fibrinmonomers anheftet (34, 35). Letztlich werden diese Fibrillen mithilfe des FXIIIa durch kovalente Verbindungen quervernetzt, sodass ein stabiler Thrombus entsteht (36-38).



**Abbildung 1: Die Gerinnungskaskade**

Der intrinsische und der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade führen letztlich beide in die gemeinsame Endstrecke („Common Pathway“) und hier zur Aktivierung Thrombins, das anschließend Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Modifiziert nach Adams et al. (39).

### 1.1.3 Fibrinolyse

Die Grundlagen der Fibrinolyse sollen hier kurz erläutert werden, da sie für das Verständnis einiger Regulationsmechanismen des hämostatischen Systems von Bedeutung sind.

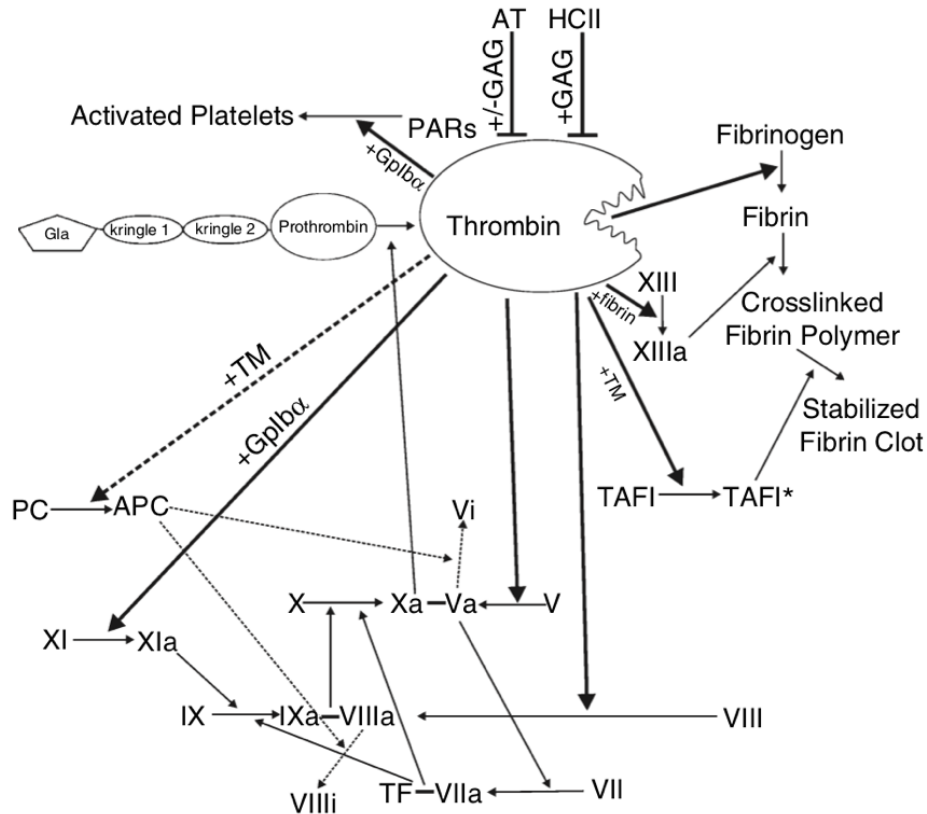
Das fibrinolytische System ist für die Auflösung des Thrombus nach abgeschlossener Wundheilung und die Restitution der vaskulären Integrität verantwortlich und führt zur Wiederherstellung eines kontinuierlichen Blutflusses innerhalb eines Gefäßes. Lange wurden die primäre, sekundäre und tertiäre Hämostase als voneinander unabhängige Prozesse angesehen, die in einer zeitlichen Abfolge hintereinander abliefen. Heute wird zunehmend verstanden, dass diese Komponenten mit ihren zahlreichen ineinander greifenden Mechanismen auch parallel ablaufen können (15). Das fibrinolytische System wird auch als das "Plasminogen-Plasmin"-System bezeichnet. Hier spielen die Plasminogenaktivatoren (Urokinase-Plasminogen-Aktivator [uPA] und Gewebe-Plasminogen-Aktivator [tPA]) eine Rolle, die das inaktive Proenzym Plasminogen zu Plasmin aktivieren. Plasmin degradiert daraufhin das vernetzte Fibrin aus dem Thrombus, welches zu einem Abbau des Thrombus führt. Reguliert wird die Plasminogenaktivierung unter anderem durch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren PAI-1 und PAI-2 sowie durch den Plasmininhibitor  $\alpha_2$ -Antiplasmin (40).

### 1.1.4 Mechanismen zur Regulation der Hämostase

Im Rahmen der Gerinnung ist Thrombin durch verschiedene Kofaktoren fähig, den hämostatischen Zustand sowohl durch prokoagulatorische als auch durch antikoagulatorische Mechanismen zu modulieren. Zur Verstärkung des prokoagulatorischen Effektes verhindert Thrombin die Fibrinolyse durch die Aktivierung des Thrombin-aktivierbaren-Fibrinolyse-Inhibitors (TAFI). Dieser inhibiert die Plasminogen-Aktivierung durch Fibrin (41, 42). Die katalytische Aktivierung von TAFI durch Thrombin erfolgt in einem Komplex mit dem Kofaktor Thrombomodulin (TM), einem membranständigen Rezeptor der Endotheloberflächen (42). Mit Thrombomodulin als Kofaktor ist Thrombin zudem in der Lage, Urokinase (ein physiologisches Fibrinolytikum) zu inaktivieren und so ebenfalls die Fibrinolyse verzögern (43).

Allerdings kann Thrombin zur Verhinderung einer überschießenden Gerinnung auch antikoagulatorische Wirkungen ausüben. Die Aktivierung der Serinprotease Protein C zu aktiviertem Protein C (APC) mithilfe des Kofaktors Thrombomodulin (siehe Abbildung 2) führt zu einer Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren FVIIIa sowie vor allem FVa (44). Ein Kofaktor des Protein C ist das Protein S, das die Inaktivierung von FVa beschleunigt (45). Auf diese Weise wird die fortschreitende Gerinnungsaktivierung gehemmt. Letztlich wird zur Gerinnungshemmung Thrombin selbst inaktiviert. Dies geschieht durch die irreversible Hemmung der proteolytischen Bindungsstelle des Enzyms durch den Serinprotease-Inhibitor Antithrombin III (AT) zusammen mit Glucosaminoglykanen (GAG), wie Heparinen und Heparin-Kofaktor II (HCII) (46-48), sowie durch  $\alpha_2$ -Makroglobulin (49) (siehe Abbildung 2). Daneben sorgen Endothelzellen, die das Innere der Blutgefäße auskleiden, unter physiologischen Umständen stets für eine antithrombotische Umgebung, indem sie Thrombomodulin, Prostazykline und Stickstoffmonoxid abgeben (50).

## Einleitung



**Abbildung 2: Aktivitäten des Thrombins in der Hämostase**

Thrombin entsteht mittels proteolytischer Aktivierung aus seinem Zymogen Prothrombin durch den Prothrombinasekomplex, bestehend aus FVa und FXa sowie negativ geladenen Oberflächen. Aktiviertes Thrombin führt zur proteolytischen Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin, welches letztlich mithilfe von FXIII zu einem stabilen Thrombus führt. Zudem kommt es zu einer Aktivierung von Thrombozyten über PAR-Rezeptoren sowie im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus zur forcierten Aktivierung von FV, VIII und XI sowie FXIII. Auch TAFI und PC werden TM-abhängig aktiviert. Während TAFI die Fibrinolyse inhibiert, kommt es bei der Aktivierung von PC zu antikoagulatorischen Effekten, indem das APC FV und FVIII inaktiviert. Thrombin selbst wird letztlich durch Antithrombin III (AT) und Heparin Kofaktor II (HCII) inhibiert und Glucosaminoglykan (GAG)-abhängig entfernt. Abbildung nach Huntington et al. (51).

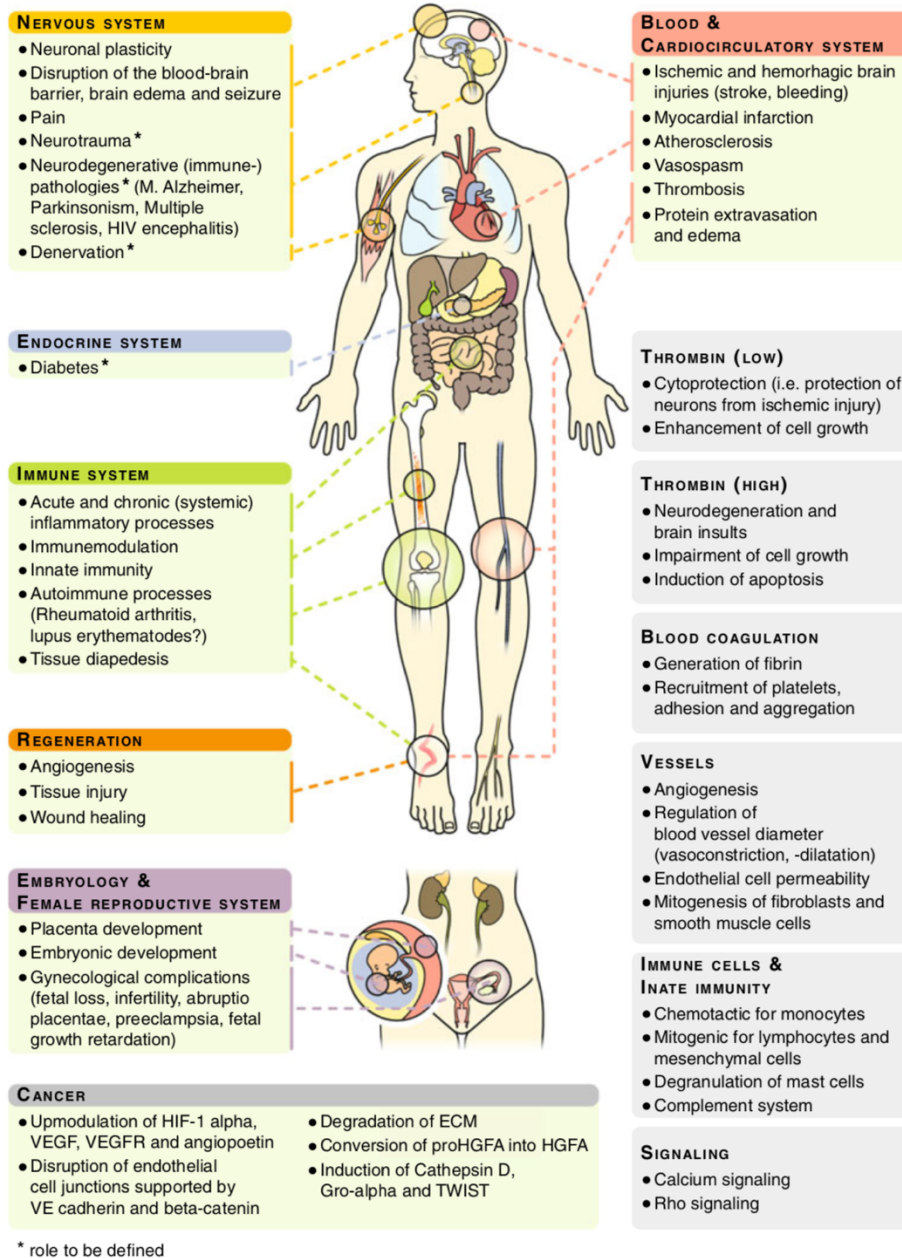
## 1.2 Weitere Funktionen des Thrombins

Die Hauptrolle Thrombins wird in erster Linie in seiner Funktion als Serinprotease im Rahmen der Hämostase bei der Aktivierung von Fibrin zu Fibrinogen gesehen. Daneben ist Thrombin jedoch über die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) über zahlreiche unterschiedliche Signalkaskaden auch in der Lage, weitere Funktionen auszuführen. Auf diese Weise kann Thrombin etwa auf die Zellproliferation, Zellteilung, Zellmorphologie und Zellmotilität verschiedenster Gewebe Einfluss nehmen (52-54). Physiologisch spielt Thrombin in der Embryonalentwicklung (55-59), der Angiogenese (60-63), der Organregeneration (64, 65), dem Nervensystem (54, 66, 67) und der angeborenen Immunität (68-70) eine Rolle. Daneben beeinflusst es verschiedene Pathologien, wie akute und chronische Entzündungsprozesse (71-73), oder die Tumorphologie unterschiedlicher Entitäten (52, 62, 74). Somit ist Thrombin neben seiner wohlbekannteren Rolle in der Hämostase in zahlreichen weiteren Prozessen involviert (siehe Abbildung 3). Interessanterweise konnten teilweise über die Protease-aktivierten Rezeptoren konzentrationsabhängige Wirkungen des Thrombins festgestellt werden: so wurde bereits über zytoprotektive Zellantworten bei niedrigen

# Einleitung

Prothrombin Plasmakonzentrationen berichtet, die jedoch bei hohen Konzentrationen in proinflammatorische Zellantworten umschwenken können (75, 76) (vgl. auch Kapitel 1.4).

Im Folgenden sollen ausgewählte pathologische Funktionen genauer erläutert werden. Diese stellen jedoch nur eine kleine Auswahl der umfangreichen weiteren Funktionen des Thrombins dar.



**Abbildung 3: Funktionen des Thrombins in Physiologie und Pathophysiologie**

Thrombin ist neben seiner Rolle als Schlüsselenzym in der Hämostase auch in vielen anderen physiologischen und pathologischen Prozessen von Bedeutung, hierbei unter anderem in der Embryologie, dem Immunsystem, der Angiogenese, bei Entzündungen oder bei der Entstehung bösartiger Tumoren. Abbildung aus Danckwardt et al. (52).

### 1.2.1 Thrombin in Immunologie und Inflammation

Das Gerinnungssystem und das Immunsystem sind nicht nur über gemeinsame evolutionäre Vorläufer, sondern auch über zahlreiche (patho)physiologische Funktionen eng miteinander verknüpft (77, 78). So sind neben Thrombin auch weitere Serinproteasen der Gerinnungskaskade in der Lage, die Komplementfaktoren C3 und C5 zu funktionellen C3a und C5a zu aktivieren (78, 79). Dieses Zusammenspiel funktioniert bidirektional: so kann das Komplementsystem beispielsweise über C5a die Tissue Factor Expression stimulieren und so die Gerinnung aktivieren. Zudem inaktiviert der Thrombin-aktivierbare Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) C3a und C5a, sodass auch negative Rückkopplungsmechanismen systemübergreifend stattfinden (71, 80). Über Protease-aktivierte-Rezeptoren (PARs) kommuniziert Thrombin zudem mit Immunzellen, darunter Lymphozyten, Mastzellen, Makrophagen, Monozyten sowie dendritische Zellen (68, 81-83). Hierbei kommt es zur Proliferation, Chemotaxis und Aktivierung der Zellen, welches zur Ausschüttung von Zytokinen, wie  $\text{IFN}\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10,  $\text{TNF}\alpha$  und weiteren proinflammatorischen Proteinen führt (69, 84-86).

Durch diese umfangreichen Wechselwirkungen spielt Thrombin in akuten und chronischen Entzündungsprozessen eine Rolle (87). So führt eine vermehrte Thrombin Generierung bei Gefäßverletzungen oder proinflammatorischen Zuständen, wie sie etwa bei der Atherothrombose, dem Diabetes mellitus oder dem Bluthochdruck vorliegen, zu einem prokoagulatorischen Zustand (88, 89). Thrombin ist zudem in der Lage direkt über PARs auch Zellen der glatten Gefäßmuskulatur und Endothelzellen zu aktivieren (85, 90, 91). Dies bewirkt die Ausschüttung der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VAM-1 und E-Selektin sowie von Wachstumsfaktoren, Zyto- und Chemokinen und Tissue Factor (92-94). Letztlich führt die Aktivierung von Thrombozyten mit der Ausschüttung weiterer Wachstumsfaktoren wie VEGF (95), PDGF (96), FGF (97) und  $\text{TGF-}\beta$  (98) unter anderem zur Veränderung der Permeabilität der Gefäßwand und dem Wachstum von Fibroblasten. Interessanterweise konnte bei diesen Entzündungsreaktionen eine lokale Heraufregulierung des PAR-1 Rezeptors gesehen werden (99, 100). Die gegenseitige Aktivierung inflammatorischer und koagulatorischer Mediatoren führt letztlich zu einem „Circulus vitiosus“. Auf diese Weise unterstützt Thrombin die Entstehung atherosklerotischer Läsionen. Ähnliche Mechanismen sind auch bei anderen chronischen Erkrankungen beteiligt: so führt die über Thrombin vermittelte Immunantwort über Protease-aktivierte Rezeptoren bei der rheumatoiden Arthritis zur Gelenkdestruktion (101), bei der multiplen Sklerose zu neurologischen Beeinträchtigungen (102), bei der Alzheimer Erkrankung zu Gedächtnisstörungen (103, 104) sowie bei hämorrhagischen und ischämischen Insulten zu Ödemen bis hin zur Epilepsie (105-107).

### 1.2.2 Thrombin in der Tumorbilogie

Eine angemessene Kontrolle der F2 Genexpression entscheidet nicht nur über eine adäquate Balance zwischen einem pro- und antikoagulatorischen Zustand, sondern spielt auch im Rahmen der Tumorbilogie für das Wachstum und die Metastasierung eine Rolle (74, 108).

Klinisch ist die Assoziation tiefer Beinvenenthrombosen (TVT) mit dem Vorliegen maligner Tumoren seit ca. 150 Jahren bekannt (109, 110). Während Thrombosen jedoch lange als paraneoplastisches Syndrom (Trousseau's Syndrom) und damit lediglich als Konsequenz einer Tumorerkrankung angesehen wurden (111, 112), herrscht mittlerweile Konsens darüber, dass das hämostatische System zur Tumorprogression beiträgt (113). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auffällig hohe Thrombinkonzentrationen bis zu 500nM (physiologische Plasmakonzentration < 5-10 nM (33)) im Plasma von Patienten mit Brust-, Lungen-, Pankreas-, Nieren-, Prostata-, gastrointestinalen und zerebralen Tumoren vorkamen (114). Doch nicht nur ein prokoagulatorisches System, sondern auch ein proinflammatorischer Status sind mit der Tumorentstehung eng verknüpft (115). Tumorzellen sind in der Lage direkt Zytokine und prokoagulatorische Substanzen zu sezernieren sowie indirekt Thrombozyten,



## Einleitung

Endothelzellen und zahlreiche Immunzellen zu stimulieren (116). Eine aktive Sekretion von Tissue Factor durch aggressive Tumoren wird als ein Hauptaspekt bei der Tumorprogression und -disseminierung angesehen (117). Das Protein ist hierbei einerseits selbst in der Lage intrazelluläre Signalkaskaden, bspw. über TF/FVIIa/FXa-vermittelte Aktivierung von PAR-1 und PAR-2 zu initiieren, die das Tumorwachstum unterstützen (118-120), andererseits moduliert es die Generierung des Thrombins. Thrombin führt über die Fibrinbildung und Thrombozytenaktivierung neben einem prokoagulatorischen Gerinnungsstatus auch über zahlreiche Interaktionen mit Immunzellen und dem Komplementsystem zu einer Immunaktivierung (116). Allerdings kann es auch durch die PAR-Signalgebung und durch direkte Induktion onkogener Mechanismen, bspw. über c-myc-Aktivierung oder die Co-Aktivierung des Hepatocyte Growth Factor (HGF) zu zahlreichen Tumor-assoziierten Prozessen beitragen (121). Hierunter zählen neben der Gerinnungsaktivierung nicht nur die Tumor-assoziierten proinflammatorischen Prozesse, sondern insbesondere auch Tumorwachstum und Proliferation (53, 122-124), die Tumoradhäsion an die subendotheliale Matrix (125-129), Gewebeinvasion und Extravasation (130, 131) sowie eine Tumordisseminierung und Metastasierung (132, 133).

Daneben trägt Thrombin zur (tumorassoziierten) Angiogenese bei, indem es PAR-vermittelt die Ausschüttung von Wachstumshormonen wie VEGF, Angiopoietin-1, und Angiopoietin-2 sowie MMP-1, MMP-2 und MMP-9 aus Endothelzellen, Thrombozyten und Fibroblasten induziert (134-138). Dies führt zu der Annahme, dass ein Regulationsmechanismus bezüglich der F2 Expression vorliegt, der auf Hypoxie reagiert. Auf diese Weise ließe sich auch erklären, warum Thrombin nicht nur im Mikromilieu von Tumoren, sondern auch in ischämischen Zuständen vermehrt exprimiert wird (52, 107).

Diese umfangreiche Beteiligung Thrombins an zahlreichen chronischen und akuten Entzündungsgeschehen und in der Tumorbilogie führt zu der Frage, inwieweit eine Inhibition oder Regulierung seiner Expression nicht nur in der Hämostase, sondern in zahlreichen weiteren Erkrankungen therapeutische Anwendbarkeit hat.

### 1.3 Die Serinprotease Thrombin

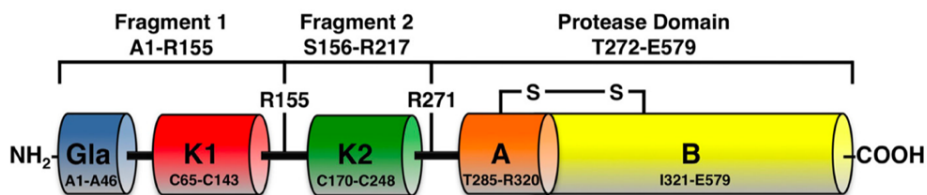
Thrombin leitet sich vom altgriechischen Wort „Thrombos“ (θρόμβος, thrómbos, zu deutsch „Klumpen“, „Pfropf“, „Koagel“) ab. Es wurde 1892 erstmals durch Alexander Schmidt in seinem Werk „Zur Blutlehre“ beschrieben, als seine hydrolytische Funktion in der Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und damit sein wesentlicher Beitrag zur Blutgerinnung entdeckt wurde. Sein Vorläuferprotein (Zymogen) Prothrombin wird wie die anderen Vitamin K-abhängigen Blutgerinnungsfaktoren hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Aber auch andere Synthesorte konnten bereits nachgewiesen werden (siehe Kapitel 1.6). Prothrombin liegt im Blut mit einer Plasmakonzentration von 700nM bis 1,7 $\mu$ M vor (139). Die Halbwertszeit beträgt ca. 3 bis 5 Tage. Seine Struktur, insbesondere die katalytisch aktive B-Kette, ähnelt den chymotrypsinartigen Serinproteasen, weshalb es der Familie der Chymotrypsine zugeordnet wird (51, 140, 141). Die Gemeinsamkeit der Serinproteasen liegt in einem Serinrest im katalytischen Zentrum. Obwohl Thrombin nur eine einzige Serinproteasen-Domäne besitzt, enthält es strukturell weitere Anteile, die eine gewisse Substratspezifität erlauben, und die Thrombin dazu befähigt, sowohl mit etlichen Substraten im Rahmen der Hämostase als auch in anderen biologischen Prozessen zu interagieren (51) (siehe Kapitel 1.2).

#### 1.3.1 Schematischer Aufbau

Prothrombin hat eine molekulare Masse von 72.000 Dalton und besteht aus einer singulären Glykoproteinkette mit 579 Aminosäuren (142). Bei der Nummerierung der Aminosäurereste ist

## Einleitung

es üblich aufgrund der topologischen Ähnlichkeiten zu Trypsin die gängige Chymotrypsinogen-Nummerierung anzuwenden (141, 143). Das Zymogen Prothrombin besteht im Aufbau aus den folgenden Bestandteilen: Fragment 1 (Reste 1–155), Fragment 2 (Reste 156–271) und eine Proteasen-Domäne (Reste 272–579). Hierbei enthält Fragment 1 eine Gla-Domäne (Reste 1–46) und eine erste Kringel (kringle-1)-Region (Reste 65–143), während Fragment 2 einen zweiten Kringel (Reste 170–248) beinhaltet (kringle-2). Die Proteasen-Domäne dagegen setzt sich aus einer leichten A-Kette (Reste 272–320) und einer katalytisch aktiven schweren B-Kette (Reste 321–579) zusammen. Verbunden werden Kringel 1 (kringle-1) mit der Gla-Domäne (Reste 47–64), sowie beide Kringel (kringle-1 und kringle-2) miteinander (Reste 144–169) sowie Kringel 2 (kringle-2) mit der A-Kette (Reste 249–284) (siehe Abbildung 4). Der Aufbau der Bindungsstelle für Thrombomodulin, Hirudin und Fibrinogen im katalytischen Zentrum (Reste 387–389) ist in humanem, bovinen, und murinen Prothrombin gleich aufgebaut, sodass anzunehmen ist, dass sie in den verschiedenen Spezies jeweils die gleichen biologischen Funktionen erfüllen (144).



**Abbildung 4: Schematische Repräsentation von Prothrombin**

Schematische Repräsentation von Prothrombin, bestehend aus Fragment 1 (Reste 1–155), Fragment 2 (Reste 156–271), und einer Protease-Domäne (Reste 272–579). Fragment-1 enthält eine Gla Domäne (Reste 1–44) sowie eine Kringelregion (Reste 65–143), Fragment-2 enthält einen zweiten Kringel (Reste 170–248), und die Protease-Domäne enthält die A- (Reste 272–320) und B- (Reste 321–579) Ketten. Abbildung nach Pozzi et al. (145).

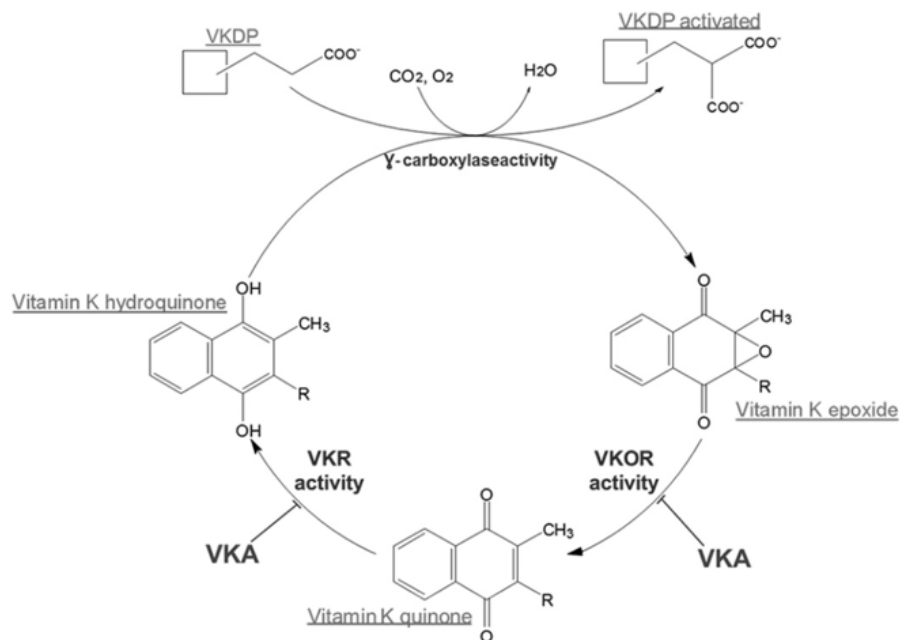
### 1.3.2 Vitamin K-abhängige $\gamma$ -Carboxylierung

Die Vitamin K-abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifizierung, die für die biologische Funktion zahlreicher Vitamin K-abhängiger Proteine, wie Prothrombin und der Gerinnungsfaktoren FVII, FIX und FX sowie der natürlichen Antikoagulantien Protein C und Protein S, grundlegend sind.

Bei der Vitamin K-abhängigen Carboxylierung kommt es mithilfe der reduzierten Form des Vitamin K ( $\text{KH}_2$ ) als Kofaktor durch die mikrosomale  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase (GGCX) zu einer Umwandlung von spezifischen Glutamatresten (Glu) am N-terminalen Ende der Proteine zu  $\gamma$ -Carboxyglutamatresten (Gla) (146, 147). Sie kann sowohl in der Leber als auch im peripheren Blutkreislaufsystem stattfinden (148). Diese  $\gamma$ -carboxylierten Glutamyreste sind bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin für die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Interaktion mit negativ geladenen Phospholipidmembranen und damit bei der zellulären Anheftung des Thrombins am Ort der Gefäßverletzung von Bedeutung (144). Die reduzierte Form des Vitamin K ( $\text{KH}_2$ ), das als Kofaktoren Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) und Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) benötigt, wird bei der Carboxylierungsreaktion zu Vitamin K 2,3-Epoxid (KO) oxidiert. Damit das für die  $\gamma$ -Carboxylierung benötigte  $\text{KH}_2$  konstant zu Verfügung steht, kann das KO in einem zweischrittigen Prozess durch die Enzyme Vitamin K-Epoxid-Reduktase (VKOR) und Vitamin K-Reduktase (VKR) wieder zu  $\text{KH}_2$  reduziert werden (146) (siehe Abbildung 5). Auf diese Weise kann ein Vitamin K-Molekül mehrfach (bis zu 500 mal) wiederverwendet werden (149).

## Einleitung

Mit Vitamin K-Antagonisten (VKAs) kann die Hämostase über eine verringerte prokoagulatorische Wirkung von Prothrombin und den weiteren Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren verzögert werden. Als erster Vitamin K-Antagonist (VKA) wurde 1920 von Karl Paul Link und Eugen Wilhelm Schoeffel Dicoumarol aus verdorbenem Süßklee synthetisiert, nachdem beobachtet wurde, dass Rinder nach dem Verzehr an massiven Blutungen verstarben (150). Etwa 20 Jahre später wurden VKAs erstmals klinisch zur Thromboseprophylaxe und -therapie angewandt (151). Heute existiert eine Vielzahl klinisch angewandter VKAs, darunter Warfarin (USA), Phenprocoumon und Acenocoumarol (Europa). VKAs inhibieren die Vitamin K-Epoxidreduktase (VKOR), sodass die Wiederherstellung des reduzierten Vitamin K (KH<sub>2</sub>) verringert wird und darauffolgend sowohl  $\gamma$ -carboxylierte also auch decarboxylierte Proteine entstehen (vgl. Abbildung 5). Da Letztere eine reduzierte koagulatorische Aktivität aufweisen, wird letztlich der Ablauf der Gerinnungskaskade gestört (150).



**Abbildung 5: Vitamin K-abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung**

Glutamatreste (Glu) werden mithilfe der  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase (GGCX) und der Kofaktoren CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> sowie reduziertem Vitamin K (KH<sub>2</sub>) zu  $\gamma$ -Carboxylglutamatresten (Gla) konvertiert, wobei KH<sub>2</sub> zu Vitamin K 2,3-Epoxid (KO) oxidiert wird. Zur Wiederherstellung des KH<sub>2</sub> wird im Vitamin K Zyklus KO mithilfe der Vitamin K Epoxid Reduktase (VKOR) zunächst zu Vitamin K reduziert und in einem weiteren Schritt durch die Vitamin K-Reduktase zu KH<sub>2</sub> reduziert. Abbildung aus Hammed et al. (149).

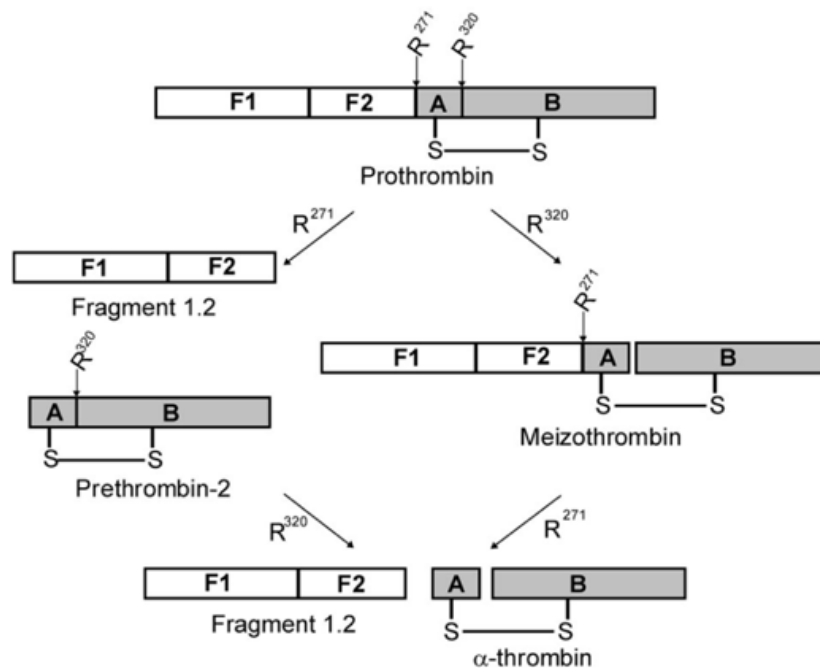
### 1.3.3 Thrombingenerierung

Der Prothrombinasekomplex, als hauptsächlicher Aktivator des Prothrombins zu Thrombin, setzt sich zusammen aus FXa und FVa in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> sowie negativ geladenen Phospholipidmembranen (152). Über 95% des Thrombins entsteht während der Propagationsphase nach bereits eingesetzter Gerinnungsinitiierung (33). Zusätzlich kann Prothrombin auch im Sinne eines positiven verstärkenden Feedbackmechanismus autokatalytisch zu Thrombin aktiviert werden (141).

Bei der Aktivierung des Prothrombins zu Thrombin kommt es in einem zweischrittigen Prozess zu einer Spaltung an Arg-271 und Arg-320 am C-terminalen Ende (153), wodurch Prothrombin Fragment 1.2 abgetrennt und die A-Kette zumindest abgespalten wird (siehe Abbildung 6). Die A- und die B-Kette bleiben, wenn auch nicht kovalent, dennoch über Disulfidbrücken (Cys-

## Einleitung

293-Cys-439) miteinander verbunden. Da Thrombin durch diesen Spaltungsprozess seine Gla- und Kringel-Domänen verliert, bleibt lediglich die Protease-Domäne bestehen, welche das aktive Thrombin darstellt (145).



**Abbildung 6: Prothrombin Aktivierung**

Die Generierung des Thrombins erfolgt durch Spaltungen an Arg-271 (R<sup>271</sup>) und Arg-320 (R<sup>320</sup>). Abhängig von der Reihenfolge der Spaltung in diesem zweistufigen Prozess entsteht bei der initialen Spaltung an Arg-271 (links) das inaktive Vorläuferprotein Prethrombin-2, bzw. bei der initialen Spaltung an Arg-320 (rechts) das aktive Meizothrombin. Die A- und B-Ketten des entstehenden  $\alpha$ -Thrombins bleiben über eine Disulfidbrücke verbunden. Abbildung aus Wood et al. (153).

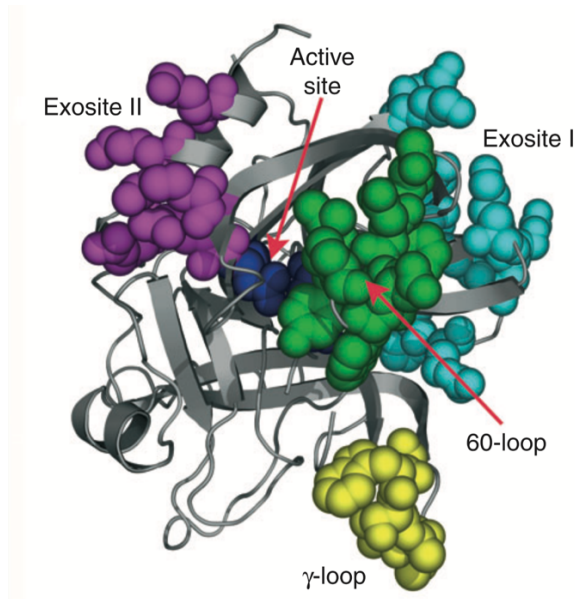
### 1.3.4 Strukturgebundene Substratspezifität

Die Fähigkeit Thrombins durch verschiedene Funktionen die Hämostase zu regulieren, ist in erster Linie durch seine Substratspezifität begründet, die durch spezifische strukturelle Eigenschaften entsteht und die seine funktionellen Mechanismen von den anderen Serinproteasen aus der Chymotrypsinfamilie unterscheidet.

Eine Gemeinsamkeit mit den Serinproteasen ist der Serinrest Ser195 im katalytischen Zentrum des Thrombins. Zusammen mit His57 und Asp189 bildet es das aktive Zentrum (siehe Abbildung 7). Daneben besitzt Thrombin jedoch weitere spezifischere Eigenschaften in seiner kristallinen Struktur, die für die Erkennung, Bindung und Proteolyse verschiedener Substrate, Inhibitoren und Co-Faktoren ausschlaggebend sind. Das eine tiefe Spalte bildende katalytische Zentrum wird umgeben von oberflächlich exponierten Schlaufen (Loops), und elektrisch geladenen Regionen (Exosites), die den Zutritt unpassender Substrate zum aktiven Zentrum verhindern, oder aber die Annäherung geeigneter Substrate unterstützen können. Die 60-Loop und die  $\gamma$ -Loop umrahmen das katalytische Zentrum und bilden so die sog. katalytische Triade. Exosites beschleunigen direkte oder Kofaktor-abhängige Interaktionen zu Substraten und unterstützen die Bildung von Thrombin-Substratkomplexen (Michaelis-Komplexe), um die Proteolyse durch das aktive Zentrum zu ermöglichen (51). Alle natürlichen Substrate und Kofaktoren des Thrombins interagieren entweder mit einem definierten oder auch beiden Exosites, so findet beispielsweise die Interaktion mit Fibrinogen nur an Exosite I und dem aktiven Zentrum statt (51, 154), die thrombininduzierte Plättchenaktivierung dagegen an Exosite II (155). Zusammengefasst ist die kristalline Struktur durch verschiedene wichtige

## Einleitung

Regionen für die Exosite-Substrat-Wechselwirkungen und damit der Substratspezifität von enormer Bedeutung: einerseits mit dem (durch die 60- und  $\gamma$ -Loops) tief liegenden aktiven Zentrum sowie andererseits durch die Eigenschaften der beiden Exosites I und II.



**Abbildung 7: Struktur des Thrombins**

Das katalytische Zentrum mit der AS S195 ist in blau dargestellt. Exosite I (cyan), exosite II (pink), die  $\gamma$ -Loop (gelb) und the 60-Loop (grün) sind hervorgehoben. Abbildung nach Crawley et al. (22).

## 1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Neben der katalytischen Wirkung der Protease Thrombin in der Gerinnungskaskade, bei der unter anderem Fibrinogen in Fibrin gespalten wird, existieren auch einige direkte Interaktionen mit Zellen (156), wie beispielsweise die oben beschriebene thrombozytäre Formänderung oder die Freisetzung thrombozytenaktivierender Mediatoren aus Thrombozyten wie ADP, Serotonin oder Thromboxan A<sub>2</sub>. Auch außerhalb der Gerinnung hat Thrombin einen Einfluss auf Zellen verschiedener Gewebe (siehe Kapitel 1.2). Diese Einflüsse werden durch spezielle G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) vermittelt, der sog. Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) (157).

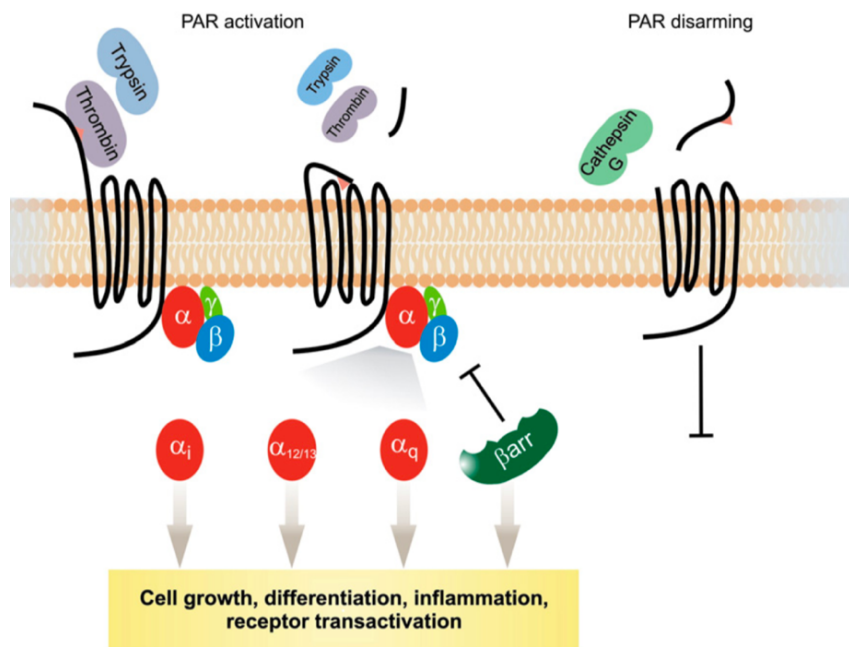
### 1.4.1 Aufbau der PARs

Derzeit sind vier verschiedene PAR Rezeptoren (PAR1 – PAR4) in Maus und Mensch bekannt. Sie sind jeweils in Genclustern auf Chromosom 5q13 (F2R für PAR1, F2RL1 für PAR2 und F2RL2 für PAR3) oder auf Chromosom 19p12 (F2RL3 für PAR4) zu finden (158, 159). Ihre Gene bestehen aus jeweils zwei Exons, von denen Exon 1 das Signalpeptid und Exon 2 das Rezeptorprotein kodiert (159). Sie bestehen aus sieben Transmembranhelices und besitzen eine extrazelluläre N-terminale Domäne, drei intra- sowie drei extrazelluläre Schleifen sowie eine intrazelluläre C-terminale Domäne für die Kopplung an G-Proteine (160). Anders als andere GCPRs werden PARs *in vivo* nicht durch lösliche Liganden aktiviert, sondern durch Proteasen, die extrazellulär am N-terminalen Ende spalten. Durch diese Spaltung entsteht ein neues N-terminales Ende (Neoepitop), welches den Rezeptor intramolekular bindet und nachfolgend eine intrazelluläre Signaltransduktion hervorruft (160).

### 1.4.2 Mechanismus der PAR-Aktivierung und Signalterminierung

Der unter den GPCR einzigartige Mechanismus der irreversiblen Rezeptoraktivierung durch proteolytische Spaltung ist am besten am PAR1 erforscht. Dieser wurde als Thrombinrezeptor als erster PAR-Rezeptor auf Thrombozyten entdeckt und stellt den Prototypen der PARs dar (161-163). Thrombin ist neben einigen weiteren Substanzen (160) der hauptsächliche Aktivator des PAR1 und wird durch die extrazelluläre N-terminale Domäne LDPR<sup>41</sup>-S<sup>42</sup> gebunden, an der es die Peptidbindung R<sup>41</sup>-S<sup>42</sup> spaltet. Das auf diese Weise entstehende Neoepitop des N-terminalen Endes wird als „Tethered Ligand“ (TL) bezeichnet und stellt als Teil des Rezeptors einen intramolekularen Liganden dar. Der TL, der aus den sechs AS-Resten SFLLRN besteht, bindet nachfolgend an die zweite extrazelluläre Schlaufe des Rezeptors, der „Conserved Region on Extracellular Loop 2“ (ECL2), und induziert dann über eine Konformationsänderung die transmembrane Signalgebung über verschiedene heterotrimere G-Proteine, wie G $\alpha_i$ , G $\alpha_q$  und G $\alpha_{12/13}$  (162, 164, 165) (siehe Abbildung 8). PAR1 kann hierbei an G $\alpha_i$ , G $\alpha_q$  und G $\alpha_{12/13}$  koppeln (90), während PAR4 lediglich an G $\alpha_q$ , und G $\alpha_{12/13}$  koppelt und PAR3 vermutlich nicht in der Lage ist, autonom Signale weiterzuleiten (s.u.). Neben gekoppelten G-Proteinen können aktivierte PARs auch mithilfe von anderen Adapterproteinen intrazelluläre Signale induzieren (166).

Bei Rezeptoraktivierung erfolgt über das G $\alpha$ -Protein ein Austausch von GDP zu GTP und einer Dissoziation der angehefteten G $\beta\gamma$ -Untereinheit (UE), welche zu einer Aktivierung von Signalkaskaden führt (167, 168). Die Weiterleitung erfolgt stromabwärts unter anderem durch Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs), Phospholipase C (PKC), Cyclooxygenase 2 und Rho-aktivierten Proteinkinasen (169). Unter Berücksichtigung des Liganden, der Art der Aktivierung und vieler weiterer unten beschriebener Einflussfaktoren, variieren die nachfolgenden Signalwege und Effekte in verschiedenen Geweben.



**Abbildung 8: Mechanismen der Signaltransduktion über PAR-Rezeptoren**

PAR-Rezeptoren werden proteolytisch durch Thrombin oder Trypsin aktiviert. So entsteht ein Neoepitop, das als intramolekularer Ligand eine Dissoziation G-gekoppelter Proteine bewirkt. PARs binden mit verschiedenen G $\alpha$ -Untereinheiten, unter anderem G $\alpha_i$ , G $\alpha_{12/13}$  und G $\alpha_q$ . Auf diese Weise können sie eine Vielzahl verschiedener physiologischer Prozesse beeinflussen. Der PAR-Rezeptor kann durch  $\beta$ -Arrestin desensibilisiert werden. Eine Inaktivierung kann zudem durch die proteolytische Spaltung außerhalb des Aktivierungsbereiches des N-terminalen Arms, zum Beispiel durch Cathepsin G erfolgen. Abbildung aus Adams et al. (160).

### 1.4.3 Komplexität und Einflussfaktoren der PAR-Signalgebung

Obwohl PARs ähnlich aufgebaut und in ähnlicher Weise in verschiedenen Geweben ausgeprägt sind, unterscheiden sich die Funktionen und Wirkungen der Untergruppen in Physiologie und Pathologie bis hin zu antagonistischen Effekten. Diese Einflüsse werden durch ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Bindungs- bzw. Effektorproteinen, der Art der Aktivierung (proteolytisch vs. nicht-proteolytisch), verschiedener potentieller Spaltungsstellen der Substrate am N-terminalen Ende der Rezeptoren, post-translationalen Modifizierungen, der Art der Signaltransduktion und -terminierung, der Rezeptordegradation und -resensitivierung, der Konzentrationen der Substrate, der Interaktionen mit Cofaktoren oder -rezeptoren, sowie der variablen Ausprägung der Rezeptoren bezüglich der Unterarten und Konzentration in verschiedenen Geweben bestimmt (160, 164, 170).

Während die humanen PAR1 (162), PAR3 (171) und PAR4 (172, 173) durch Thrombin aktiviert werden können, wurde bisher angenommen, dass PAR2 nicht durch Thrombin, jedoch durch andere Proteasen wie Trypsin (174), Trypsinase (175) sowie FVII und FX aktiviert werden kann (176). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass Thrombin dennoch in sehr hohen Dosen von 100 – 500nM eine direkte Spaltung und Aktivierung des PAR2 bewirken kann (177, 178). Bei der Aktivierung durch Thrombin erfolgt eine direkte Bindung zwischen der Exosite 1 (Fibrinogen-bindende Exosite) des Thrombins an die hirudinartige Bindungsdomäne des PARs an der C-terminalen Seite der Thrombin-Spaltungsstelle, was unmittelbar zur Proteolyse und Signalauslösung führt. Neben dieser konnten bereits verschiedene weitere N-terminale Spaltungsstellen beschrieben werden, die verschiedene Rezeptorkonformationen mit unterschiedlichen G-Proteinbindungs-Affinitäten aufweisen. Die entsprechenden Signale werden unter dem Begriff "Biased Signalling" zusammengefasst und veranschaulichen, wie Proteasen verschiedenartige Zellantworten über denselben PAR generieren können (179, 180). Interessanterweise können PARs (außer PAR3 (166)) auch durch synthetische Peptide aktiviert werden, sofern die ersten 6 Aminosäuren mit der AS-Sequenz des entsprechenden Tethered Ligand übereinstimmt (181-183). Diese entfalten jedoch erst bei 100-1000-fach höheren Konzentrationen eine ähnliche Wirkung (184). Interessanterweise kann sich die Signalgebung durch Thrombin im Vergleich zu einer PAR-Aktivierung durch synthetische Peptide unterscheiden. Verschiedene PAR-modulierende Substanzen befinden sich derzeit, auch in therapeutischer Aussicht, in Erforschung und Entwicklung (170).

Die meisten Zelltypen oder Gewebe exprimieren mehrere PAR-Typen. Während in humanen Thrombozyten PAR1 und PAR4 exprimiert werden und PAR1 neben seiner eigenen potenten Signalgebung (185, 186) einen Kofaktor für die Aktivierung von PAR4 darstellt (187), werden in murinen Thrombozyten stattdessen PAR3 und PAR4 exprimiert, wobei auch hier PAR3 unter Heterodimerisierung mit PAR4 lediglich als Kofaktor des letzteren zu dienen scheint (166). Neben Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen PAR-Subgruppen, können PARs auch mit anderen G-gekoppelten Rezeptoren interagieren (188).

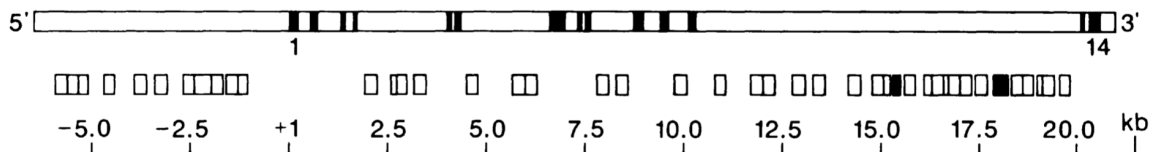
Alles in allem ist die Wirkung der PAR-Signalgebung durch zahlreiche Komplexe Regulationsmechanismen bestimmt, die unterschiedlichste biologische Prozesse und Funktionen erfüllen können.

### 1.5 Das Prothrombin Gen

Das Prothrombin-Gen (F2) ist beim Menschen (*Homo sapiens*) auf dem Chromosom 11p11.2 lokalisiert (189), bei der Maus (*Mus musculus*) befindet es sich auf Chromosom 2. Es ist 21 kb lang und besteht aus 14 Exons und 13 Introns (siehe Abbildung 9). Die Exons umfassen 25 bis 315 bp, während die Introns eine Größe 84 bis 9447 bp aufweisen. Insgesamt machen die Introns 90% des gesamten Gens aus (144). Synthetisiert wird das Gen mit einer N-terminalen Verlängerung von 43 Aminosäuren, die dem N-terminalen Ala-Rest des reifen Prothrombins

## Einleitung

vorangehen, und als Führungssequenzen des sog. Pre-Pro-Proteins eine Rolle spielen. Die Pre-Signalsequenz wird vor der Sekretion aus der Leber entfernt, während für die Entfernung der Pro-Sequenz durch Proteolyse die Vitamin-K-abhängige  $\gamma$ -Carboxylierung von Bedeutung ist. Daneben wurden große Anteile repetetiver Sequenzen (Alu- und KpnI) nachgewiesen, deren Anteile 40% der DNA des Gens ausmachen, dessen Funktion bisher jedoch unbekannt ist (190, 191). Die 715 bp lange Region des 3' Endes des Prothrombin Gens ist für einige klinische Manifestationen durch Mutationen in diesen Bereichen bedeutsam (192).



**Abbildung 9: Aufbau des humanen Prothrombin-Gens**

Schwarze Anteile des Balkens stellen die 14 Exons des humanen Prothrombin-Gens dar (Auflistung 1-14). Weiße Anteile repräsentieren Introns. Die Transkription verläuft vom 5' zum 3' Ende, die Kästchen unterhalb des Balkens repräsentieren repetitive Sequenzen der 5'-Region des Gens sowie innerhalb des Gens. Die weißen Kästchen repräsentieren Alu-repetetive Sequenzen und die schwarzen Kästchen repräsentieren die KpnI-repetitiven Sequenzen. Die untere Skala zeigt Kilobasen an. Die Initiationsregion der Transkription ist mit +1 markiert, stromaufwärts erfolgt die Nummerierung mit negativen Zahlen. Abbildung aus Degen et al. (144).

## 1.6 Pathologien mit Dysregulation der Prothrombin Genexpression

Prothrombin wird, wie die anderen Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, hauptsächlich in der Leber synthetisiert. Die Menge des extrahepatisch exprimierten Prothrombins beläuft sich auf lediglich 5% der Gesamtkonzentration, wobei als weitere Syntheseorte unter anderem das Nervensystem (193), sowie während der Embryonalentwicklung auch das Diaphragma, der Magen, der Darm, die Niere und die Milz identifiziert wurden (144). Fehlt Thrombin während der Embryonalentwicklung führt dies zur embryonalen oder neonatalen Letalität durch Blutungen in den Dottersack und Gewebenekrosen (194, 195). Bis heute wurde kein Mensch ohne Prothrombin bzw. mit nicht detektierbaren Prothrombin-Plasmakonzentrationen beschrieben (191). Die nachfolgenden angeborenen Erkrankungen sollen verdeutlichen, inwiefern dysregulierte Prothrombin-Plasmakonzentrationen zu einer Veränderung des hämostatischen Gleichgewichts mit potentiell lebensbedrohlicher klinischer Auswirkung haben kann.

### 1.6.1 Prothrombindefizit-Erkrankungen

Hypo-Prothrombinämien gehören mit einer Prävalenz von 1:2.000.000 zu den seltensten Gerinnungsstörungen. Es existieren aktuell 39 beschriebene Mutationen eines Prothrombindefizits, dabei werden ein Typ I mit einem tatsächlichen Mangel an Prothrombin (Hypoprothrombinämie), sowie ein Typ II mit einer normalen oder beinahe-normalen Synthesemenge eines dysfunktionalen Prothrombinproteins (Dysprothrombinämie) beschrieben. Während erstere, zum Beispiel die Prothrombin Mutation Trp612Stop + IVS2-25C G Leiden, beinahe ausschließlich zu moderaten bis schweren Blutungen führen (196), sind die klinischen Auswirkungen des Typs II, zum Beispiel Prothrombin Salakta (Gln509Ala), Prothrombin Greenville (Arg517Gln), Prothrombin Perija (Gly548Ala) oder Prothrombin Scranton (Lys599Thr), in ihrer klinischen Ausprägung sehr variabel und können von klinischer Inapparenz über Blutungen bis hin (durch Störung der Interaktion mit Antithrombin) zu



## Einleitung

Thrombosen führen, wobei jene mit Thromboseneigung auch mit einem neuen Typ III klassifiziert werden (191). Im Gegensatz zu den Mutationen, die zu einer Erhöhung des Prothrombinspiegels führen, befinden sich diese meist in der Nähe des katalytischen Zentrums. Für die klinisch-symptomatische Auswirkung dieser Erkrankungen ist die Plasmakonzentration des Prothrombins maßgebend (197).

### 1.6.2 Hyper-Prothrombinämien

Ein weiteres Beispiel für eine Dysregulation der physiologischen Prothrombinkonzentration ist der genetische G>A Polymorphismus an Position 20210 des Prothrombin-Gens (Nummerierung nach Degen et al. (148)). Diese „Gain of Function“-Mutation stellt mit einer Prävalenz von 1 – 2% in der Bevölkerung eine der häufigsten Ursachen einer venösen Thromboembolie dar (198). Klinisch führt sie durch einen bis zu 3-fach erhöhten Prothrombin Plasmaspiegel konsekutiv zu einem dreifach erhöhten Risiko für venöse Thrombosen und damit zum Bild einer moderaten Thrombophilie (199). Die Punktmutation liegt im Exon 14 an der Polyadenylierungsregion der 3'-untranslatierten Region (UTR) des Prothrombingens und liegt dabei 20 Nukleotide (nt) stromabwärts der Poly(A)-Signal- und 20 nt stromaufwärts der 3' U-reichen Sequenz (198, 200). Durch die Assoziation der Mutation mit der 3'-UTR Region des Prothrombingens existieren verschiedene Hypothesen zu den Mechanismen die zu einer erhöhten Prothrombinkonzentration führen können. Die bisher untersuchten Ursachen umfassen eine veränderte Effizienz der Polyadenylierung der 3'-UTR (mRNA-Prozessierung), die Stabilität der mRNA durch die Ausprägung bestimmter Sequenzelemente RNA bindender Proteine sowie die Beeinflussung des Abbaus der mRNA (jeweils resultierend in einer verlängerten Verfügbarkeit der mRNA für die Proteinbiosynthese). Daneben wird auch eine Veränderung der Translationseffizienz diskutiert (108, 198-201). Die tatsächlich zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch immer nicht endgültig geklärt, es wird angenommen, dass ein Zusammenspiel mehrerer dieser Mechanismen vorliegt.

Die 3'-UTR Polyadenylierungsregion des Prothrombin-Gens ist aufgrund ihres nicht-kanonischen Aufbaus eine dynamische Region, die äußerst anfällig für „Gain-of-function“-Mutationen und daher als mögliche Ursache neuer Thrombophilie-Varianten prädestiniert ist (192). Neben der G20210A-Prothrombin-Mutation existieren noch weitere Mutationen in der 3'-UTR-Region, darunter die Mutationen C20209T, C20221T, A20218G, A19911G etc., mit variabler klinischer Ausprägung (202, 203).

Diese Beispiele von Erkrankungen mit zum Teil ausgeprägter klinischer Ausprägung zeigen, dass eine adäquate Prothrombin-Plasmakonzentration die Basis einer funktionierenden Hämostase bildet.

### 1.7 Ziel

Eine adäquat koordinierte F2-Genexpression ist für das präzise eingestellte Gleichgewicht der Hämostase von grundlegender Bedeutung. Eine fehlerhafte Einstellung dieser Homöostase kann einerseits in Thrombosen und Blutungsneigungen resultieren, andererseits spielen veränderte Prothrombin bzw. Thrombin Konzentrationen auch in anderen physiologischen Prozessen und unter pathologischen Umständen, wie etwa dem Tumormilieu eine Rolle (74, 204, 205) (siehe auch Kapitel 1.2.2). Welche Stimuli oder Substanzen Einfluss auf eine pathologisch veränderte Genexpression des Prothrombins aufweisen, und welche Mechanismen die Plasmakonzentration des Prothrombins physiologisch stets auf ein adäquates Level einstellen, ist noch unklar und Bedarf weiterer Untersuchungen.

## Einleitung

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Zellkulturmodell zu etablieren, mit dem Einflussfaktoren der F2 Genexpression evaluiert werden können. Für die Etablierung eines primären Hepatozytenmodells wurde hierzu ein neues genetisch-modifiziertes Mausmodell mit dem Namen „D-Insight“ herangezogen, welches zuvor im Labor von Prof. Danckwardt generiert wurde. Dieses erlaubt die Nachverfolgung der F2 Genexpression und Proteinsekretion in großem Umfang ex vivo durch die Lumineszenz-Reporter Firefly Luciferase und Renilla Luciferase.

Nach erfolgreicher Etablierung des primären Zellkulturmodells wurde die Dynamik der F2 Genexpression unter verschiedenen Kulturbedingungen und unter dem Einfluss potentiell genregulierender (patho-)physiologischer Substanzen untersucht. Auf diese Weise sollten eventuelle (auto-)regulatorische Mechanismen des Prothrombins bzw. Thrombins auf die F2 Genexpression sowie weitere potentielle Modulatoren analysiert werden. Mit diesem Ansatz ist ein Screening potentieller Einflussfaktoren effektiv, zeit- und ressourcensparend in einem Hochdurchsatzverfahren möglich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Puffer und Lösungen

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Methode</b>
<b>Hepatozyten Isolationspuffer I (PHI buffer I)</b>	Natriumchlorid (NaCl, 136,89 mM), Kaliumchlorid (KCl, 52,31 mM), HEPES (10 mM), pH7,4	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Hepatozyten Isolationspuffer II (PHI buffer II)</b>	Natriumchlorid (NaCl, 58,44 mM), Kaliumchlorid (KCl, 52,31 mM), Calciumdichlorid (CaCl <sub>2</sub> , 1,62 mM), HEPES (10 mM), Kollagenase (0,05%) pH7,6	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Hepatozyten Isolationspuffer III (PHI buffer III)</b>	Natriumchlorid (NaCl, 136,89 mM), Kaliumchlorid (KCl, 52,31 mM), Calciumdichlorid (CaCl <sub>2</sub> , 1,62 mM), HEPES (10 mM), pH7,6	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS)</b>	Gibco	Isolation primärer Hepatozyten
<b>DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)</b>	Gibco	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Williams E Medium</b>	Merck Millipore	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Primary Hepatocyte Supplements</b>	ThermoFisher Scientific	Isolation primärer Hepatozyten
<b>20%ige Gelatine</b>	Sigma Aldrich	Isolation primärer Hepatozyten

### 2.2 Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
<b>1x Passive Lysis Buffer</b>	Promega	Protein-Isolation
<b>Oligod(dT) Primer (0,5 µg/µl)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>5x RT-Buffer</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>dNTPs (10mM)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese

## Material und Methoden

<b>DTT (0,1 µM)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>RNase Inhibitor</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>RevertAid Reverse Transcriptase</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>PeqGold TriFast Lösung</b>	PeqLab	RNA-Isolation
<b>Chloroform</b>	Sigma-Aldrich	RNA-Isolation
<b>Glykogen</b>	Thermo Fisher Scientific	RNA-Isolation
<b>Isopropanol</b>	Sigma-Aldrich	RNA-Isolation
<b>70%iges Ethanol (vergällt)</b>	Sigma-Aldrich	RNA-Isolation
<b>OneTaq 2X Mix</b>	Thermo Fisher Scientific	qRT-PCR
<b>SYBR green</b>	Thermo Fisher Scientific	qRT-PCR
<b>Primer Mix</b>	Thermo Fisher Scientific	qRT-PCR
<b>Ketamin</b>	Inresa Arzneimittel GmbH	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Trypanblau</b>	Biochrom AG	Isolation primärer Hepatozyten Zellkultur
<b>Trypsin EDTA</b>	Sigma-Aldrich	Zellkultur
<b>Bright Glo</b>	Promega	Firefly Luciferase Assay
<b>Renilla Glo</b>	Promega	Renilla Luciferase Assay
<b>Beetle Juice</b>	PJK Biotech	Firefly Luciferase Assay
<b>Coelenterazin</b>	Promega	Renilla Luciferase Assay
<b>Luciferin</b>	Perkin Elmer	IVIS Spectrum Instrument

### 2.3 Primer

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
<b>mF2 for</b>	GGTGAACCTGCCCATTGTAGA
<b>mF2 rev</b>	TCCTCGCTTGGTGTCATTCA
<b>mGAPDH for</b>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
<b>mGAPDH rev</b>	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
<b>mCOLA1A2 for</b>	GGCTCTGCAACACAAGGAGT
<b>mCOLA1A2 rev</b>	GGCCCTTTCGTACTGATCCC

## Material und Methoden

<b>mCOLA3A1 for</b>	AGTGGGCATCCAGGTCCTAT
<b>mCOLA3A1 rev</b>	GCAGCACCACCACCACAG
<b>mTF for</b>	AGCCTTTGTGAAACACCAGACT
<b>mTF rev</b>	CAGGGCAGAGCAACTCGAAG

### 2.4 Geräte und Software

<b>Gerät</b>	<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verwendung</b>
<b>Zentrifuge</b>	-	Hettich Rotina 420R	Proteinisolation, RNA-Isolation, Isolation primärer Hepatozyten
<b>Pipetten</b>	-	Eppendorf	Unspezifisch
<b>TissueRuptor</b>	-	Qiagen	Proteinisolation
<b>Photometer</b>	-	NovaSpec Plus	Proteinkonzentrationsmessung
<b>Vortexer</b>	-	Peqlab	RNA-Isolation
<b>PCR Cycler</b>	-	Analytic Jena AG	cDNA-Synthese
<b>Laufkammer + Zubehör</b>	-	Bio-Rad	qRT-PCR
<b>Chemilumineszenz Detektionssystem</b>	ChemiDoc CFX Manager	BioRad	qRT-PCR
<b>Luminometer</b>	Ascent Software 2.6	Luminoskan ThermoFisher	Luciferase Assay
<b>IVIS Spectrum Instrument</b>	Living Images	Perkin Elmer	Luciferase Detektion
<b>Pumpe</b>	-	LKB Brommer Multiperplex	Isolation primärer Hepatozyten
<b>pH-Meter</b>	-	Mettler Toledo	Herstellung der Pufferlösungen
<b>Wasserbad</b>	-	SW23 Julabo	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Cellstrainer 40µl</b>		Corning	Isolation primärer Hepatozyten
<b>Sterilbank</b>	-	NuAire Class II HS18 Heraeus	Isolation primärer Hepatozyten Zellkultur

## Material und Methoden

<b>Well-Platten Nuclon Delta Surface, steril, transparent (6, 12, 96 Wells)</b>	-	Thermo Scientific	Isolation primärer Hepatozyten Zellkultur
<b>Well-Platten weiß (96 Wells)</b>	-	Greiner bio-one	Compound Screening (Messung im Luminometer)
<b>Well-Platten Nuclon Delta Surface, weiß, steril, mit Deckel (96 Wells)</b>		Thermo Scientific	Zellkultur Compound Screening (Messung im Luminometer)
<b>Well-Platten transparent (96 Wells)</b>	-	BioRad	Compound Screening (Substanzvorbereitung)
<b>Zellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss (rot 175 cm<sup>2</sup>)</b>	-	Greiner Bio-One	Zellkultur (MEFs, HeLas)
<b>Inkubator</b>	-	NuAire (Autoflow)	Zellkultur
<b>Mikroskop</b>	-	Leica	Zellkultur
<b>Zählkammer Neubauer</b>	-	Marienfeld	Zellkultur
<b>Deckgläschen</b>	-	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG	Zellkultur
<b>Cell Scraper</b>	-	Sarstedt	Zellkultur
<b>Multikanal Pipette</b>	-	Gibson	Compound Screening

## 2.5 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Proteinisolation und -konzentrationsmessung

Proteine wurden aus murinen primären Hepatozytenkulturen oder direkt aus murinem hepatischem Gewebe isoliert.

#### 2.5.1.1 Proteinisolation aus murinen primären Hepatozytenkulturen

Zellen aus primären Hepatozytenkulturen wurden mithilfe eines Cell Scapers gewonnen und in einem 15ml Falcon (Bio-One) bei 300 g für 5min auf 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem 1x Passive Lysis Buffer versetzt und lysiert. Die Isolierung erfolgte auf Eis. Pro Well einer 6-Well-Plate wurden je 300 µl verwendet.

### 2.5.1.2 Proteinisolation aus murinem hepatischen Gewebe

Bei größeren Gewebemassen, beispielsweise bei einer kompletten murinen Leber, wie sie für die Erstellung einer Verdünnungsreihe für die interne technische Qualitätskontrolle der Luciferase Assays verwendet wurde, wurde zusätzlich der elektrische Tissue Ruptor (Qiagen) zur Lyse und Homogenisierung des Gewebes angewandt. Hierbei wurde eine murine Leber mit 50 ml 1x Passive Lysis Buffer versetzt und daraus eine Verdünnungsreihe 1:10, 1:100 und 1:1000 erstellt.

### 2.5.1.3 Protein-Konzentrationsmessung

Messungen der Proteinkonzentrationen von Lysaten, die nach obigem Schema aus Zellkulturen bzw. Geweben extrahiert wurden, wurden mithilfe eines Photometers (NovaSpec Plus) im Sinne eines photometrischen Bradford-Tests durchgeführt. Zunächst wurde hierfür das Protein-Assay Farbreagenz-Konzentrat (BioRad) 1:5 in H<sub>2</sub>O verdünnt und 10 min auf Raumtemperatur inkubiert. Das Photometer wurde mithilfe einer Kalibrierküvette mit 1ml Farbreagenz und 2 µl 1x Passive Lysis Buffer kalibriert. Für die Messung wurden jeweils 2 µl des zu messenden Proteinlysats mit 1 ml verdünntem BioRad Farbreagenz in einer Küvette zusammengefügt, resuspendiert und photometrisch gemessen.

### 2.5.2 RNA-Isolation

RNA wurde mithilfe von PeqGold TriFast Lösung (PEQLAB) aus murinen primären Hepatozytenkulturen gewonnen. Pro 10 cm<sup>2</sup> Zellkulturfläche wurde 1 ml TriFast Lösung verwendet. Nach Resuspension wurde dieser für 5 min auf Raumtemperatur inkubiert. Pro 1 ml TriFast Zellsuspension wurde 200 µl Chloroform hinzugefügt, mit einem Vortexer gemischt und erneut 15 min auf Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung bei 12000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurden 500 µl Isopropanol und 20 µl Glykogen (pro 1ml verwendetem TriFast) gegeben. Die wässrige Phase wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert, um die RNA zu fällen. Das RNA Pellet wurde mit 1ml eiskaltem 70%igem Ethanol (EtOH) gewaschen und erneut 10 min lang bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde dann entfernt und 20 µl RNase freies Wasser hinzugegeben. Durch Verdunstung bei 50°C und 500rpm auf einem Schüttler wurde das restliche Ethanol entfernt. Die RNA Konzentrationsmessung erfolgte am NanoDrop Spectrophometer (ThermoFisher Scientific).

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
<i>PeqGold TriFast Lösung</i>	1ml für 10cm <sup>2</sup> Zellkulturschicht
<i>Chloroform</i>	200µL
<i>Glykogen</i>	20µl
<i>Isopropanol</i>	500µl
<i>Ethanol</i>	1ml
<i>RNase freies Wasser</i>	20µl

### 2.5.3 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Bei der reversen Transkription zur cDNA Synthese wurde ein Standard Protokoll mit RevertAid Reverse Transcriptase (ThermoFischer Scientific) und oligo d(T) (16mer) Primer verwendet. Hierbei wurde zunächst ein vorläufiger Mix bestehend aus H<sub>2</sub>O, RNA und OligodT angesetzt, welcher zunächst für 10min bei 65°C inkubiert wurde. Auf das Volumen von 11 µl wurden 5x RT-Buffer, 0,1 µM DTT, RiboLock, RNase Inhibitor und RevertAid Reverse Transcriptase hinzugefügt und im PCR Cyclor für 50 min auf 42°C inkubiert. Die Inkubation wurde anschließend nach weiteren 10 min bei 70°C beendet. Für die weitere Verarbeitung in der qPCR wurde die cDNA 1:5 verdünnt.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
<i>Komplette RNA</i>	0,5 – 2 µg
<i>Oligod(dT) Primer (0,5 µg/µl)</i>	1 µl
<i>5x RT-Buffer</i>	4 µl
<i>dNTPs (10mM)</i>	1 µl
<i>DTT (0,1 µM)</i>	2 µl
<i>RNase Inhibitor</i>	0,5 µl
<i>RevertAid Reverse Transcriptase</i>	1 µl

### 2.5.4 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative real-time PCR wurde ein OneTaq 2X Mastermix mit Standard Puffer (New England BioLabs, NEB), unter Einsatz von OneTaq 2X Mix, Primern (forward und reverse), für den hepatozytären Transferrinrezeptor (TR), und für F2, H<sub>2</sub>O und SYBR green angewendet. Die entsprechenden Volumina der eingesetzten Reagenzien finden sich in der untenstehenden Tabelle. Nach Zugabe der zu untersuchenden cDNA und erfolgter Inkubation nach unten gelistetem Schema erfolgten die Messungen im BioRad CFX Real-Time Detektionssystem.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
<i>cDNA (1:10 verdünnt in H<sub>2</sub>O)</i>	5 µl
<i>OneTaq 2X Mix</i>	7,5 µl
<i>SYBR green</i>	0,3 µl
<i>10 µM Primer Mix</i>	0,3 µl
<i>H<sub>2</sub>O</i>	1,9 µl

**Inkubation:** 95°C für 2 min; 95°C für 30 sec; 60°C für 30sec; 72°C für 30 sec, Protokoll mithilfe des BioRad CFX Manager Systems über die Datei „qPCR Expression Analysis“ und der beiliegenden Tabelle „Quantification Cq Results“



## 2.6 Luciferase Assay

### 2.6.1 Firefly Luciferase Assay

Das Lumineszenz Signal von Proteinlysaten aus murinen primären Hepatozyten bzw. aus murinem hepatischem Gewebe wurden mithilfe eines Luminometers gemessen. Hierzu wurden je 50 µl der mit 1x Passive Lysis Buffer lysierten Proteinlysate mit je 50µl Bright Glo pro Well einer weißen 96-Well Plate zusammengefügt und nachfolgend im Luminoskan Ascent Microplate Luminometer (Thermo Scientific) das Firefly Luciferase (FLuc) Signal gemessen. Bei Experimenten, deren Durchführung eine Zellkultur in einem 96-Well Plate Format erforderte, wurde die Kultur direkt in einer weißen, für das Luminometer geeigneten 96-Well-Plate (Thermo Scientific) angelegt und inkubiert. Für die Messung wurde das Medium der Zellkultur durch Absaugen entfernt und auf die am Boden der Wellplate bestehende Zellschicht direkt mit Bright Glo versetzt (durch den im Bright Glo enthaltenen Lysepuffer erfolgte die Lyse hier direkt). Die durch die Zugabe des im Bright Glo enthaltenen Reagenzes stattfindende Reaktion kann wie folgt beschrieben werden:



Die emittierte Lumineszenz wurde im Luminoskan Luminometer (ThermoFisher) detektiert und quantifiziert.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
<i>Bright Glo (Promega)</i>	50 µl pro Well einer 96-Well-Plate
<i>Beetle Juice (PJK Biotech)</i>	50 µl pro Well einer 96-Well-Plate

### 2.6.2 Renilla Luciferase Assay

Aus primären Hepatozytenkulturen gewonnenes Medium, welches aus dem Zellüberstand in Kultur pipettiert wurde, wurde zur Beurteilung des Anteils des ins Zellkulturmedium sezernierten Prothrombins ebenfalls im Luminometer gemessen. Dazu wurden 4µg Coelenterazin (Promega), welches das Substrat der Renilla Luciferase (RLuc) darstellt, zu 100 ml Renilla-Glo (Promega) gegeben. Für die Messung wurden jeweils 50µl des Mediums sowie 50µl der Coelenterazin/Renilla Glo Lösung in einer weißen 96-Well-plate zusammengegeben und im Luminoskan Luminometer (Thermo Scientific) gemessen.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen</b>
<i>Renilla Glo (Promega)</i>	s.o
<i>Coelenterazin (Promega)</i>	s.o
<i>Coelenterazin/Renilla-Glo Lösung</i>	50 µl pro Well einer 96-Well-Plate

## 2.7 IVIS Spectrum Instrument

Um das hepatozytäre Lumineszenz-Signal der Prothrombin-Expression mit dem IVIS Gerät beurteilen zu können, wurden die Hepatozyten in transparenten Well-Plates ausgesät. Nach Abkühlung der Messinstrumente innerhalb des Gerätes konnte unter der Einstellung „FLuc“ die Messung der Firefly Luciferase Lumineszenz erfolgen. Unmittelbar vor der Messung wurde das Medium der Zellkulturen entfernt und das mit PBS verdünnte Luciferin direkt auf die Zellen

## Material und Methoden

gegeben. Die emittierte Lumineszenz wurde vom IVIS Spectrum Instrument mithilfe des *Living Images* Programms in einer Farbskala dargestellt.

### Gerät

IVIS Spectrum Instrument (PerkinElmer)

### System Programm

Living Images, Farbskala (Photograph) 500 - 2000

### Reagenz

Luciferin (Perkin Elmer), verdünnt mit PBS 1:20

## 2.8 Tier- und Zellkulturmodelle

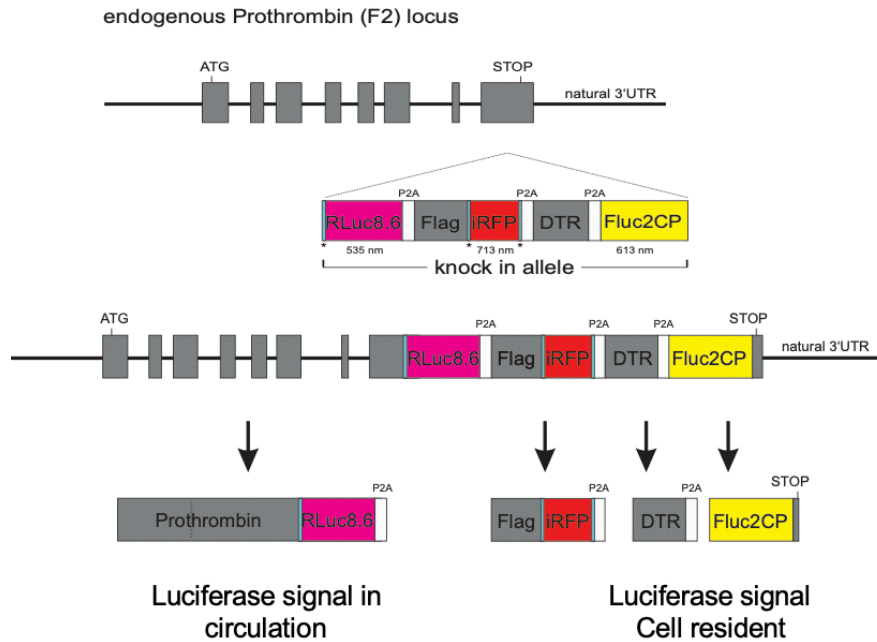
### 2.8.1 Mauslinien

<i>Name</i>	<i>Maus-Linie</i>	<i>Herkunft</i>
<i>B6</i>	C57BL/6J	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
<i>D-Insight</i>	C57BL/6 NTac-F2 <sup>tm3427</sup> (Rluc-P2A-iRFP- P2A-DTR-P2A-Fluc2CP)Arte	Danckwardt Labor

#### 2.8.1.1 Das D-Insight Mausmodell

Das neue D-Insight Mausmodell wurde im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. S. Danckwardt generiert und etabliert. Es handelt sich dabei um ein genetisch modifiziertes Mausmodell, in das ein knock-in Allel eingefügt wurde, mit dem Ziel, die Expressions- und Sekretionsdynamik von Prothrombin zu visualisieren und somit vereinfacht nachvollziehen zu können. Das Knock-In Allel wurde dazu in den endogenen Prothrombin (F2) Locus inseriert (Abbildung 10). Es besteht aus zwei Lumineszenz Reportern, dem RLuc8.6 (pink) und dem FLuc2CP (gelb), sowie einem Fluoreszenz Reporter, dem Infrarot Fluoreszenz Protein (iRFP, rot). Das endogene F2 und die entsprechenden Reporter werden hierbei in einem 1:1 Verhältnis co-exprimiert. Dies wird durch ein virales P2A "Spaltungspeptid" ermöglicht. Dieses Peptid spaltet während der Translation das multicistronische Transkriptionsprodukt (ein zusammenhängender RNA-Strang, bestehend aus der RNA des endogenen F2 sowie der RNA der entsprechenden Reporter), und führt somit zu getrennten Translationsprodukten. Auf diese Weise liegen das translatierte Prothrombin und die Reporter zu gleichen Anteilen vor. Für weitere funktionelle Untersuchungen enthält das Knock-In Allel ebenfalls ein Flag-Epitop und einen Diphtherie Toxin-Rezeptor (DTR), die gemeinsam mit Prothrombin exprimiert werden und weiteren funktionellen Analysen dienen können.

## Material und Methoden



**Abbildung 10: Schematische Darstellung des D-Insight Mausmodells**

Das transgene Mausmodell ("D-Insight") enthält zwei Lumineszenz-Reporter (RLuc8.6 & Fluc2CP) sowie einen Fluoreszenz-Reporter (iRFP), die mithilfe eines Knock-In Allels genetisch in den Prothrombin Locus eingefügt wurden. Mithilfe dieser Reporter ist es möglich, die Expressions- und Sekretionsdynamik von Prothrombin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu untersuchen. Durch Insertion von viralen co-translationalen "Spaltungspeptiden" (P2A) entsteht ein multistrukturiges Reportertranskript, bei dem das endogene F2 und die Reporter in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 exprimiert werden. Zusätzlich exprimiert das Knock-in Allel einen Flag- sowie einen Diphtherie Toxin-Rezeptor (DTR) für weitere funktionelle Untersuchungen (Danckwardt Lab, unveröffentlicht).

### 2.8.2 Zellkulturen

Es wurden überwiegend primäre Hepatozyten der Mauslinien B6 (C57BL/6J, The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA), sowie D-Insight (C57BL/6 NTac-F2<sup>tm3427(RLuc-P2A-iRFP-P2A-DTR-P2A-Fluc2CP)Arte</sup>, Danckwardt Labor) verwendet. Für die Kultivierung der primären Hepatozyten wurde ausschließlich Williams E Medium (Merck Millipore) verwendet. Dieses wurde mit hitzeinaktiviertem fetalem bovines Serum in einer Konzentration von 10% sowie Penicillin-Streptomycin mit einer Konzentration von 1% versetzt. Für die Co-Kultur Experimente wurden zusätzlich Kulturen von HeLa Zellen (HeLas) und murine embryonale Fibroblasten (MEFs) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. G. Meister) verwendet. Als Zellkulturmedium wurde für diese Zellen Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, high glucose, Biochrom) mit hitzeinaktiviertem bovines fetalem Serum in einer Konzentration von 10% sowie Penicillin-Streptomycin mit einer Konzentration von 1% eingesetzt. Im Rahmen der Zellpassage wurden die Zellen 3x mit DPBS (Gibco) gewaschen, mit Trypsin-EDTA gelöst und erneut mit DMEM kultiviert. Zellkulturen, die länger als 3 Tage inkubiert wurden, wurden täglich unter dem Mikroskop auf Vitalität und Zelldichte beurteilt und an jedem dritten Tag mit frischem Medium versehen. Die Zellen wurden im Inkubator (NuAire, IR-Autoflow) mit 5%CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert.

### 2.8.3 Pelletieren und Einfrieren von Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden zunächst 3x mit DPBS (Gibco) gewaschen, mithilfe eines Cellscrapers (Sarstedt) vom Boden der Zellkulturplatte gelöst und in einen Falcon übertragen. Dieser wurde bei 300 g 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden in Flüssigstickstoff gefroren und bei -80°C gelagert, bis die Messungen durchgeführt werden konnten.

### 2.8.4 Primäre Hepatozytenkultur

#### 2.8.4.1 Isolation primärer Hepatozyten

Für die Isolation primärer Hepatozyten wurden folgende Materialien benötigt: 2%ige Gelatine (hergestellt aus 20%iger Gelatine, s.o.), Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH), Xylazin (Rompun 2% Bayer), Heparin-Natrium (Ratiopharm), 3 Pinzetten, 2 Scheren (groß/ klein), 1 Klemme, Zellstofftücher, Vasofix V Safety 1,2 mm (Braun), Klebestreifen. 100ml Puffer I pro Maus, 1x 50ml Puffer II pro Maus und 1x 50ml Puffer III pro Genotyp und Maus (, dabei alle Puffer auf 37°C), 0,05%ige Kollagenase und 70%iges vergälltes Ethanol. Vorbereitend wurden zunächst Zellkulturplatten mit 0,05%iger Gelatine beschichtet und 24h bei 37°C inkubiert. Diese wurden anschließend mit 1x mit PBS gewaschen und bis zur Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt. Vor der Isolation werden die Puffer in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Puffer I und Puffer II werden dabei mit 150µl Kollagenase versetzt. Die Mäuse wurden mit einer Lösung aus 100mg Ketamin und 10mg Xylazin pro Kilogramm Körpergewicht der Maus intraabdominal narkotisiert sowie zur Antikoagulation mit 10 - 15µl Heparin injiziert. Anschließend erfolgte die Fixation auf einem Zellstoffbett. Ein Ausbleiben der Reflexe an den unteren Extremitäten zeigte eine ausreichende Narkosetiefe an. Nachfolgend wurde das Abdomen mit Ethanol desinfiziert und mit einer Schere eröffnet. Das Sternum wurde nach kranial mit einer Klemme fixiert, sodass eine freie Sicht auf Thorax und Abdomen erreicht wurde. Mit einem intravenösen Katheter wurde die Vena portae kanüliert und unverzüglich an eine Pumpe angeschlossen, durch die der erste Puffer (100ml PHI-Puffer I) geleitet wurde (vgl. Kapitel 2.1). Es sollte sich an der Leber ein Farbumschlag von bräunlich-rosa zu gelblich-weiß vollziehen. Unter strenger Vermeidung einer Luftblasenbildung im Pumpenschlauch wurde anschließend der Puffer II (50ml PHI-Puffer 2) angeschlossen und die Leber mit diesem weiter gespült. Letztlich wurde die Leber mit einer kleinen Schere vorsichtig herausgelöst und in eine mit ca. 25ml von insgesamt 50ml Puffer III (50ml PHI-Puffer 3) befüllten Petrischale überführt. Die weitere Verarbeitung erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank.

#### 2.8.4.2 Kultivierung primärer Hepatozyten

Für die Kultivierung waren folgende Materialien notwendig: 2 sterile Pinzetten, 1 steriler Trichter, Steriler Mull, 2 Falcons (50ml), Rest Puffer 3 (auf 37°C), Williams E + Supplements, Medium (im Wasserbad vorgewärmt auf 37°C), DPBS (ebenfalls auf 37°C), gelatinisierte Kulturplatten (mit 2%iger Gelatine, s.o., Raumtemperatur), Cellscrapper (Sarstedt), Trypanblau (Biochrom AG). Die isolierte Leber wurde unter der Sterilbank vorsichtig mit den Pinzetten in der Petrischale eröffnet. Diese wurden dann zweifach jeweils in einen Falcon filtriert, zum einen mithilfe eines Mulltuchs und eines Glastrichters, zum anderen durch einen 40 µm Cellstrainer (Corning). Dieser Falcon wurde anschließend für 3 min bei 300 g ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand der Zellen wurde verworfen, die Zellen mit DPBS gewaschen und erneut für 2 min bei 90 g ohne Bremse zentrifugiert. Sodann wurden 20 ml Williams E Medium (Merck Millipore) hinzugefügt und die Zellen unter dem Mikroskop mithilfe von dem Perforationsfarbstoff Trypanblau (20 µl, 1:1 Verhältnis zum Medium) und einer Neubauer-Zählkammer (Kammerhöhe 0,1 mm) gezählt. Auf diese Weise konnte ebenfalls die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Da Trypanblau nur in abgestorbene und perforierte Zellen eindringt, wurden nur diese dunkelblau angefärbt. Für die Zählung wurden jeweils nur helle, vitale Zellen berücksichtigt. Das einer bestimmten Anzahl an vitalen Zellen entsprechende Volumen wurde, ausgehend von der unter dem Mikroskop ermittelten Anzahl der Zellen, errechnet und in die Well-Plates verteilt. Die Wells wurden zuletzt mit Medium auf das gewünschte Volumen pro Well aufgefüllt (6-Well-Plate 2ml, 12-Well-Plate 1ml und 96 Well-Plate 200µl) und ebenfalls im Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert. Bei paralleler

## Material und Methoden

Bearbeitung einer großen Anzahl an Kulturen sollte zum Wärmeerhalt zuerst das Medium, und nachfolgend die Zellsuspension zugegeben werden.

Die Berechnung des zu applizierenden Volumens einer definierten Zellzahl wird anhand eines Beispiels einer Kultur mit gewünschten 100.000 (100k) Zellen veranschaulicht:

Mittelwert der gezählten Zellen = Anzahl vitaler Zellen aller vier Felder/ 4

Zellzahl pro  $\mu\text{l}$  = Mittelwert der gezählten Zellen x 10

Volumen der Zellsuspension pro 100.000 Zellen ( $\mu\text{l}$ ) =  $1000 \times 100 / \text{Zellzahl pro } \mu\text{l}$

### 2.8.4.3 Aufrechterhaltung der primären Hepatozytenkulturen

Die primären Hepatozyten wurden im Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C gehalten. Medium wurde bei einer Kulturdauer von mehr als 3 Tagen alle drei Tage gewechselt. Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop (Leica) beurteilt bzw. zur Dokumentation fotografiert (Leica Application Suite 4.5).

## 2.9 Aufbau und Versuchsdurchführung

### 2.9.1 Verdünnungsreihen

Für die Verdünnungsreihen wurden verschiedene Anzahlen an D-Insight Zellen sowie B6 als Kontrolle ausgesät. Hierbei sollte beurteilt werden, welche Einflüsse die Zellzahl auf die Prothrombin-Expression der Hepatozyten in Kultur innehält und wie sich das Prothrombin Expressionsverhalten im Verlauf der Zeit bis zu 24h verhält. Es wurden hierbei primäre Hepatozyten der Mauslinie D-Insight isoliert, unter dem Mikroskop mittels Trypanblau gezählt und in mit Gelatine vorbehandelten 6-Well-Plates in biologischen Triplikaten mit 50k, 100k, 200k und 400k ausgesät. Dieses Prozedere erfolgte ebenfalls mit den B6 Zellen, die in diesem Versuchsaufbau als Negativkontrolle zur Qualitätssicherung des Luciferase Assays dienten. Da sie kein Luciferase Signal zeigten, wurden sie zum Zwecke der Übersichtlichkeit im Ergebnisteil nicht mit abgebildet (vgl. Abbildung 14). Insgesamt wurde dieser Versuchsaufbau (in jeweils biologischen Triplikaten) für jede der zu messenden Zeiteinheiten (6h, 12h und 24h) ausgesät. Die Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert und jeweils nach 6h, 12h und 24h pelletiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Anschließend erfolgte die Messung der hieraus erstellten Proteinlysate mit dem Luciferase Assay.

### 2.9.2 Co-Kulturen der Hepatozyten mit HeLas bzw. MEFs

In diesem Versuchsaufbau wurden eine feststehende Anzahl an D-Insight Zellen mit unterschiedlichen Zellzahlen anderer Zelllinien in einer gemeinsamen Kultur kombiniert und das Expressionsverhalten von Prothrombin der D-Insight Zellen gemessen. Mithilfe dieses Versuchsaufbaus sollte die Einwirkung verschiedener Umweltbedingungen, bzw. der Einfluss organfremder Zellen auf die Prothrombin-Expression beurteilt werden, mit dem Hintergrund, dass neben exprimierten Substanzen auch direkte Zell-Zell-Interaktionen einen Einfluss auf die Prothrombin Expression haben könnten. Bei den ausgesäten Zelllinien handelte es sich einerseits um primäre Hepatozyten der B6 Mauslinie, die am Tag der Durchführung der Experimente isoliert wurden, andererseits um Zellen der Zelllinien HeLa und MEF. HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, MEF-Zellen sind murine embryonale Fibroblasten. Vor Einsatz in den Experimenten wurden die HeLas und MEF Zellen jeweils nach dem Auftauen drei Mal passagiert (an jedem dritten Tag nach dem Auftauen bzw. bei 70%iger

## Material und Methoden

Konfluenz). Für den Einsatz in den Experimenten wurde eine 80%- bis 95%-ige Konfluenz erzielt, um eine ausreichende Anzahl an Zellen zu erhalten. Anschließend wurden in jedes Well 50k frisch isolierte primäre D-Insight Zellen, und eine mit 50k, 100k, 200k und 400k aufsteigende Anzahl an Zellen der B6 bzw. HeLas bzw. MEFs ausgesät. Es wurden für jedes Co-Kultur Experiment jeweils 3 Wells pro Zellzahl (biologische Triplikate) im 6-Well-Plate Format ausgesät. Die Zellen wurden im Inkubator bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert, nach 24h pelletiert und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Messung des FLuc und RLuc Signals erfolgte mit dem Luciferase Assay in technischen Triplikaten (vgl. Kapitel 2.6).

### 2.9.3 Methoden- und Modelloptimierung

Für die Sicherstellung einer optimalen Methodik für das nachfolgende Compound Screening Modell wurden Untersuchungen durchgeführt, durch die das Compound Screening möglichst effizient und unter optimalen Kulturbedingungen erfolgen konnte.

#### 2.9.3.1 Ermittlung einer optimalen Zellzahl

Zur Ermittlung einer optimalen Arbeitszellzahl für das Compound Screening wurde zunächst die oben ermittelte Zahl von 200k Zellen, bei der die Hepatozyten unter mikroskopischer Beurteilung auf der Fläche eines Wells einer 6-Well-Plate optimal konfluieren (9,6 cm<sup>2</sup>), für die Fläche einer 96-Well-Plate berechnet (0,32 cm<sup>2</sup>). Es ergibt sich dabei eine Zellzahl von 6,6k. Es sollte zunächst ermittelt werden, ob die Aussaat von Zellen in dieser Größenordnung in einer 96-Well Plate ein adäquates Signal ergibt. Hierzu wurden zunächst D-Insight und B6 Zellen isoliert und in den Zellzahlen 2,5k, 5k und 10k, jeweils in Triplikaten, ausgesät. Auch hier diente B6 als Kontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 24h erfolgte die Messung im Luminometer.

#### 2.9.3.2 Untersuchung verschiedener Luciferase-Substrate

Zudem erfolgte der Vergleich verschiedener Luciferase-Substrate, sodass eine adäquate Qualität der gemessenen Signale bei möglichst geringen durch das Substrat bedingten Standardabweichungen erfolgt. Hierzu erfolgte die Isolation von D-Insight Zellen sowie B6 Zellen als Kontrolle. Es folgte die Aussaat von 5k Zellen (jeweils 8 Wells) und eine Inkubation von 24h. Anschließend wurden die Signale der Zellen (je 8 Wells für B6 bzw. D-Insight) mit Bright Glo (Promega) bzw. Beetle Juice (PJK Biotech) im Luminometer gemessen.

### 2.9.4 Compound Screening

Im Compound Screening erfolgte die Inkubation der primären Hepatozytenkulturen auf Basis der D-Insight Mauslinie mit verschiedenen potentiell modulierenden Substanzen auf die F2 Genexpression. Hierfür wurde das zuvor im 6-Well-Format etablierte Modell der primären Hepatozytenkulturen auf ein 96-Well Format komprimiert. Es erfolgten hierzu weitergehende Untersuchungen zur Etablierung eines optimalen Signals, wie das Austesten der Reproduzierbarkeit von Signalen zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie der optimalen Zellkulturzahl (nicht abgebildet).

Im Rahmen des Compound Screenings wurden verschiedene Substanzen getestet, die potentiell eine Auswirkung auf das Genexpressionsverhalten von Prothrombin haben könnten. Die Etablierung des primären Hepatozytenmodells wurde für dieses weitergehende Screening im Hochdurchsatzverfahren weiter optimiert und auf ein 96-Well-Format komprimiert. Dies erlaubte die Untersuchung der Prothrombin-Genexpression für eine Vielzahl an potentiell

## Material und Methoden

genregulierenden Substanzen, die auf einer hypothetischen Grundlage ausgewählt wurden. Für das Screening wurden D-Insight Zellen isoliert und mit 5k Zellen pro Well in sterile, weiße 96-Well-Plates (Thermo Scientific) ausgesät, pro Well wurden insgesamt 200µl Medium (Williams E) verwendet. Parallel erfolgte auch ein Aussäen in eine transparente 96-Well-Plate zur mikroskopischen Beurteilung. Die Zellen wurden zunächst 24h lang bei 37°C in inkubiert. Die zu testenden Substanzen wurden vorbereitend in verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Lösungsmittels vorbereitet und in eine weitere 96-Well Plate (BioRad) verteilt. Hier wurden die Substanzlösungen so ausgearbeitet, dass mit jeweils 2 µl dieser Lösung letztlich in den Zellkulturen die Konzentrationen der untenstehenden Tabelle erreicht wurden. Dabei wurden je drei Wells mit derselben Substanz und Konzentration behandelt (technische Triplikate), jeweils pro Lösungsmittel wurden zudem als Kontrolle Triplikate der Zellkultur-Wells lediglich mit 2 µl Lösungsmittel inkubiert. Die Übertragung der Substanzlösungen in die Zellkulturen erfolgte zeitökonomisch mithilfe einer Multikanal Pipette. Die Messung erfolgte nach Entfernung des Mediums mithilfe einer Multikanal-Pipette per Fluc Aktivitätsassay im Luminometer. Hierbei erfolgte zur internen technischen Kontrolle in drei weiteren Wells die Applikation eines verdünnten Leberlysates (extrahiertes Lebergewebe) in den Verdünnungen 1:10, 1:100 sowie 1:1000 (vgl. Kapitel 2.5.1.2). Die statistischen Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 6 auf der Grundlage von Mittelwerten dreier technischer Replikate von drei unabhängigen biologischen Experimenten durchgeführt. Die Normalisierung erfolgte hierbei jeweils auf die Wells, die lediglich mit den Lösungsmitteln der Substanzen behandelt wurden.

<b>Substanz/Enzyme</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Lösungsmittel</b>
<b>Recombinant murine Thrombin (mrecFIIa)</b>	1nM, 5nM, 10nM	Sigma Aldrich®	PBS
<b>Argatroban</b>	0,1µg/ml, 1µg/ml, 5µg/ml	Sigma-Aldrich®	Natriumchlorid (NaCl)
<b>MMP-1(Matrix-Metalloproteinase)</b>	0,1 µg/ml	AnaSpec®	H <sub>2</sub> O + 0,1% Bovines Serumalbumin (BSA)
<b>Phenprocoumon(Vitamin K-Antagonist)</b>	0,5 mg/ml	Sigma Aldrich®	1:100 verdünntes Methanol

### 3 Ergebnisse

Für die Lebensfähigkeit, Funktionalität und Integrität eines Organismus spielen sowohl die Aufrechterhaltung einer exakten Koordination der Proteinbiosynthese als auch der Transport des synthetisierten Proteins an die entsprechenden Ziel- und Wirkorte eine entscheidende Rolle. Klinisch betrachtet bestehen eine ganze Reihe an teilweise schweren Krankheitsbildern, die infolge einer Dysregulation der Prothrombin Produktion resultieren und so die Bedeutsamkeit einer adäquat regulierten Proteinhomöostase verdeutlichen (vgl. Kapitel 1.6). Die einer physiologisch präzise regulierten Proteinhomöostase zugrunde liegenden Mechanismen der Genexpression des F2 sind jedoch noch nicht ausreichend verstanden. In dieser Arbeit soll daher ein Modell etabliert werden, das mittels Lumineszenz-Reportern ermöglicht, Einflussfaktoren und potentielle Regulatoren der F2 Genexpression in großem Umfang zu untersuchen. Auf diese Weise sollen erste Erkenntnisse regulierender Einflüsse auf die F2 Expression und Prothrombin Sekretion untersucht und potentielle, auf einer hypothetischen Grundlage basierende, vielversprechende Substanzen mittels direkter Applikation und Inkubation eingehender analysiert werden. Letztlich soll auf Basis dieser Ergebnisse ein mögliches Modell zugrundeliegender Mechanismen der F2 Genexpressionsregulation vorgestellt werden.

#### 3.1 Etablierung der Zellkulturen und Evaluierung des Luciferase Assays

In dieser Arbeit wurde zunächst ein primäres Hepatozytenmodell mittels der Reportermauslinie „D-Insight“ etabliert, mithilfe dessen potentielle Stimulantien der F2 Expression und eine potentielle Autoregulation durch Prothrombin und Thrombin untersucht wurden. Dazu wurde die genetisch modifizierte Mauslinie D-Insight verwendet, die in der Arbeitsgruppe von Prof. S. Danckwardt an der Universitätsmedizin Mainz generiert und etabliert wurde. Diese Mauslinie ermöglicht es, die Expressions- und Sekretionsdynamik von Prothrombin u.a. mithilfe von an die Prothrombin-Genexpression gekoppelt exprimierten Reportern nachzuverfolgen (siehe Kapitel 2.8.1.1 und Abbildung 10). Auf diese Weise können die gemessenen Reportersignale direkt Rückschlüsse auf das Verhalten der Prothrombin Expression bzw. Sekretion geben.

Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden in erster Linie die beiden Lumineszenz Reporter Firefly Luciferase (FLuc2CP/ gelb) und Renilla Luciferase (RLuc8.6/ pink) herangezogen (siehe Abbildung 10). Die Firefly Luciferase (auch kurz FLuc) repräsentiert durch seine Zellresidenz die Expression des in der Zelle verweilenden Prothrombins, während die Renilla Luciferase (auch kurz RLuc) gemeinsam mit Prothrombin mithilfe eines Proteintransporters über den sekretorischen Weg („secretory pathway“) aus der Zelle ins Blutplasma gelangt und damit vorrangig die Sekretion des Prothrombins widerspiegelt. Da die Genexpression, Biosynthese und Proteinsekretion auf zellulärer Ebene in Hepatozyten stattfindet, wurden zunächst sowohl auf Basis dieses transgenen Mausmodells, als auch auf Basis einer B6 Mauslinie als Kontrolle, primäre Hepatozytenkulturen generiert. Hierzu wurde ein Standardprotokoll herangezogen, das zuvor erfolgreich in der Arbeitsgruppe von Prof. Danckwardt etabliert wurde (vgl. Kapitel 2.8.4.1 und Abbildung 11A).

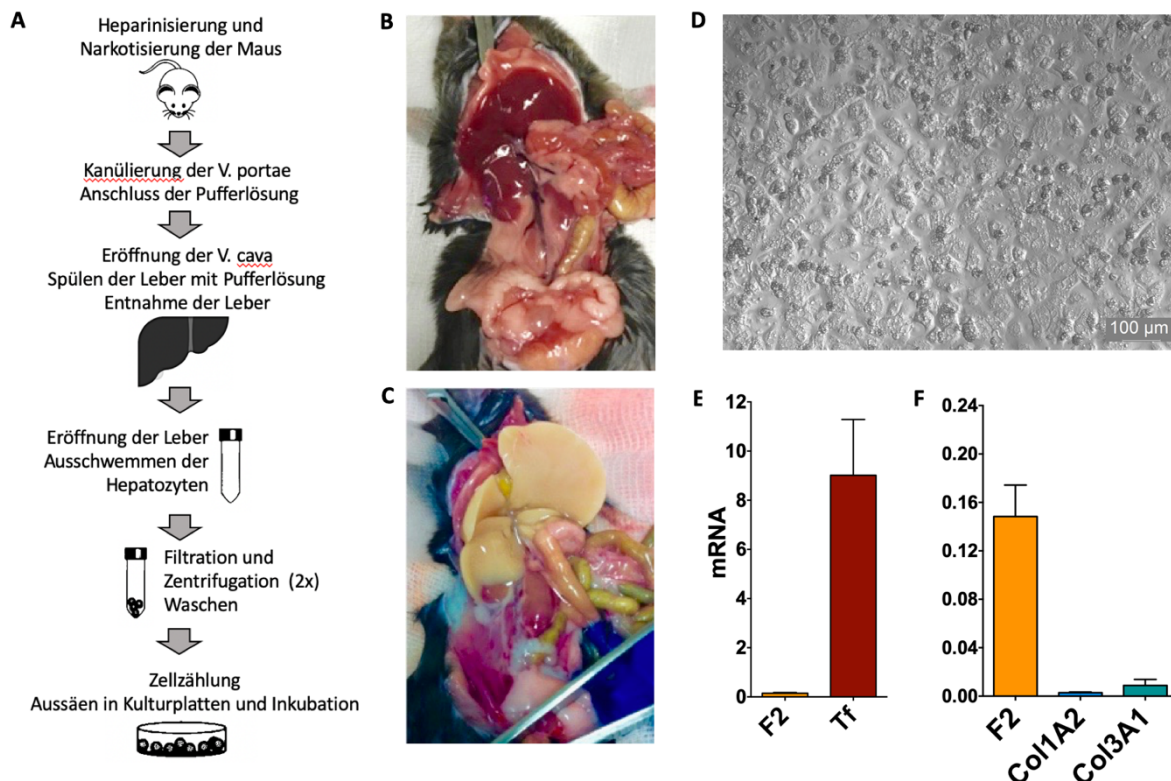
Im Rahmen dieses Protokolls erfolgte nach Heparinisierung und Narkotisierung der Maus die Eröffnung des Abdomens und die Kanülierung der V. portae mithilfe eines Venenzuganges (Braun). Die Pufferlösungen I und II wurden an den Venenzugang angeschlossen und die Leber unter Eröffnung der Vena cava durchspült. Die in den Puffern enthaltene Kollagenase führte hierbei zu einer Auflösung des Kollagengerüsts, in das die Hepatozyten innerhalb des Organs verankert sind. Es erfolgte bei diesem Vorgang ein Farbumschlag des Gewebes von rosa-grünlich zu gelb-weißlich (vgl. Abbildung 11B und C). Die Leber wurde entnommen und unter sterilen Bedingungen in Puffer III vorsichtig eröffnet. Hierbei wurden die freigesetzten Zellen in die Pufferlösung ausgeschwemmt. Die Lösung wurde nachfolgend zweimalig filtriert,



## Ergebnisse

sodann zweimalig zentrifugiert und hierunter mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen. Nach der zweiten Zentrifugation wurden die Zellen mit vorgewärmtem Williams E Medium benetzt. Anschließend erfolgte eine Färbung von 20µl der Hepatozyten in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau. Hiermit konnte zunächst die Vitalität der Zellen beurteilt werden. Sodann erfolgte eine Zellzählung der Zellen unter dem Mikroskop mittels einer Neubauer-Zählkammer, wobei die Vitalität der Hepatozyten beurteilt wurde und nur die vitalen Zellen zur Zählung berücksichtigt wurden. Das für eine bestimmte Zellzahl gewünschte Volumen wurde errechnet und auf mit 2%iger Gelatine beschichteten vorgewärmten Well-Plates verteilt. Die Wells wurden mit Williams E-Medium bis zum gewünschten Medium-Volumen angereichert und bei 37°C mit 5%igem CO<sub>2</sub> inkubiert.

Der Nachweis hepatozytärer Zellen der isolierten Kulturen erfolgte durch qRT-PCRs mit dem Hepatozytenmarker Transferrin (Tf) und Prothrombin (F2), die jeweils auf das Housekeeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert wurden (siehe Abbildung 11E). Daneben wurden zufriedenstellende Zellkulturkonditionen bezüglich der Reinheit der Zellen durch qRT-PCRs der fibrotischen Marker Kollagen 1A2 (Col1A2) und Kollagen 3A1 (Col3A1) nachgewiesen. In der Arbeitsgruppe wurden hierzu zuvor Gene-Arrays analysiert (nicht abgebildet), in der sich die in Abbildung 11E und F präsentierten Gene für Hepatozyten und Fibroblasten am repräsentativsten darstellten. Im Vergleich zu Thrombin ist die in der Kultur vorliegende Menge an Col1A2 und Col3A1 mRNA gering, sodass eine maßgebliche Verunreinigung durch Fibrozyten ausgeschlossen werden kann (siehe Abbildung 11F). Zusätzlich erfolgten regelmäßige mikroskopische Kontrollen, u.a. mit fotografischer Dokumentation (siehe Abbildung 11D).



**Abbildung 11: Isolierung der Hepatozyten und Etablierung der Zellkultivierung**

Die Isolierung der Hepatozyten erfolgte nach einem Standardprotokoll, mit dem aus B6 und D-Insight Mauslinien erfolgreich primäre Hepatozytenkulturen etabliert werden konnten. (A) Standardprotokoll der Hepatozytenisolierung, Abbildung modifiziert nach Salem et al. (207). (B) Maussitus mit Darstellung der Leber, der V. portae und der V. cava vor Kanülierung. (C) Maussitus nach Durchspülen der Leber mit Pufferlösung durch die V. portae. (D) Darstellung primärer Hepatozyten in Kultur. (E) Die Expression des Transferrins als Hepatozytenmarker (Tf) als auch des vorwiegend leberspezifischen F2 weisen das Vorliegen von Hepatozyten in der Zellkultur nach. (F) Das geringe Vorliegen an fibrotischen Markern (Col1A2 und Col3A1) im Vergleich zu F2 bestätigt die Reinheit der Hepatozytenkultur.

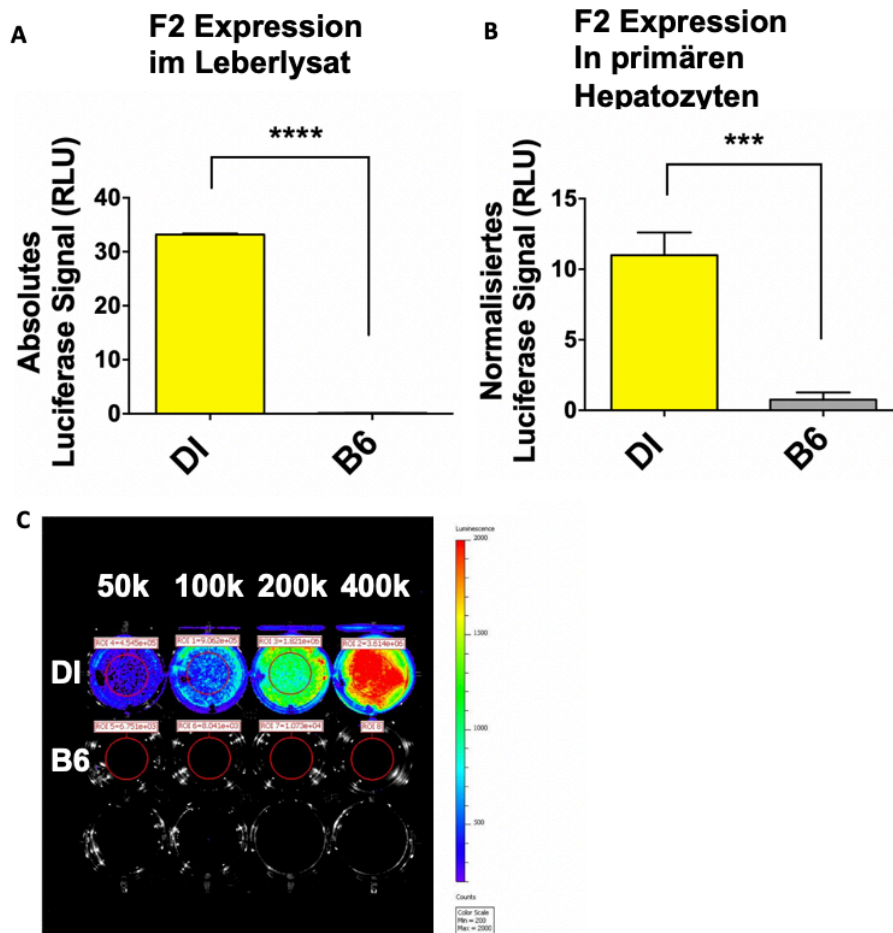
## Ergebnisse

Die nachfolgend durchgeführten FLuc Aktivitätsassays spiegeln die F2 Expression anhand des FLuc getaggtten zellresidenten Prothrombin in Lebergewebe bzw. an primären Hepatozyten in Zellkultur wieder. Die Funktionalität des D-Insight Mausmodells im FLuc Aktivitätsassay wurde zunächst mit Lysaten aus extrahiertem Lebergewebe der D-Insight Mäuse (komplementär zu nachfolgenden Messungen lysierter Hepatozytenkulturen) evaluiert. Dieses Vorgehen stellt die F2 Expression der Hepatozyten unter physiologischen Bedingungen (im Kontrast zu Zellkulturbedingungen) dar, da hier das entnommene Lebergewebe direkt gefroren, lysiert und gemessen wurde. Es konnte eine spezifische FLuc Aktivität, gemessen in relativen Lichteinheiten (RLU) der D-Insight Leberlysate im Vergleich zu B6 Leberlysaten dargestellt werden (siehe Abbildung 12A). Die Anwendbarkeit des Assays kann somit unter Verwendung von Leberlysaten zur Messung der F2 Expression bestätigt werden.

Um die Funktionalität des Assays auch unter Zellkulturbedingungen zu nachzuweisen, wurden nach erfolgreicher Etablierung primärer Zellkulturen mit Hepatozyten aus der D-Insight Mauslinie Lysate aus diesen Zellkulturen erstellt und das FLuc Signal im Aktivitätsassay gemessen. Das gemessene absolute Firefly Luciferase Signal wurde nach Proteinkonzentrationsmessung (vgl. Kapitel 2.5.1.3) zusätzlich auf die Proteinmasse der Kultur normalisiert, um eine relative FLuc Aktivität zu erhalten, welches eine Vergleichbarkeit mit den FLuc Signalen künftiger Untersuchungen jeweils abhängig von der Proteinkonzentration in Kultur gewährleistet. Dieses Vorgehen beugt auch einer verfälschten Quantifikation der F2 Expression und Prothrombin Sekretion in Zellkulturen vor, in denen definierte Zellzahlen ausgesät werden sollen. Auch bei den primären Hepatozytenkulturen war eine deutliche proteinnormalisierte FLuc Aktivität (normalisiertes Luciferase Signal) im Vergleich zu B6 nachweisbar (siehe Abbildung 12B). Dies bestätigt die Funktionalität des FLuc Aktivitätsassays mit der D-Insight Mauslinie auch unter Zellkulturbedingungen.

Bei Messung verschiedener Zellzahlen von D-Insight Zellen konnte zudem im IVIS Spectrometer eine ansteigende absolute Signalintensität und damit eine hohe Sensitivität der Signalstärke des FLuc Reporters dargestellt werden. Dies unterstreicht die Anwendbarkeit der D-Insight Mauslinie zur präzisen Detektion und Nachverfolgung der F2 Expression.

## Ergebnisse



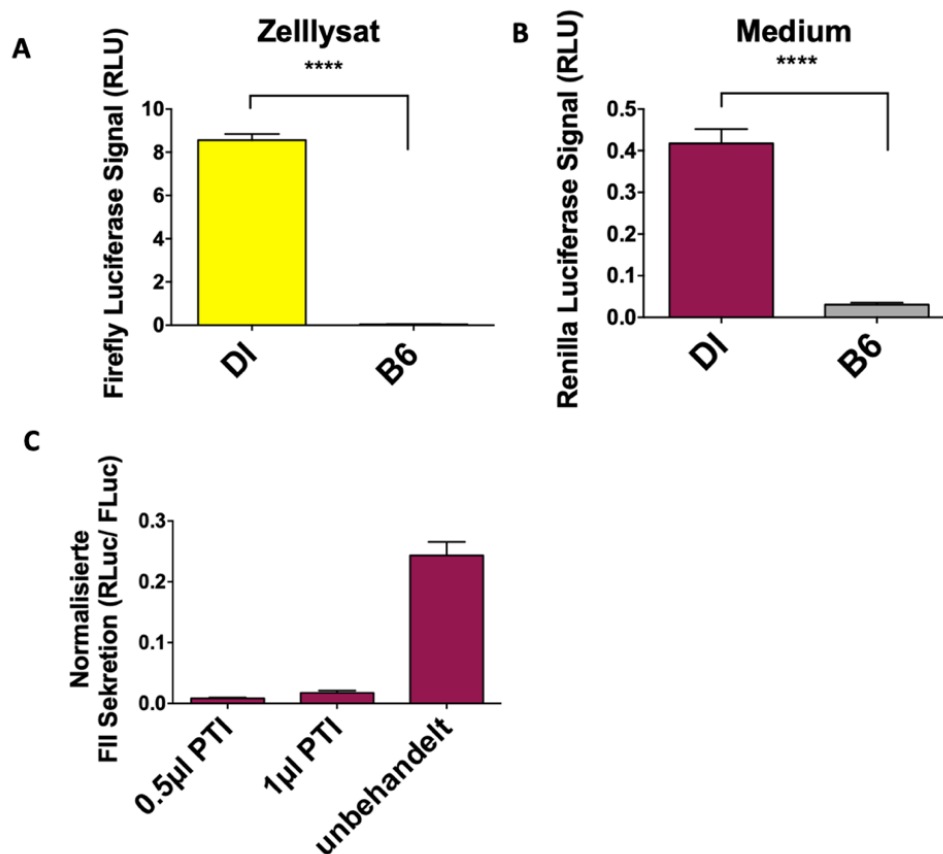
### Abbildung 12: Validierung der Funktionalität des D-Insight-Zellkultursystems

Firefly Luciferase (FLuc) Aktivitätsassays mit Lysaten von D-Insight Lebergewebe bzw. von primären Leberzellkulturen zeigen eine spezifische FLuc Aktivität im Vergleich zur B6-Kontrolle. (A) Das hohe FLuc Signal im Aktivitätsassay eines Leberlysatates der D-Insight Mauslinie im Vergleich zu B6 repräsentiert die F2 Expression in der Leber unter physiologischen Bedingungen (Zweistichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%). (B) Der FLuc Aktivitätsassay mit einem signifikant höheren Signal der primären Hepatozyten einer D-Insight Maus im Vergleich zur B6-Kontrolle bestätigt die Funktionalität des Reporterzellsystems, gewonnen aus D-Insight Tieren (siehe Abb. 2), unter Zellkulturbedingungen (Zweistichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%). (C) Die Detektierbarkeit des FLuc Signals im IVIS Spectrometer über einen weiten Bereich deutet auf eine hohe Sensitivität des Reportersystems hin, die zur differenzierten Nachverfolgung der F2 Expression notwendig ist.

Das D-Insight Mausmodell beinhaltet neben der mit F2 co-exprimierten zellresidenten Firefly Luciferase auch eine Renilla Luciferase, die als Fusionsprotein direkt an das Prothrombin gekoppelt ist und mit ihm zusammen aus der Zelle sezerniert wird. Der gemessene RLuc Reporter spiegelt somit das sezernierte Prothrombin-Protein wieder und kann dementsprechend auch im Zellkulturmedium gemessen werden. Für die Untersuchung der ins Zellkulturmedium sezernierten Menge Prothrombins wurde im nächsten Schritt parallel zur FLuc Aktivitätsmessung (Abbildung 13A) ein RLuc Aktivitätsassay jeweils aus dem Zelllysat (FLuc) und aus dem Kulturmedium (RLuc) einer primären Hepatozytenkultur durchgeführt (siehe Abbildung 13B). Beide Assays wurden auf die Detektierbarkeit ihrer Signale im Vergleich zur B6 Kontrolle evaluiert. Hier zeigte sich erneut eine deutliche FLuc Aktivität der Zelllysate und ebenso eine signifikante RLuc Aktivität im Medium im Vergleich zu B6. Die Untersuchung der Spezifität dieses RLuc Signals erfolgte in Kollaboration mit Kollegen in der Arbeitsgruppe, hier wurde mithilfe der Proteintransport Inhibitoren (PTI) Monensin und Brefeldin A der sekretorische Weg des Prothrombins blockiert, sodass die Sekretion des Prothrombins in das Medium blockiert wurde. Bei den mit PTI behandelten Zellen zeigte sich daraufhin im RLuc Aktivitätsassay ein im Vergleich zu unbehandelten Zellen signifikant

## Ergebnisse

reduziertes Signal, sodass von einer spezifischen Detektion des in das Medium sezernierten Prothrombin ausgegangen werden kann.



**Abbildung 13: Detektion der F2 Expression und Prothrombin Sekretion**

(A, B) Sowohl der Fluc Assay aus Lysaten primärer Hepatozytenkulturen als auch der RLuc Assay aus dem Zellkulturmedium zeigen ein signifikant höheres Signal (RLU) im Vergleich zu B6. Dies spiegelt sowohl eine F2 Expression (FLuc) in den Hepatozyten wider, als auch eine Sekretion (RLuc) des Prothrombins in das Zellkulturmedium (Zweistichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%). (C) Das im D-Insight Modell an das Prothrombin gekoppelte RLuc kann mithilfe eines Proteintransporters sezerniert und folglich im Medium gemessen werden. Zur Beurteilung der Spezifität des gemessenen Signals im RLuc Assay wurden Proteintransport-Inhibitoren (PTI), hier Brefeldin A und Monensin, eingesetzt, die die Sekretion des Prothrombins ins Medium inhibieren. Es zeigte sich ein stark reduziertes RLuc Signal bei den mit PTI behandelten Zellen. Dies bestätigt die Funktionalität und Spezifität des RLuc Assays. Die Abbildung C wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Shazad Khokar, AG Danckwardt, Universitätsmedizin Mainz.

### 3.2 Analyse möglicher Regulationsmechanismen der F2 Expression

Zur Einschätzung und Beurteilung der F2 Expression und der Prothrombin Konzentrationen im Medium unter experimentellen Bedingungen wurden diese zunächst unter verschiedenen Zellkulturbedingungen untersucht. Hierbei wurden primäre D-Insight Hepatozyten sowohl in reinen Hepatozytenkulturen als auch in Co-Kulturen mit nicht-hepatozytären Zellen analysiert. Hypothetisch mögliche Einflussfaktoren auf die Regulation der Prothrombin Expression und der Sekretion sind neben der Zeitdauer der Kultivierung auch veränderte Umgebungsbedingungen wie etwa die Zellzahl der Hepatozyten in Kultur oder die Einflüsse der nicht-hepatozytären Zellen (homo- vs. heterozelluläre Interaktionen) in einer gemeinsamen Kultur mit D-Insight Zellen. Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen

## Ergebnisse

könnten potentiell direkte interzelluläre Interaktionen (Zell-Zell-Interaktionen) oder indirekt Auswirkungen von Substanzen sein, die durch die Zellen ins Medium sezerniert wurden.

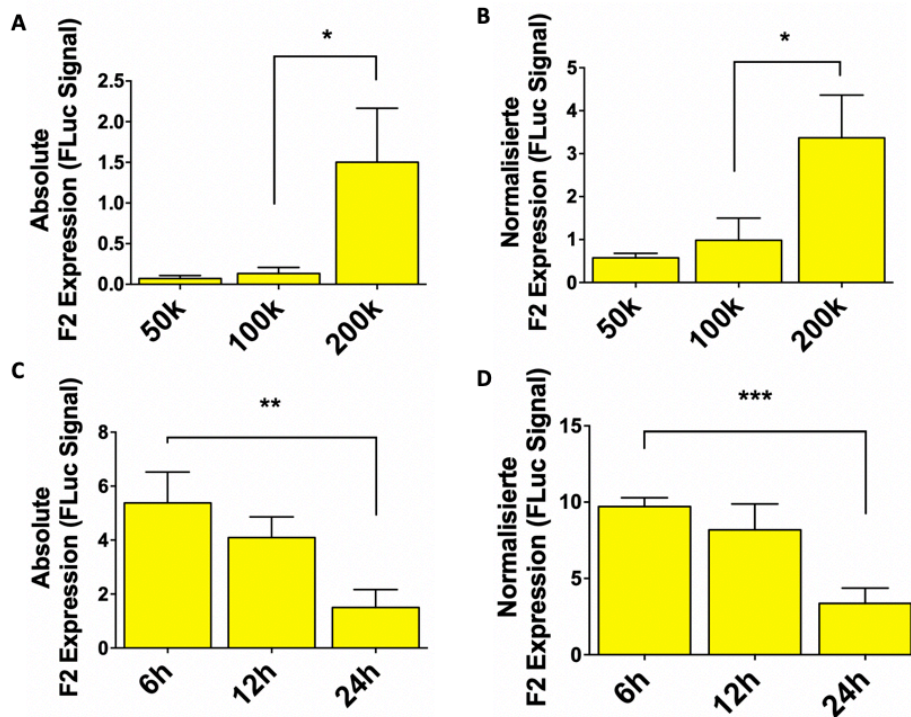
### 3.2.1 Verschiedene Inkubations- und Zellkulturbedingungen

Zunächst wurde die F2 Expression der Zellen in reinen Hepatozytenkulturen bei verschiedenen Zellzahlen und verschiedenen Inkubationsdauern untersucht (homotypische Interaktionen), um potentielle Einflussfaktoren auf die F2 Expression zu evaluieren.

Die Kulturen wurden hierbei zu Zellzahlen von 50.000 (500k), 100.000 (100k) und 200.000 (200k) Zellen in 6-Well Plates ausgesät und jeweils 6 Stunden (h), 12h und 24h inkubiert. Dasselbe Prozedere erfolgte ebenso für B6 Zellen, die als Kontrolle dienten und kein Signal zeigten. Im Sinne der Übersichtlichkeit wurden Sie nicht abgebildet. Bei einer Zellzahl von 200k pro Well zeigte sich hierbei ein signifikant höheres Signal als bei 100k oder 50k Hepatozyten pro Well bei 24h. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl absolut (Abbildung 14A) als auch relativ auf die Proteinkonzentration normalisiert (Abbildung 14B). Das ebenfalls höhere Signal nach Normalisierung auf die Proteinmasse legt nahe, dass die Signalsteigerung nicht lediglich durch die vermehrte Zellzahl zustande kommt, sondern relativ zur Proteinmasse (stellvertretend für die Zellzahl) tatsächlich erhöht ist. Bemerkenswert ist dabei, dass das Signal auch nach Normalisierung mit der Proteinmasse nicht linear zunimmt, sondern bei einer Verdopplung der Zellzahl (vgl. Abbildung 14B, 100k und 200k) mindestens eine Verdreifachung des Signals gezeigt werden kann. Es kann also angenommen werden, dass die Zellzahl bzw. die Zellkonfluenz eine regulatorische Wirkung auf die F2 Expression hat.

Wurde die F2 Expression über die Zeit bei einer definierten Zellzahl von 200k untersucht, so zeigte sich, dass sich die F2 Expression im Verlauf der Zeit reduzierte. Die F2 Expression war nach 24h deutlich schwächer im Vergleich zur Expression bei 6h. Dieses Muster zeigte sich sowohl bei Betrachtung der absoluten, als auch des proteinnormalisierten FLuc Signals (vgl. Abbildung 14C und D). Abschließend lässt sich festhalten, dass die Regulation der F2 Expression sowohl abhängig von der Konfluenz der Zellen in der Kultur ist als auch von der Zeitdauer der Inkubation.

## Ergebnisse



**Abbildung 14: F2 Expression unter variierenden Zellkulturbedingungen**

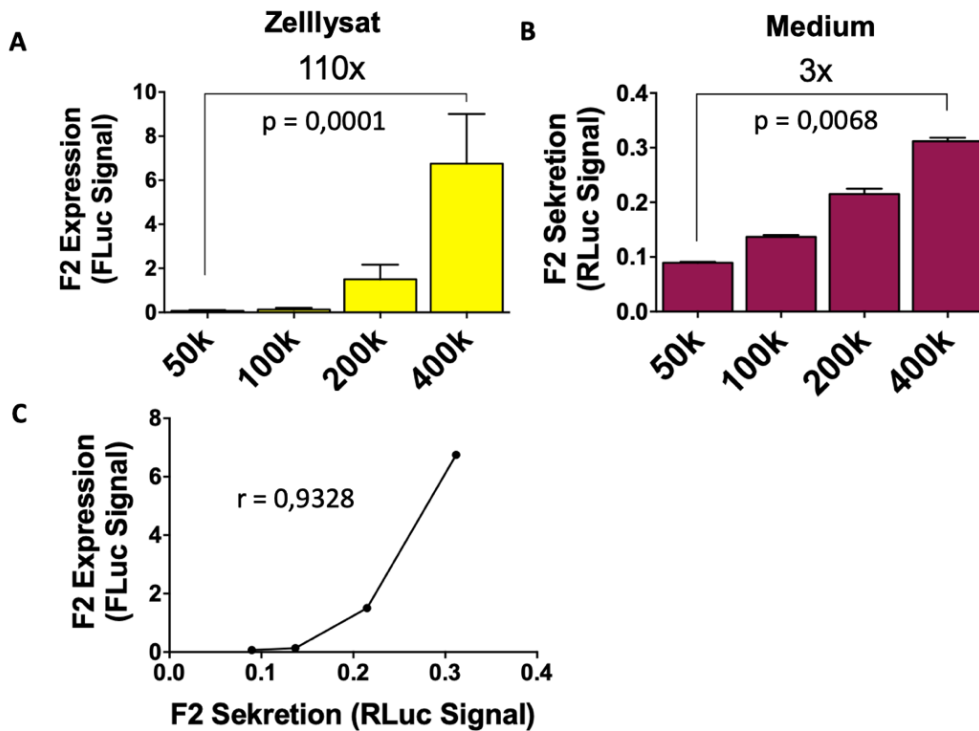
Das Vorliegen einer Regulation der F2 Expression wird durch eine Veränderung der F2 Expression bei verschiedenen Zellkultur- bzw. Inkubationsbedingungen dargestellt (jeweils Zweistichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%). Eine steigende Zellzahl bzw. eine stärkere Zellkonfluenz führt zu einer vermehrten F2 Expression sowohl absolut (A) als auch pro Zelle, dargestellt durch Proteinnormalisierung (B). Bei längerer Inkubationsdauer sinkt die F2 Expression sowohl absolut (C) als auch pro Zelle / proteinnormalisiert (D). Dies führt zu der Annahme, dass Regulationsmechanismen vorliegen, die Einfluss auf die F2 Expression der Hepatozyten bei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen nehmen.

Die F2 Expression scheint somit durch Regulationsmechanismen starken Schwankungen zu unterliegen. Letztlich ist in einem lebendigen Organismus jedoch die adäquate Einstellung der Plasmakonzentration ausschlaggebend. Als nächstes stellte sich daher die Frage, wie sich die Prothrombin Konzentration im Zellkulturmedium im Verhältnis zur F2 Expression verhält.

### 3.2.2 Korrelation der Expression und Konzentration im Medium

Zur Evaluierung der Prothrombinspiegel im Zellkulturmedium der Hepatozyten in Abhängigkeit von der F2 Expression wurden D-Insight Hepatozyten in verschiedenen Zellzahlen in 6-Well-Plates kultiviert (50k, 200k, 200k und 400k). FLuc und RLuc wurden nach 24h detektiert. Das FLuc Signal zeigte dabei ein 110x ( $p = 0,0001$ ) höheres Signal bei 400k Zellen im Vergleich zum Signal bei 50k D-Insight Zellen (Abbildung 15A). Dieser starke Anstieg des FLuc Signals mit der Zellzahl deutet ebenfalls auf das Vorliegen eines Regulationsmechanismus bezüglich der F2 Expression hin. Das RLuc Signal aus dem Medium der Zellen dagegen stieg über dieselbe Erhöhung der Zellzahl mit einem Pearson-Korrelationseffizient von 0,9328 positiv korrelierend (Abbildung 15C) an. Hierbei erfolgte der Anstieg jedoch nur um das 3-fache ( $p = 0,0068$ ) und fiel damit um einiges geringer aus als der Anstieg des FLuc Signals (Abbildung 15B). Es konnte also nachgewiesen werden, dass die im Medium gemessenen Prothrombinspiegel mit der F2 Expression korrelieren.

## Ergebnisse



### Abbildung 15: Korrelation der Prothrombinspiegel im Kulturmedium mit der F2 Expression

Vergleich zwischen F2 Expression und Prothrombin Sekretion, nicht (protein-)normalisiert (jeweils Zweistichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%) (A, B) Bei einer ansteigenden Zellzahl von 50k bis 400k Zellen steigt die F2 Expression um einen Faktor von 110, während die Prothrombin Konzentration im Medium ebenfalls, jedoch geringer, um den Faktor 3 ansteigt. (C) Insgesamt zeigt sich der Trend einer positiven Korrelation zwischen Prothrombin Sekretion und F2 Expression bei ansteigender Zellzahl (Pearson Korrelationskoeffizient  $r = 0,9328$ ,  $p = 0,0672$ , zweiseitige Prüfstatistik).

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass die Prothrombinspiegel im Medium durch eine Veränderung der Genexpression potentiell korrelierend reguliert werden. Abhängig von der Zellzahl scheinen sich in Kultur dabei verschiedene Level der Prothrombin Konzentration einzustellen. Bisher konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die F2 Expression über einen längeren Inkubationszeitraum sinkt. Ergänzend hierzu soll im Folgenden die Einstellung der Prothrombinspiegel im Medium unter verschiedenen Zellkulturbedingungen genauer untersucht werden.

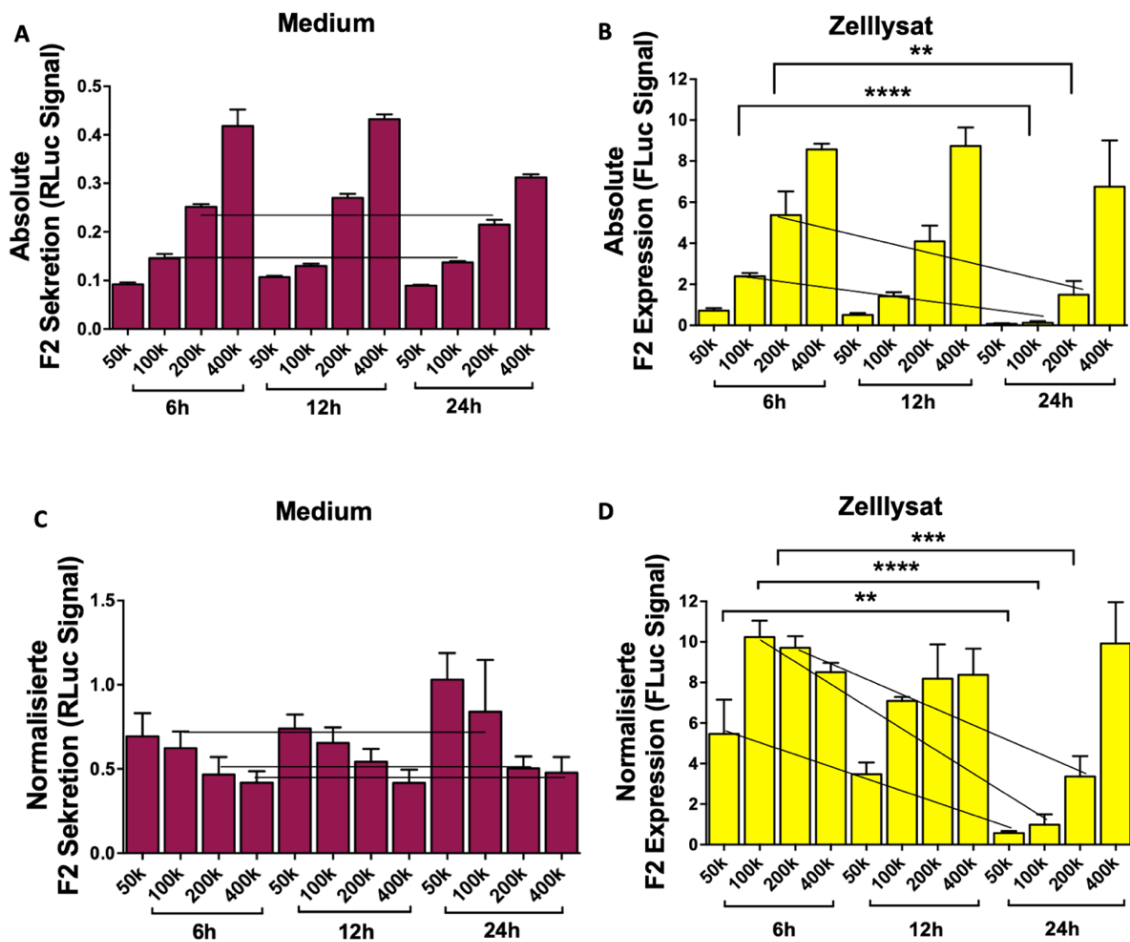
### 3.2.3 Einstellung konstanter Prothrombinspiegel im Medium

Um die Einstellung der Prothrombinspiegel im Medium unter verschiedenen Zellkulturbedingungen genauer analysieren zu können, erfolgte der Versuchsaufbau analog zu den oben beschriebenen Untersuchungen (B6 nicht dargestellt). Die Hepatozytenkulturen umfassten hier verschiedene Zellzahlen (50k, 100k, 200k, 400k) und jeweils unterschiedlich lange Inkubationszeiten (6h, 12h und 24h). Es wurden jeweils die Zelllysate mittels des FLuc Aktivitätsassays, als auch das RLuc Signal im Kulturmedium gemessen. Dargestellt sind zudem die absoluten Signale (Abbildung 16A und B), als auch die proteinnormalisierten Werte (vgl. Kapitel 2.5.1.3) zur besseren Vergleichbarkeit (Abbildung 16C und D). Untersucht man die FLuc und RLuc Signale über verschiedene Inkubationszeiten, so zeigt sich, dass die F2 Expression und die Konzentration von Prothrombin im Medium unterschiedlichen Trends folgen.

Das absolute RLuc Signal im Medium zeigt bei gleicher Zellzahl konstante Prothrombinspiegel im Medium, während die absolute FLuc Aktivität über die Zeit signifikant sinkt (Abbildung 16,

## Ergebnisse

vgl. A und B). Dieses Muster lässt sich in ähnlicher Ausprägung bei verschiedenen Zellzahlen nachweisen (vgl. Abbildung 16A und B, 100k (6h vs. 24h,  $p < 0,00001$ ) sowie 200k (6h vs. 24h,  $p = 0,0072$ )). Interessanterweise bleibt dieser Effekt auch unter Proteinnormalisierung bestehen (vgl. Abbildung 16C und D, 50k (6h vs. 24h,  $p = 0,0075$ ), 100k (6h vs. 24h,  $p < 0,0001$ ), 200k (6h vs. 24h,  $p = 0,0007$ )). Dies führt zu der Annahme, dass die Plasmakonzentration des Prothrombins stets konstant bleibt, während die F2 Expression über die Zeit adjustiert wird. Auffällig ist hier zudem, dass erhöhte Prothrombinspiegel im Medium mit einer geringen F2 Genexpression einhergehen (vgl. Abbildung 16 C und D, jeweils 50k (24h) und 100k (24h)). Dies lässt vermuten, dass das im Medium akkumulierende Prothrombin eventuell selbst einen autoregulatorischen Einfluss hat.



**Abbildung 16: Konstante Prothrombinspiegel im Kulturmedium über die Zeit**

Vergleich der Prothrombin Sekretion und F2 Expression über die Zeit. (A) Wird die F2 Konzentration im Zellkulturmedium bis zu einem Zeitpunkt von 24h nachverfolgt, zeigt sich, dass diese stets konstant bleibt, während (B) die F2 Expression über die Zeit sinkt (, vgl. insbesondere 100k 6h vs. 24h ( $p < 0,00001$ ) oder 200k 6h vs. 24h ( $p = 0,0072$ )) (C, D) Betrachtet man weiter die auf Proteinmasse normalisierten F2 Konzentrationen im Medium bzw. die Expressionslevels jeweils über die Zeit, wird deutlich, dass die Prothrombinmenge im Medium auch auf Zellebene betrachtet konstant bleibt, während die F2 Expression pro Zelle herunterreguliert wird (vgl. Abbildung D, 50k (6h vs. 24h,  $p = 0,0075$ ), 100k (6h vs. 24h,  $p < 0,0001$ ), 200k (6h vs. 24h,  $p = 0,0007$ )) (jeweils Zweistichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%).

Da Hepatozyten neben Prothrombin/ Thrombin auch weitere Proteine sezernieren, wie etwa Albumin, Transferrin, akute Phase Proteine, Gerinnungsfaktoren, Bestandteile des Komplementsystems, metabolische Enzyme (beispielweise des Cytochrom P450-Systems) und weitere Proteine der Biotransformation (208), wäre denkbar, dass auch diese



## Ergebnisse

hepatozytären Proteine Einflüsse auf die F2 Expression ausüben. Diese potentiellen Modulatoren können mittels des in dieser Arbeit vorgestellten primären Hepatozytenkulturmodells künftig systematisch in großem Umfang weiter untersucht werden.

Gedanklich könnten zudem auch Einflüsse durch nicht-hepatozytäre Zellen, wie etwa durch die in der Leber (also in unmittelbarer Umgebung der Hepatozyten) vorkommenden Fibrozyten eine Rolle spielen, die ihrerseits ebenfalls Proteine exprimieren, darunter extrazelluläre Matrixproteine oder die Matrix-Metalloproteasen (209). Zusätzlich wäre es möglich, dass die F2 Expression unter pathologischen Umständen, wie etwa bei Tumorerkrankungen regulatorisch beeinflusst wird, zumal Prothrombin bzw. Thrombin in der Tumorbilogie eine bedeutende Rolle spielt (vgl. Kapitel 1.2.2). Im nächsten Kapitel wurde exemplarisch die F2 Expression durch Einflüsse nicht-hepatozytärer Zellpopulationen, wie Fibroblasten und Tumorzellen untersucht.

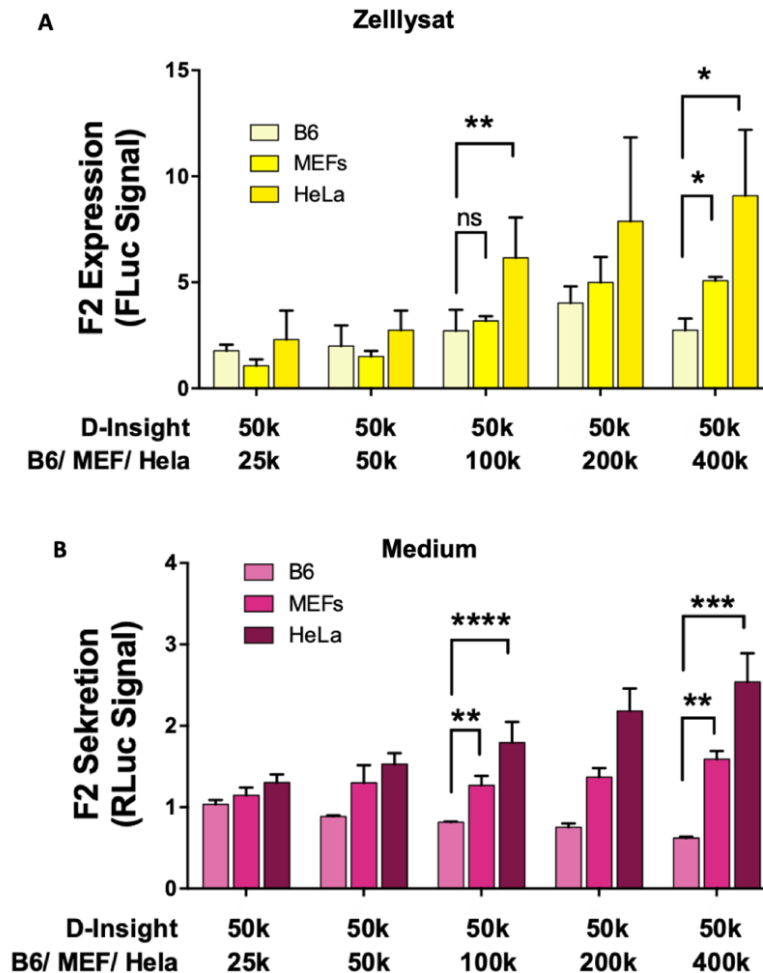
### 3.2.4 Co-Kultivierung mit nicht-hepatozytären Zellen

Zur Untersuchung des Einflusses nicht-hepatozytärer Zellpopulationen auf die F2 Genexpression und Proteinsekretion (heterotypische Interaktionen), erfolgte die Anlage von Co-Kulturen mittels zweier unterschiedlicher Zellpopulationen in 6-Well-Plates. Zum einen wurden D-Insight Zellen gemeinsam mit murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) co-kultiviert, die in diesem Versuchsaufbau als Fibroblastenzelllinie eine physiologische Umwelt der Hepatozyten repräsentieren sollen, da diese neben Hepatozyten ebenfalls in der Leber physiologisch ansässig sind. Zum anderen erfolgte eine separate Co-Kultivierung mittels D-Insight Zellen und HeLas, die (humanen) Epithelzellen des Zervixkarzinoms entsprechen und als Tumorzellen pathologische Bedingungen in der Zellkultur repräsentieren sollen. Vorbereitend wurden die nicht-hepatozytären Zellen in separaten Kulturen erstellt und hier mindestens dreimalig passagiert um eine ausreichende Zellanzahl zu erhalten. Die Co-Kultivierung erfolgte nachfolgend stets mit einer gleichbleibenden Anzahl (50k) an D-Insight Hepatozyten und einer ansteigenden Zellzahl an den o.g. nicht-hepatozytären Zellen (MEFs und HeLas). Zum Vergleich wurde zusätzlich eine dritte Kultur mit D-Insight und B6 Zellen angelegt. Diese entspricht einer reinen Hepatozytenkultur, die keine Einflüsse fremder Zellen vorweisen sollte und diente ebenfalls als Kontrolle. Die Kulturen wurden jeweils für 24h inkubiert. Nachfolgend wurde das FLuc Signal der lysierten Zellkulturen und das RLuc Signal des Mediums der Zellkulturen gemessen. Da jeweils dieselbe Anzahl an D-Insight Zellen (50k) in allen Kulturen ausgesät wurde, zeigt das jeweilige Reportersignal direkt die Veränderung der F2 Expression unter Einfluss der umgebenden Zellen an, sodass von einer Proteinnormalisierung in diesem Versuchsaufbau abgesehen wurde. Die Normalisierung erfolgte stattdessen jeweils auf Kulturen mit 50k D-Insight ohne Zugabe weiterer Zellen (absolutes Signal dieser Kultur nicht gezeigt), um mit diesem Wert als Basis eine Vergleichbarkeit der Werte zwischen den Kulturen zu erhalten.

Interessanterweise steigt die F2 Expression bei beiden nicht-hepatozytären Zelllinien mit der Zellzahl an. MEFs zeigen hierbei einen geringeren Anstieg, HeLa Zellen hingegen einen deutlichen Anstieg der F2 Expression im Vergleich zur reinen Hepatozytenkultur an (siehe Abbildung 17A, 100k - 400k). Daneben stellen sich je nach gemeinsam kultivierter Zellpopulation auch unterschiedliche Prothrombinspiegel im Medium der Zellkulturen ein, die ebenfalls in der Kultur mit HeLa Zellen am höchsten sind (siehe Abbildung 17B, 50k – 400k).

## Ergebnisse

Auch hier könnten als potentiell expressionsregulierende Faktoren direkte interzelluläre Interaktionen oder ins Medium sezernierte Substanzen eine Rolle spielen.



**Abbildung 17: Co-Kultivierungen mit MEF und HeLa induzieren die F2 Expression**

(A) F2 Genexpression und (B) Prothrombin Plasmakonzentration in gemeinsamer Kultivierung der nicht-hepatozytären Zellreihen MEFs und HeLas (jeweils multipler t-Test, Konfidenzintervall 95%, ungleiche Standardabweichungen pro Zellart angenommen). Werden unterschiedliche Zellarten in einer Zellkultur mit Hepatozyten zusammen kultiviert, ergeben sich abhängig von der gemeinsam kultivierten Zellart unterschiedliche F2 Expressionslevels der Reporterzelllinie. Neben hepatozytären Regulationsmechanismen unter verschiedenen Zellkultur- und Inkubationsbedingungen, können umfangreiche weitere Faktoren vermutet werden (siehe Text), die einen Einfluss auf die F2 Expression und Sekretion ausüben.

Insgesamt zeigt sich, dass die Regulation der F2 Expression von der Inkubationszeit, von der Zellzahl und von der Art der umgebenden Zellpopulation, abhängig ist. Somit scheinen für die F2 Expression sowohl homotypische Interaktionen (zwischen den Hepatozyten untereinander) als auch heterotypische Interaktionen (zwischen Zellen unterschiedlicher Zellarten) eine Rolle zu spielen. Welche Mechanismen hierbei grundlegend sind, soll nachfolgend genauer untersucht werden.

### 3.3 Evaluierung potentieller Stimulanzen auf die F2 Genexpression

Potentielle Einflussfaktoren auf die F2 Genexpression können vielfältig sein. Neben den Veränderungen unter den Einflüssen nicht-hepatozytärer Zellpopulationen in den oben gezeigten Co-Kulturen konnte bisher bereits gezeigt werden, dass die Zellzahl und die

## Ergebnisse

Inkubationszeit auch in reinen Hepatozytenkulturen deutliche Einflüsse auf die F2 Genexpression zeigen. Während die Prothrombin Plasmakonzentration über die Zeit konstant bleibt, scheint die F2 Expression durch potentielle regulatorische Einflüsse stark zu variieren. Welche Mechanismen und Substanzen Einfluss ausüben, bleibt hierbei jedoch noch ungeklärt. Im Folgenden möchte ich einen potentiellen autoregulatorischen Feedbackmechanismus, wie ihn die vorhergehenden Ergebnisse suggerieren (vgl. Abbildung 16), bezüglich seiner Wirkung auf die F2 Genexpression genauer untersuchen, um nachfolgend weiter auf potentielle fremdregulatorische Einflüsse einzugehen. Hierzu soll das soweit etablierte Hepatozytenmodell für eine effizientere Methodik auf ein 96-Well-Plate Format übertragen werden.

### 3.3.1 Weiterentwicklung des Zellkulturmodells

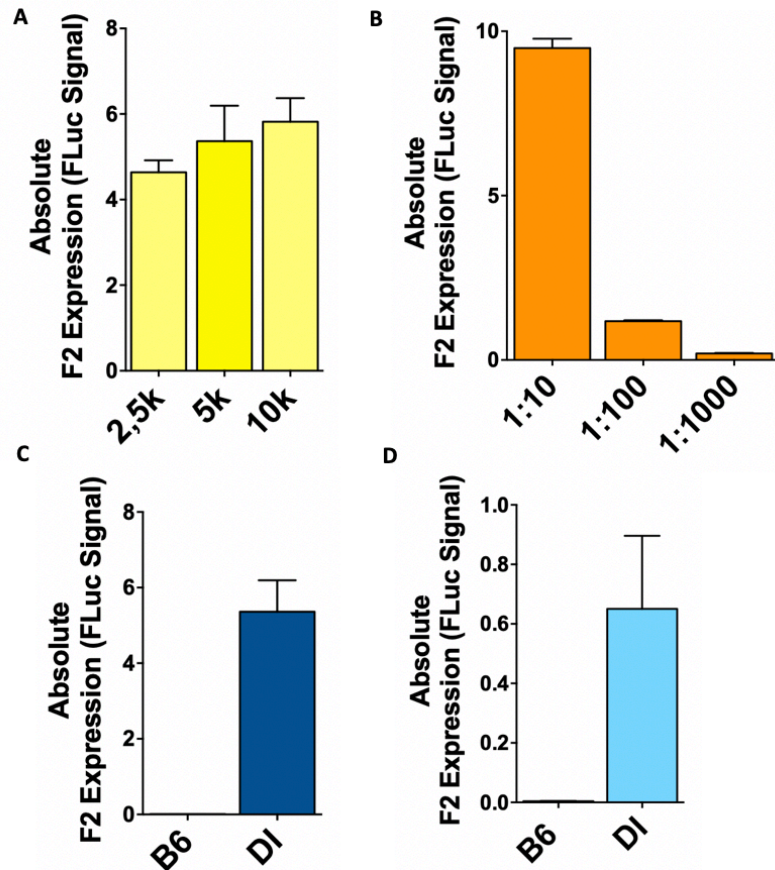
Um optimale Zellkulturbedingungen für die nachfolgenden Untersuchungen mit Inkubation potentiell F2 genregulierender Substanzen zu gewährleisten, wurden zunächst Analysen zu optimalen Zellkultur- und Messbedingungen durchgeführt. Hierbei erfolgte zunächst die Untersuchung optimaler Zellzahlen für das 96-Well-Plate Format. Dazu wurde der Wert von 200k Zellen als Ausgangswert verwendet, da dieser Wert auf einer Fläche der Well einer 6-Well-Plate von 9,6cm<sup>2</sup> mikroskopisch einer Konfluenz der Hepatozyten entsprach. So konnte für die Fläche der Well einer 96-Well Plate mit 0,32cm<sup>2</sup> Fläche die analoge Zellzahl von 6,6k mit derselben Konfluenz errechnet werden. Nach Isolation von D-Insight Zellen sowie B6 Zellen als Kontrolle (letztere nicht dargestellt), wurden diese jeweils zu Zellzahlen von 2,5k, 5k und 10k in 96-Well-Plates ausgesät sowie nach 24h im Lumineszenz-Assay gemessen. Hierbei zeigten sich jeweils adäquat detektierbare Signale (vgl. Abbildung 18A), sodass aus Gründen der Praktikabilität bezüglich der limitierten isolierten Zellzahl pro Leber die Zellzahl von 5k Zellen für nachfolgende Experimente festgelegt wurde.

Zur Sicherstellung einer technisch einwandfreien Reproduzierbarkeit gleichbleibender Signale wurde zudem eine Verdünnungsreihe aus Leberlysaten in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 hergestellt (vgl. Abbildung 18B, für die Durchführung siehe 2.5.1.2), die den Rahmen der gemessenen Signale der Wells mit 5k Zellen umfassen sollte (1:10 mit 9,488, 1:100 mit 1,18, 1:1000 mit 0,200 RLU, vs. 5k mit 4,6337 RLU) (vgl. Abbildung 18A und B). Diese Leberlysate dienen in den nachfolgenden Compound Screenings als technische Kontrolle.

Zudem erfolgte die Sicherstellung einer ausreichenden Qualität des Luciferase-Substrates. Es erfolgte ein Vergleich der Substrate Bright Glo (Promega), welches bisher verwendet wurde, und Beetle Juice (PJK Biotech), indem eine Messung von Zellen in einer Zellzahl von 5k (jeweils 8 Wells) nach 24h Inkubationszeit jeweils einmal mit Bright Glo, sowie einmal mit Beetle Juice durchgeführt wurde (zur genaueren Durchführung siehe Kapitel 2.6.1). Es zeigte sich dabei bei der Messung unter Verwendung von Bright Glo sowohl ein höheres Messsignal, als auch eine geringere Standardabweichung (vgl. Abbildung 18C und D, BG 5,364 RLU und St. Dev. 0,6784, sowie BJ 0,6508 RLU und St. Dev. 0,2004), sodass die Anwendung von Bright Glo in der weiteren Analyse fortgeführt wurde.

Zusammenfassend wurde mithilfe dieser vorbereitenden Experimente eine Zellzahl von 5k für die Untersuchungen im Rahmen des Compound Screenings festgelegt, eine adäquate technische Kontrolle durch eine Verdünnungsreihe eines Leberlysates hergestellt, als auch die fortgeführte Anwendung von Bright Glo als optimales Luciferase Substrat festgelegt.

## Ergebnisse



### Abbildung 18: Optimierung des Hepatozytenmodells für das Compound Screening

Ermittlung optimaler Bedingungen für das Compound Screening im Hochdurchsatzverfahren. (A) Eine Zellzahl von 5k Zellen pro Well einer 96-Well Plate zeigte (4,6337 RLU, St. Dev. 0,654) ein adäquates Signal für das Verfahren. (B) Zur technischen Qualitätskontrolle des Luciferase Assays erfolgte jeweils die Applikation einer Verdünnungsreihe mittels eines zuvor präparierten Leberlysates (1:10 9,488, 1:100 1,18, 1:1000 0,200 RLU, St. Dev. 1:10 0,233413, 1:100 0,022954, 1:1000 0,01188). (C, D) Vergleich der Luciferase Substrate Bright Glo (Promega) und Beetle Juice (PJK Biotech). Bright Glo (C) zeigte bei 5k mit einem absoluten Signal von 5,364 RLU (St. Dev. 0,6784) ein höheres und spezifischeres Signal als Beetle Juice (D) mit einem Signal von 0,6508 RLU (St. Dev. 0,2004).

### 3.3.2 Einfluss des Thrombins auf die F2 Genexpression

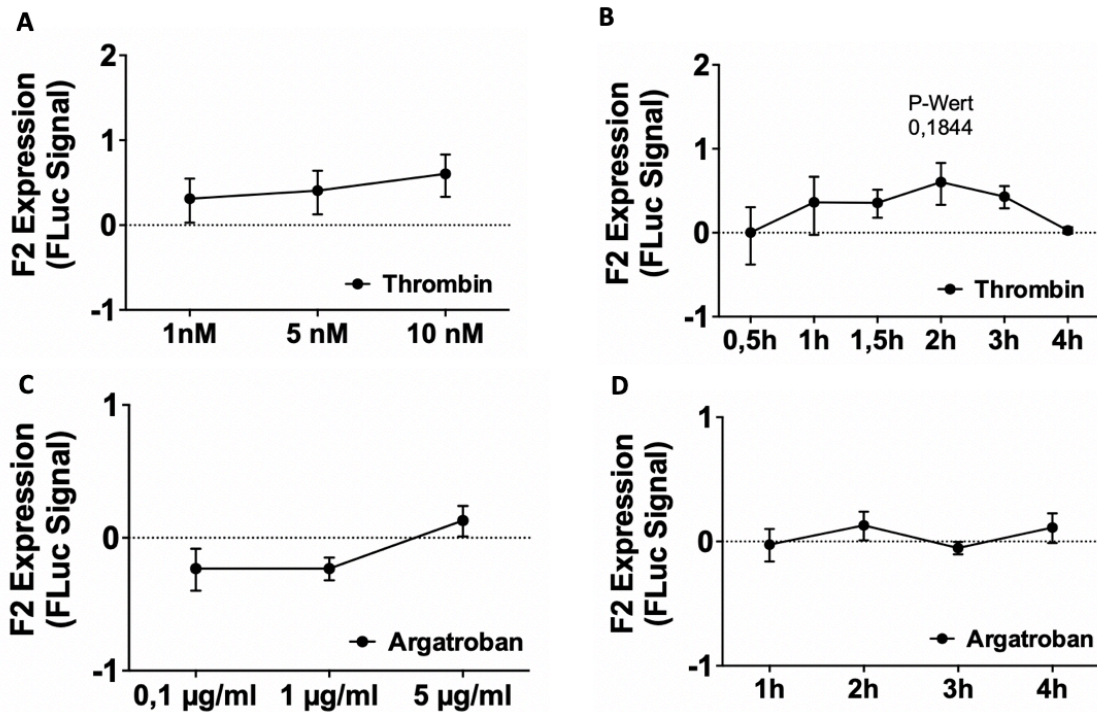
Für die nachfolgende Untersuchung der F2 Expression unter Inkubation mit verschiedenen Substanzen wurde das primäre Hepatozytenmodell auf Basis des D-Insight Mausmodells auf ein 96-Well-Plate Format komprimiert und unter diesen Bedingungen optimiert. Auf diese Weise können verschiedene Substanzen in einem Hochdurchsatzverfahren mittels der Lumineszenzreporter nach oben vorgestelltem Schema im Aktivitätsassay evaluiert werden (eine ausführlichere Beschreibung der Durchführung findet sich in Kapitel 2.9.4).

Zunächst sollte ein potentieller autoregulatorischer Feedbackmechanismus analysiert werden. Um den Einfluss Thrombins auf seine Genexpression zu untersuchen, erfolgte die Inkubation der hepatozytären D-Insight-Kulturen mit murinem rekombinanten Thrombin in drei verschiedenen Konzentrationen, 1nM, 5nM und 10nM. Messungen erfolgten bis zu einem Zeitpunkt von vier Stunden nach Applikation. Hier zeigte sich ein induzierender Effekt, insbesondere zu einem Zeitpunkt von zwei Stunden (siehe Abbildung 19). Mit einem P-Wert von 0,1844 ist der Effekt zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant, jedoch zeigt er, auch im Zusammenspiel mit den weiteren Zeitpunkten, einen Trend an. Interessanterweise ist dieser induzierende Effekt bei einem Zeitpunkt von vier Stunden wieder rückläufig. Dies könnte auf einen weiteren Mechanismus hindeuten, der bei ausreichender Nachproduktion von

## Ergebnisse

Prothrombin einen herunterregulierenden Effekt haben könnte (wie in Abbildung 16) und letztlich zu einer präzise regulierten Prothrombin-Plasmakonzentration führt.

Um die Spezifität dieses Effektes durch Thrombin weiter zu differenzieren, wurde in einer weiteren primären D-Insight Hepatozytenkultur die katalytische Aktivität des Thrombins durch Argatroban, einem direkten Thrombin-Inhibitor, mittels verschiedener Konzentrationen (0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 5 µg/ml) blockiert und das FLuc Signal ebenfalls in einem stündlichen Abstand bis zu vier Stunden gemessen. Hier zeigte sich weder bei unterschiedlichen Konzentrationen zu einem Zeitpunkt von 2h, noch über einen Zeitraum von 4h bei einer hohen applizierten Konzentration (5 µg/ml) eine Induktion der F2 Genexpression (siehe Abbildung 19). Dies gibt Hinweise darauf, dass es sich um einen spezifischen, durch Thrombin hervorgerufenen autoregulatorischen Einfluss auf die F2 Genexpression handelt.



**Abbildung 19: Thrombin führt zur Induktion der F2 Genexpression**

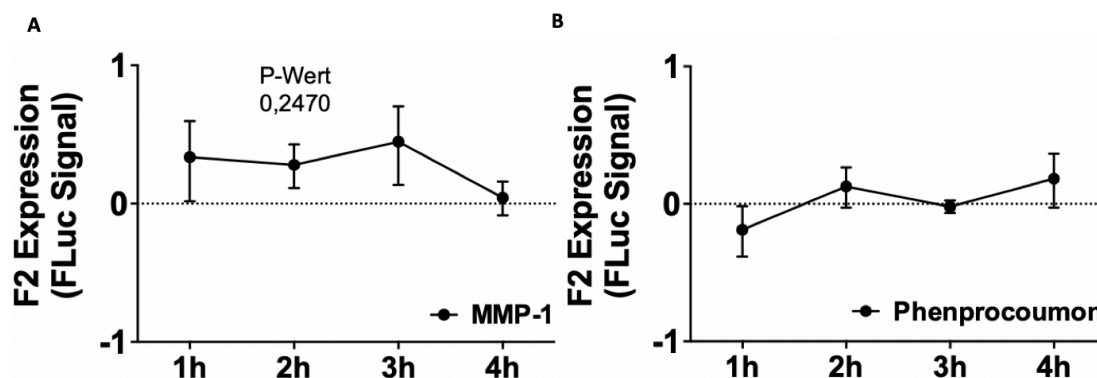
Untersuchung des Einflusses von Thrombin auf die F2 Expression mithilfe von D-Insight Reportermausmodell-basierten primären Hepatozytenkulturen im Luciferase Assay. (A) Die Zugabe verschiedener Konzentrationen murinen rekombinanten Thrombins zeigt einen Trend zur Heraufregulation der F2 Expression zu einem Zeitpunkt von 2h. (B) Der Trend einer Heraufregulation kann bei Zugabe von 10nM über einen Zeitraum bis 4h beobachtet werden (P-Wert bei 2h 0,1844, Einstichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%). (C) Die Zugabe verschiedener Konzentrationen des Thrombininhibitors Argatroban zeigt keinen eindeutigen Einfluss auf die Genexpression bei einem Zeitpunkt von 2h. (D) Argatroban zeigt bei verschiedenen Zeitpunkten keine Effekte einer F2 Expressionsregulation auf.

Zusammenfassend bewirkt die Inkubation primärer Hepatozyten mit murinem rekombinanten Thrombin einen Trend zur Hochregulation der F2 Expression, während vorhergehende Ergebnisse zusätzlich eine herunterregulierende Wirkung durch hohe Prothrombinspiegel oder andere in das Zellkulturmedium sezernierte Substanzen nahelegen (vgl. Abbildung 16). Während die autoregulatorischen Regulationsmechanismen durch Prothrombin oder Thrombin vermutlich eher im Rahmen einer Steady-State-Situation im physiologischen Zustand zur Wahrung einer präzise kontrollierten Prothrombin-Plasmakonzentration zum Tragen kommen, ist die Anpassung der Plasmakonzentration als adäquate Reaktion an pathologische Umstände potentiell zusätzlich durch weitere Mechanismen reguliert, die in weiteren Versuchsansätzen untersucht wurden.

### 3.3.3 Einfluss weiterer Substanzen auf die Genexpression

Neben einem autoregulatorischen Feedbackmechanismus ist das Vorliegen weiterer Einflussfaktoren auf die Genexpression im Rahmen pathologischer Ereignisse wahrscheinlich, sodass auf einer hypothetischen Grundlage basierend (vgl. Kapitel 1.2) weitere potentiell expressionsinduzierende Substanzen appliziert wurden. Hier wurden die primären D-Insight-Hepatozytenkulturen stellvertretend für proinflammatorische und tumorassoziierte Proteine mit der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) inkubiert. Desweiteren erfolgte eine Inkubation mit einem synthetischen Antikoagulant, dem Vitamin K-Antagonisten Phenprocoumon. Letzteres verringert durch Störung des Vitamin K Zyklus die  $\gamma$ -Carboxylierung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (darunter auch Prothrombin) und führt somit zu einer funktionellen Beeinträchtigung des Gerinnungssystems (vgl. Kapitel 1.3.2). Hier sollte ein potentieller zusätzlicher Einfluss auf die F2 Genexpression genauer untersucht werden.

Hier zeigte sich ein Trend zur Heraufregulation der F2 Genexpression durch MMP-1 während eines Zeitraumes bis zu 4 Stunden, obschon ebenfalls nicht signifikant (vgl. 2h,  $p = 0,2470$ ). Eine Applikation von Phenprocoumon dagegen zeigte keinen Einfluss auf die F2 Genexpression (Abbildung 20).



**Abbildung 20: Einfluss weiter Substanzen auf die F2 Genexpression**

Untersuchung des Einflusses von proinflammatorischen, tumorassoziierten und synthetischen Modulatoren auf die F2 Expression mithilfe von D-Insight Reportermausmodell-basierten primären Hepatozytenkulturen im Luciferase Assay. (A) Die Applikation der Metalloprotease MMP-1 (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) zeigt einen Trend zur Heraufregulation der F2 Expression bis zu einem Zeitpunkt von 4h (P-value von 0,2470 bei 2h, Einstichproben t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95%). (B) Die Applikation des Vitamin-K-Antagonisten Phenprocoumon (0,5mg/ml) zeigt keinen eindeutigen Einfluss auf die Genexpression während eines Zeitrahmens von 4h.

Prinzipiell können nach diesem Schema jedoch auch alle weiteren hypothetisch infrage kommenden Modulatoren mithilfe des eigens für diesen Zweck etablierten Hepatozytenmodells auf Basis der D-Insight Mauslinie untersucht werden. Eine Fortsetzung dieses Screenings, zum Beispiel auch mit einer Maximierung der bisher applizierten Konzentrationen, könnte dazu beitragen, nicht nur die Autoregulation der F2 Expression durch Prothrombin bzw. Thrombin weiter zu differenzieren, sondern ebenfalls weitere genregulierende Stimuli zu entdecken, mit potentiell therapeutischen Implikationen.

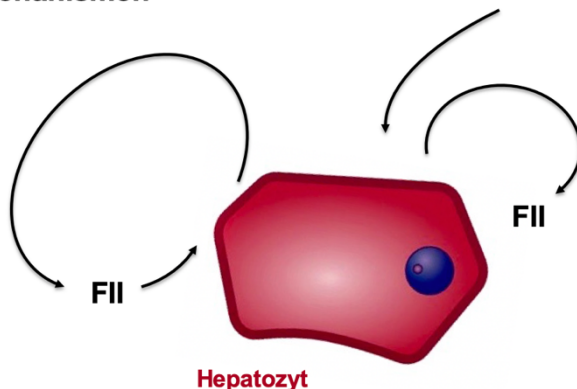
## 4 Diskussion

### 4.1 Regulationsmechanismen der F2 Genexpression

In dieser Arbeit wurde ein Hepatozytenmodell basierend auf der D-Insight Mauslinie etabliert, mit dem anschließend untersucht werden sollte, unter welchen Einflussfaktoren und Regulationsmechanismen die F2 Genexpression und Sekretion steht und durch welche Mechanismen bzw. Substanzen die F2 Expression beeinflusst wird. Es erfolgte zunächst eine Beobachtung der F2 Expressionsregulation und der Proteinsekretion sowohl an rein hepatozytären Kulturen als auch an Co-Kulturen mit nicht-hepatozytären Zellen. So konnte festgestellt werden, dass sowohl homotypische als auch heterotypische Interaktionen eine Rolle für die Expressionsregulation spielen. Im Anschluss erfolgte eine differenziertere Untersuchung möglicher Regulationsmechanismen mittels einiger ausgewählter Substanzen.

Hypothetisch könnten verschiedene Regulationsmechanismen der F2 Genexpression eine Rolle spielen, die im Modell der Abbildung 21 vorgestellt werden. Zum einen könnten Prothrombin oder Thrombin selbst im Rahmen eines autoregulatorischen Feedbackmechanismus die eigene Expression beeinflussen. Zum anderen könnten auch andere Mechanismen regulatorisch eingreifen um die F2 Expression und die Plasmakonzentration somit aktiv an die Umgebungsverhältnisse anzupassen. So könnte beispielsweise die Zellzahl in Kultur bzw. die Zellkonfluenz mit direkten interzellulären Interaktionen eine Rolle spielen, andererseits könnten aber auch andere Substanzen indirekt Einflüsse ausüben. Dies beinhaltet einerseits Substanzen, die die Hepatozyten selbst exprimieren, wie etwa weitere Gerinnungsfaktoren oder Bestandteile des Komplementsystems, andererseits aber auch weitere nicht-hepatozytäre proinflammatorische Zytokine oder tumorassoziierte Proteine. Neben biologischen Stimuli kommen hier potentiell auch synthetische Substanzen infrage. Eventuell finden sich letztlich darunter auch Substanzen, die therapeutisch zur Regulation der F2 Genexpression eingesetzt werden können.

#### Autoregulatorische Mechanismen



#### Andere regulatorische Mechanismen

##### Hetero- und homotypische Interaktionen

- Direkte interzelluläre Signalgebung
- Indirekte Signalgebung durch sezernierte Substanzen
  - Gerinnungsfaktoren
  - Bestandteile der Fibrinolyse
  - Komplementfaktoren
  - Inflammatorische Zytokine
  - Tumor-assoziierte Proteine
  - Pharmazeutika
  - Weitere Substanzen

#### Abbildung 21: Modell potentieller Regulationsfaktoren auf die F2 Genexpression

Prothrombin wird unter physiologischen Bedingungen zu 95% in Hepatozyten exprimiert. Zum einen könnte das exprimierte Prothrombin selbst eine autoregulatorische Wirkung auf seine Expression (beispielsweise im Sinne einer negativen Feedback-Schleife) ausüben (links). Potentiell könnten auch andere umgebungs- oder stressbedingte Regulationsfaktoren eine adäquate Anpassung der hepatozytären F2 Expression an die Umweltverhältnisse ermöglichen.

## Diskussion

Für diese Untersuchungen wurde zunächst ein primäres Hepatozytenmodell auf Basis der D-Insight Mauslinie etabliert. Damit ist erstmals mittels Lumineszenzmessung von an Prothrombin getaggten RLuc und FLuc-Reporter eine Nachverfolgung der F2 Expression und Sekretion in Echtzeit möglich (vgl. Abbildung 10). Nachdem die Spezifität und Sensitivität des Reportersystems und der Lumineszenz-Assays validiert wurden (vgl. Abbildung 12), konnte einerseits eine höhere F2 Expression bei höheren Zellzahlen sowie andererseits eine sinkende F2 Expression über die Zeit bei stabiler Zellzahl (vgl. Abbildung 14) beobachtet werden. Dies legt nahe, dass eine F2 Expressionsregulation bereits ohne Zugabe von potentiellen Modulatoren in Reaktion auf veränderte Umweltsituationen erfolgt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Prothrombin Konzentration im Medium und die F2 Expression bezüglich steigender Zellzahlen positiv korrelieren (vgl. Abbildung 15). Die Zellzahl und somit möglicherweise die Anzahl an direkten interzellulären Interaktionen könnten dabei die Einstellung einer bestimmten Plasmakonzentrationshöhe durch eine gezielte Induktion der F2 Expression bewirken. Interessanterweise bleibt die Prothrombin Konzentration im Medium bei Betrachtung einer Zellkultur mit einer definierten Anzahl an Zellen über einen Zeitraum von 24h stets nahezu konstant, während zeitgleich die F2 Expression rückläufig ist (vgl. Abbildung 16). Die Zellen scheinen somit einen Registrierungsmechanismus zu besitzen, der hohe Prothrombinmengen wahrnimmt und anschließend zu einer Reduktion der F2 Expression führt. Auf diese Weise scheinen die Zellen in der Lage zu sein, die Prothrombinspiegel im Medium stets in einem gewissen Rahmen konstant zu halten. Übertragen auf einen physiologischen Organismus könnte dies eine stets konstante F2 Plasmakonzentration repräsentieren.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass die Prothrombinspiegel stets streng durch eine adäquate F2 Expression reguliert zu sein scheinen. Komplementär hierzu wurde untersucht, inwieweit sich verändernde Umgebungsbedingungen auf die F2 Expression auswirken.

### 4.2 Regulationsmechanismen auf Umgebungsbedingungen

In gemeinsamer Kultur mit verschiedenen nicht-hepatozytären Zellreihen wie MEFs (murinen embryonalen Fibroblasten) und HeLas (Zellen des humanen Zervixkarzinoms) konnte der Einfluss verschiedener Umgebungsbedingungen auf die F2 Expression gezeigt werden. MEFs stellen in diesem Experiment Fibroblasten dar, die unter physiologischen Bedingungen ein Bestandteil der Leber sind, während HeLas als maligne Tumorzellen pathologische Umgebungsbedingungen repräsentieren. Interessanterweise führten MEFs lediglich zu einem geringen Anstieg der F2 Genexpression, während HeLas einen starken Anstieg bewirkten (vgl. Abbildung 17).

Co-Kulturen aus parenchymatösen und mesenchymalen Zellen sind eine häufig genutzte Grundlage für das Studium von interzellulären Interaktionen. So konnte Houssaint et al. zeigen, dass die Differenzierung funktioneller Hepatozyten ex vivo Endothelzell-Interaktionen benötigt (210). Zudem wiesen Hepatozyten, die in Co-Kultur mit nicht-parenchymatösen Leber-typischen Zellen (wie etwa Endothelzellen, Gallenwegs-Epithelzellen oder Fibroblasten) gehalten wurden, ein längeres Überleben und eine insgesamt bessere Fähigkeit auf, Hepatozyten-spezifische Funktionen auszuführen (211-217). Umgekehrt zeigten hepatozytäre Monokulturen einen Verlust der Expression leberspezifischer Proteine ab drei Tagen und spätestens nach einer Woche (218-220). Die gemeinsame Kultivierung der D-Insight Zellen mit B6 (jeweils Hepatozyten) spiegelt das F2 Genexpressionsmuster vorhergehender Hepatozytenkulturen wider und bestätigt so die Replizierbarkeit dieser (vgl. Abbildung 17 mit Abbildung 16A, 24h B6 (rein hepatozytäre Kultur)).

Die Co-Kulturen mit MEFs zeigten im Einklang mit den o.g. Erkenntnissen ebenfalls eine höhere leberspezifische Protein-Expression, hier bezüglich des Prothrombins (vgl. Abbildung 17A). Interessanterweise zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zudem eine mit der



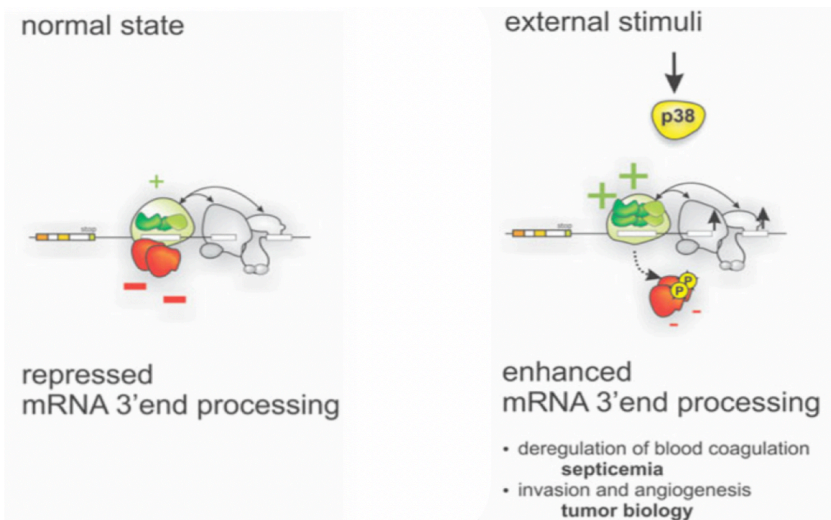
## Diskussion

Fibroblastenanzahl ansteigende F2-Expression (vgl. Abbildung 17A, 100k vs. 400k). Dabei erfolgt ab einem Verhältnis von 100k Fibroblasten zu 50k D-Insight Zellen eine Induktion der F2 Expression, die den Wert der hepatozytären Monokultur (D-Insight/B6) (bei ebendiesen Zellverhältnissen) übersteigt. Bhatia et al. konnte zeigen, dass sowohl eine direkte interzelluläre Signalgebung, als auch eine indirekte Signalgebung eine Regulationswirkung auf die leberspezifische Expression in Fibroblasten Co-Kulturen hat (221). Eine „dosis-abhängig“ steigende Ausprägung leberspezifischer Funktionen konnte er hier ebenfalls nachweisen. Er zeigte, dass ein Hepatozyten/Fibroblasten-Verhältnis von 1:2 eine signifikante Induktion der Albuminsekretion bewirkte (218). Fibroblasten sezernieren neben extrazellulärer Matrix unter anderem auch Matrixmetalloproteasen (222, 223). Ein induzierender Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Genregulation von Hepatozyten ist ebenfalls bereits nachgewiesen worden (224-226), ein Einfluss der sezernierten MMPs werden unten genauer erörtert (vgl. auch Abbildung 20A).

Während die Co-Kultur mit Fibroblasten eine physiologische hepatozytäre Mikroumgebung mit einem leichten Anstieg der F2 Expression repräsentiert, fällt dagegen ein starker Anstieg der F2 Genexpression und Sekretion in der Co-Kultur mit HeLa Zellen auf, die als humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms eine pathologische Umgebung repräsentieren (vgl. Abbildung 17). Eine enge Verknüpfung zwischen der Tumorbilogie und einem prokoagulatorischen Zustand inklusive einer erhöhten Prothrombin-Plasmakonzentration ist bereits mehrfach beschrieben worden (74, 109, 117, 120, 227, 228) (vgl. auch Kapitel 1.2.2). Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit somit auch im Zellkulturversuch nachgestellt werden.

Die zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit Gegenstand intensiver Forschung. Erst kürzlich wurde ein Mechanismus zur Regulierung der F2 Expression über p38 MAPK (p38 MAP Kinase) entdeckt, der auch mit der Entstehung bösartiger Tumoren im Menschen und im Mausmodell assoziiert ist (229, 230). In diesem System kommt es durch die Aktivierung des Signalproteins p38 MAPK zu einer direkten Phosphorylierung inhibitorischer Proteine der F2 Expression, die folglich nicht mehr an die F2 mRNA binden können (Abbildung 22). Die mRNA steht so posttranskriptional der 3'- Prozessierung verstärkt zur Verfügung. Dies resultiert in einer erhöhten Stabilität der mRNA und damit einer erhöhten Prothrombin-Translation. Letztlich steigt auf diese Weise die Plasmakonzentration des Prothrombins (231). Die p38 MAP Kinase wird ubiquitär exprimiert und ist in verschiedene Signalkaskaden eingebunden die über inflammatorische Zytokine, DNA-Schädigung und vielen weiteren pathologischen Stimuli im Rahmen von Stress und Entzündung reichen (232). So existieren mögliche Auslöser einer verstärkten Prothrombin Expression außer in der Mikroumgebung verschiedener Tumoren auch unter inflammatorischen Umständen (79, 230, 231, 233-237). Letztlich könnte durch diesen Mechanismus nicht nur Thrombin die Tumorprogression beeinflussen (vgl. Kapitel 1.2), sondern vice versa, ebenso die Tumorumgebung die F2 Expression regulieren (231).

## Diskussion



### Abbildung 22: Induktion der F2 Genexpression durch p38 MAPK Aktivierung

Extrazelluläre Stimuli aktivieren p38 MAPK und phosphorylieren regulatorische Proteine (rot). Dies führt zu einer Hochregulierung stimulierender Ribonukleoprotein-Komplexe (grün), die in einer verstärkten Prothrombin mRNA 3'-Ende Prozessierung führt. Die p38 MAP Kinasen gehören zur Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK) Familie. Anders als andere MAP Kinasen reagieren die p38 Kinasen nicht in erster Linie auf intrazelluläre mitogene Faktoren, sondern auf umweltbedingte und inflammatorische Signale. Sie werden daher auch als Stress-aktivierte Proteinkinasen bezeichnet. Dieser Stress wird neben verschiedenen inflammatorischen Zuständen auch durch die Tumorigenese oder Zelldifferenzierung repräsentiert (238). Abbildung modifiziert nach Danckwardt et al. (52).

Daneben könnte noch ein weiterer Mechanismus einen Einfluss auf die erhöhte F2 Expression bestehen: HeLas besitzen wie viele weitere aggressive Tumorzellen eine direkt prokoagulatorische Wirkung (117). Sie produzieren zwar selbst kein Prothrombin (239), hingegen sezernieren sie den Gerinnungsfaktor Tissue Factor, welches den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade aktiviert und folglich das sezernierte Prothrombin der Hepatozyten in der Co-Kultur zu Thrombin aktiviert (240). Hier könnte einerseits das aktivierte Thrombin selbst zu einer Geninduktion der D-Insight Zellen führen, was dem Mechanismus einer positiven Feedbackschleife entspricht, oder der nun durch die Thrombin-Aktivierung geschuldete Verbrauch und der folglich geringere Prothrombingehalt in der Zellkultur könnte im Sinne einer Feedbackschleife zu einer F2 Induktion führen. Eine detaillierte Betrachtung der autoregulatorischen Mechanismen findet sich im nachfolgenden Kapitel (Kapitel 4.3).

Theoretisch können eine Vielzahl potentiell an der Inflammation und Tumorigenese beteiligter Proteine einen Einfluss auf die F2 Expression ausüben. In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst zwei potentielle Stimulanzen untersucht. Hierbei wurden ein inflammations- und tumorassoziertes Protein, das MMP-1, sowie eine synthetische antikoagulatorische pharmazeutische Substanz, das Phenprocoumon, gewählt. MMPs gehören zur Familie der Matrixmetalloproteasen. Hauptsächlich tragen sie zur Degradation extrazellulärer Matrix, dem Gewebe Remodeling und der Angiogenese bei (241, 242). Daneben sind sie ebenfalls mit zahlreichen pathologischen Zuständen assoziiert, wie etwa kardiovaskulären Erkrankungen, inflammatorischen sowie ischämischen Prozessen und der Tumorentstehung (242-246). MMPs werden durch Zytokine wie  $TNF-\alpha$  induziert und werden sowohl von Fibroblasten als auch von Tumorzellen wie beispielsweise HeLas sezerniert (222, 247). Interessanterweise führte die direkte Applikation von MMP-1 tendenziell zu einer Induktion der F2 Expression (Abbildung 20), was gut mit den literarischen Vorkenntnissen (s.u.) und den Ergebnissen des HeLa Co-Kulturversuches vereinbar ist.

MMP-1 ist ebenfalls in der Lage über die Generierung eines nicht-kanonischen Tethered Ligand PAR-1 zu aktivieren (188, 248). Da PAR-1, insbesondere über die nicht-kanonische Aktivierung, ebenfalls eine Aktivierung der p38 MAP Kinase bewirken kann (188, 249), ist es möglich, dass auf diese Weise die F2 Expression induziert wird. Bekannt ist, dass PAR-1 in

## Diskussion

glatten Muskelzellen, in Endothelzellen, in Fibroblasten und in Thrombozyten exprimiert werden (250). Zudem existieren Ergebnisse die ein Vorkommen von PAR-1 in den Sternzellen sowie in den sinusoidalen Endothelzellen innerhalb der Leber nahelegen. Eine konstitutive Expression von PAR-1 auf gesunden Hepatozyten konnte dagegen bisher nur einmalig nachgewiesen werden (251). Ob die Regulation in Hepatozyten über PAR-1 erfolgt, erscheint daher fraglich. Interessanterweise zeigte sich allerdings eine Expression von PAR-1 auf Hepatozyten unter pathologischen Umständen, so konnte diese im Rahmen der akuten Hepatitis, der Leberzirrhose sowie des hepatocellulären Karzinoms (HCC) nachgewiesen werden (251). Es erscheint daher möglich, dass eine Regulation über PAR-1 unter inflammatorischen oder tumorassoziierten Umständen zu einer Induktion der F2 Expression führt. Godoy et al. konnte zudem nachweisen, dass primäre Hepatozytenmodelle bezüglich ihres Genexpressionsmusters eher pathologischen Mustern, ähnlich den Zuständen bei Hepatitis, Leberzirrhose und HCC entsprechen (252). Somit könnte die F2 Expression im vorliegenden Hepatozyten-Kulturmodell dennoch durch den vorgestellten Mechanismus induziert werden.

Neben diesen Überlegungen sind jedoch auch andere intrazelluläre und molekulargenetische Mechanismen denkbar, die Gegenstand ausstehender Untersuchungen sind. Interessanterweise existieren Hinweise, dass eine gestörte Gerinnung das Risiko des Auftretens maligner Tumoren verringern kann, unter anderem durch die Applikation von Heparinen und der damit einhergehenden Beeinträchtigung der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren Prothrombin und FX (253-255). Vitamin K-Antagonisten werden derzeit in erster Linie zur Prävention arterieller und venöser Thrombosen eingesetzt (256). Da bereits gezeigt werden konnte, dass die F2 Expression unter tumor-assoziierten Bedingungen erhöht ist (vgl. Kapitel 1.2.2), stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob Vitamin K-Antagonisten neben ihrer antikoagulatorischen Wirkung zusätzlich eine Modulation der F2 Genexpression bewirken. Die Applikation des Vitamin K-Antagonisten Phenprocoumon zeigte im Zellkulturversuch jedoch keine Effekte auf die F2 Expression. Ob eine Antikoagulation mit Vitamin K-Antagonisten letztlich das Krebsrisiko senkt, ist derzeit noch Gegenstand intensiver Untersuchungen (255). So konnten Kristen et al. sowie Pottegard et al. keinen tumorprotektiven Effekt von Vitamin K-Antagonisten zeigen (257, 258). Dennoch kann eine therapeutische Intervention zur Gerinnungshemmung auch bei Tumoren, etwa im Rahmen des Trousseau-Syndroms sinnvoll sein (259).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mit dem Hepatozytenmodell vorhergehende Erkenntnisse bezüglich der F2 Expression reevaluiert werden können. Es ist somit auch für die Evaluierung fremder Stimuli geeignet, mit potentiellen klinischen und therapeutischen Effekten.

### 4.3 Modell eines autoregulatorischen Feedback-Mechanismus

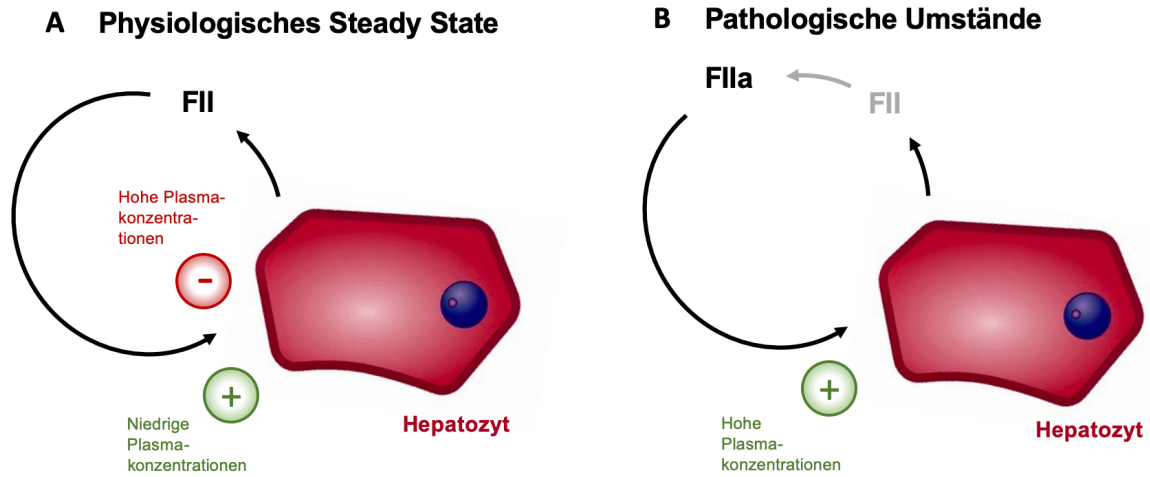
Potentiell können alle durch die Hepatozyten sezernierten Substanzen indirekt einen regulatorischen Einfluss ausüben (auf direkte interzelluläre Interaktionen wurde bereits in Kapitel 4.2 eingegangen). Betrachtet man jedoch die Plasmaspiegel im Vergleich zur F2 Genexpression in Abbildung 16, könnte die Überlegung naheliegen, dass (bspw. bei 50k/24h oder bei 100k/24h) über einen bestimmten Wert ansteigende Prothrombinspiegel im Medium zu einer starken Herunterregulierung der F2 Expression führen (Abbildung 16C und D). Diese Ergebnisse suggerieren, dass die Genexpression aktiv reguliert wird, mit einem möglicherweise autoregulatorisch vermitteltem Feedbackmechanismus durch eine erhöhte Konzentration des sezernierten Prothrombins.

Eine Adressierung des potentiellen Feedbackmechanismus mittels direkter Applikation murinen rekombinanten Thrombins konnte weitere Hinweise auf eine mögliche Autoregulation liefern. Vor allem bei Zugabe hoher Konzentrationen (10 nM) aktivierten Thrombins konnte

## Diskussion

durchgehend ein Trend zu einer Induktion der F2 Genexpression nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 19A und B). Hier wäre eine Wiederholung mit höheren Thrombinkonzentrationen möglich; so sind in der Literatur bereits Effekte von bis zu 0,5nM - 500nM Thrombin, bspw. bei Fragestellungen zu PARs untersucht worden (177, 178). Bei niedrigeren Konzentrationen konnte bei einem Zeitpunkt von 2 Stunden ebenfalls eine Heraufregulation gezeigt werden, gefolgt von einem auf das Ausgangslevel absinkenden Signal bei 4 Stunden Inkubationszeit. Dies legt die Anwesenheit konteragierender Maßnahmen zur präzisen Anpassung der F2 Expressionslevel bei ansteigenden Prothrombinkonzentrationen nahe. Die Spezifität der Thrombin-Wirkung konnte dargestellt werden, da die Applikation von Argatroban diesen Effekt komplett revidierte (vgl. Abbildung 19C und D). Theoretisch könnte hier das aktivierte Thrombin durch seine katalytische Aktivität direkt Signalkaskaden zur Heraufregulation der F2 Expression aktivieren (vgl. Abbildung 23B). Andererseits könnte auch die Zugabe aktivierten Thrombins zu einer autokatalytischen Aktivierung des Prothrombins führen, sodass dieser „Prothrombin-Verbrauch“ im Sinne einer positiven autoregulatorischen Feedbackschleife durch eine Induktion der F2 Genexpression kompensiert wird (vgl. Abbildung 23A (+)). Die Theorie der autoregulatorischen positiven Rückkopplung durch Prothrombin wird durch das Ergebnis aus dem vorhergehenden Experiment (vgl. Abbildung 16C und D) um einen konteragierenden negativen Rückkopplungsmechanismus ergänzt, da (neben möglichen anderen Einflussfaktoren) eine Erhöhung der Prothrombinkonzentration die Ursache einer Herabregulation der F2 Expression darstellen könnte (vgl. Abbildung 23A (-)). Zusammenfassend wäre der autoregulatorische Rückkopplungsmechanismus durch Prothrombin im Sinne dieser Ergebnisse in beide Richtungen, abhängig von der Prothrombin-Plasmakonzentration, sowohl herauf- als auch herabregulierend wirksam (vgl. Abbildung 23A (+) und (-)).

Um auch die Theorie der oben bereits angesprochenen autoregulatorischen positiven Rückkopplung Thrombins weiter zu spezifizieren (vgl. Abbildung 19A und B), erfolgte im nächsten Schritt die Ausschaltung der Thrombin-Aktivität in der Zellkultur durch Argatroban (vgl. Abbildung 19C und D). Argatroban ist ein kleines (527 Da) synthetisches Peptid, das Thrombin als aktiven Thrombin-Inhibitor in seinem aktiven Zentrum reversibel bindet und somit seine katalytische Funktion blockiert (260). Die autokatalytische Thrombin-Aktivierung im Zellkulturmedium wird auf diese Weise unterbunden, sodass keine weitere Thrombin-Aktivierung erfolgen kann. Aufgrund der Tatsache, dass die Applikation von Argatroban keinen hochregulatorischen Effekt auf die F2 Genexpression zeigt, kann die Vermutung aufgestellt werden, dass hohe Thrombin-Konzentrationen zwar eine Hochregulation bewirken, geringe Mengen aktivierten Thrombins jedoch umgekehrt keinen herunterregulierenden Effekt aufweisen. Zusammengefasst können die bisher erhobenen Hinweise auf einen autoregulatorischen Feedbackmechanismus durch das in der Abbildung veranschaulichte Modell illustriert werden:



**Abbildung 23: Modell eines autoregulatorischen Feedbackmechanismus**

Vorhergehende Luciferase Assays auf Basis primärer Hepatozytenkulturen der D-Inspight Mauslinie lassen autoregulatorische Feedbackmechanismen vermuten. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte den folgenden Möglichkeiten entsprechen: (A) Negative Feedbackregulation durch Prothrombin (F2) im Sinne einer Regulation des Verbrauchs bei Aktivierung. Eine niedrige F2 Konzentration führt zur Hochregulation, eine hohe Konzentration dagegen zur Herabregulation der F2 Genexpression. (B) Positive Feedbackregulation durch Thrombin (F2a). F2 wird bei Bedarf zu F2a aktiviert. Hohe Konzentrationen an F2a führen zu einer Hochregulation der F2 Genexpression. Jedoch führt an dieser Stelle eine niedrige Menge an Thrombin nicht zu einer Herunterregulation. Aktiviertes Thrombin könnte etwa durch seine proteolytische Wirkung zu einer Aktivierung von Rezeptoren auf der hepatozytären Oberfläche führen, die durch weiterführende Signalkaskaden die Genregulation induzieren.

Das Modell fasst die in dieser Arbeit erhobenen potentiellen autoregulatorischen Feedbackmechanismen Prothrombins (Abbildung 23A) und Thrombins (Abbildung 23B) zusammen. Die Einflüsse Prothrombins könnten bei niedrigen Plasmakonzentrationen eine induzierende Wirkung, als auch bei hohen Plasmakonzentrationen eine herunterregulierende Wirkung besitzen. Diese Mechanismen könnten beispielsweise unter physiologischen Umständen durch eine Modulation der F2 Genexpression zu einem fein regulierten Equilibrium der Prothrombin Plasmakonzentration führen. Daneben könnte ein starker Anstieg Thrombins im Plasma eine Verbrauchsreaktion unter pathologischen Umständen darstellen, die eine sofortige Induktion der Genexpression zur adäquaten Anpassung der Prothrombin Plasmakonzentrationen erfordert.

Die biologische Signifikanz des Prothrombins ist bisher in weiten Teilen unklar, so wird es in der Literatur häufig lediglich als das Zymogen des Thrombins dargestellt, das definitionsgemäß ein biologisch inaktives Vorläuferprotein repräsentiert (261, 262). Bis heute waren in erster Linie lediglich die zahlreichen Interaktionen und Effekte des aktivierten und proteolytisch aktiven Thrombins bekannt, doch auch für Prothrombin sind zuletzt einige Effekte berichtet worden. So zeigte Carr et. al, dass Prothrombin die DNA-Synthese in Hepatozyten hemmt (263). Wang et al. ergänzte weitere zelluläre Funktionen des Prothrombins, die über Inhibitionen des Zellwachstums bis hin zu hepatozytärer Apoptose (über eine Aktivierung des EGFR/JNK-Weg mittels Integrin- $\alpha$ 5) reichen (264). In dem Modell einer Autoregulation der F2 Expression könnte eine weitere Funktion des Prothrombins liegen und die zahlreichen Effekte Thrombins könnten um das Modell der Autoregulation ergänzt werden. Die zugrunde liegenden intrazellulären Mechanismen inklusive der beteiligten Rezeptoren dürften in künftigen Forschungsunternehmen weiter untersucht werden.

### 4.4 Limitation des Zellkulturmodells

Hinweise auf eine Limitierung des Zellmodells geben die Resultate der Arbeitsgruppe Godoy et al., die sowohl in murinen, als auch in humanen Hepatozytenkulturen bedeutende Veränderungen der Genexpression im Vergleich zum physiologischen Zustand beschreiben. Das Expressionsmuster der Hepatozyten unter Kulturbedingungen ähnelte hier verschiedenen Lebererkrankungen, wie etwa der Leberzirrhose, dem hepatozellulären Karzinom, oder dem inflammatorischen Zustand einer Hepatitis B. Demnach handele es sich bei Hepatozytenkulturen eher um die Nachbildung eines Krankheitsmodelles, als um die Abbildung des physiologischen Zustandes, was bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden sollte (252). Daneben entdeckte Tormos et al., dass die Isolation primärer Hepatozyten oxidativen Stress nach sich zog, und dieser den Ablauf des Zellzyklus störte (265). Dies konnte durch Richart et al. unterstützt werden, der nachwies, dass Hepatozyten nach dem Aussähen auf Zellkulturplatten eine stark veränderte globale Genexpression, insbesondere bezüglich des Phase I/II Metabolismus, dem Fettsäure, dem Lipidmetabolismus und der Apoptose aufwiesen (266). Es stellt sich allerdings die Frage, ob dies auch bei der F2 Expression eine Rolle spielt. Interessanterweise konnte in vivo gezeigt werden, dass hypoxische Zustände eine Heraufregulation der F2 Expression bewirken. So konnte bei ischämischen Vorgängen (Infarkte, Tumoren, Angiogenese) ein vermehrtes Vorkommen von Prothrombin detektiert werden (195, 230-232, 238, 267). Damit bleibt unklar, ob die F2 Genexpression durch den vorübergehenden hypoxischen Zustand während der Isolation und Kultivierung verändert wird. Insgesamt stellen sich möglicherweise bezüglich der F2 Expression und Sekretion bedeutende Unterschiede in den Ergebnissen einer Zellkultur im Vergleich zum physiologischen Mechanismus in Maus und Mensch dar. Dieser Unterschied sollte bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

Bei der Übertragung in klinische Fragestellungen stellt sich zudem weiter die Frage ob potentielle Stimulantien, die im hepatischen Zellmodell eine Regulation bewirken, auch in anderen Geweben, wie etwa im Tumorgewebe dieselben Wirkungen aufweisen. Dies sollte insbesondere bei der Frage nach einer therapeutischen Anwendung potentieller F2 Expressionsregulatoren bedacht und weiter untersucht werden.

### 4.5 Ausblick

Das etablierte Modell einer primären Hepatozytenkultur auf Basis der D-Insight Mauslinie wurde in der vorliegenden Arbeit eigens für die Beleuchtung genregulierender Mechanismen bezüglich der F2 Expression etabliert. Es bietet sich weiter für eine umfangreiche Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen, beispielsweise im Rahmen einer weitergehenden Untersuchung hypothetisch modulierender Substanzen der F2 Genexpression im Hochdurchsatzverfahren, an. Hierbei können die Vorschläge des in Abbildung 21 dargestellten Modells weiterführend untersucht werden. Dies umfasst die Erforschung möglicher interzellulärer Interaktionen oder, gerade im Hinblick auf therapeutische Implikationen, die Untersuchung weiterer physiologischer oder pathologischer (homo- oder heterotypischer) Stimuli und synthetische Substanzen. Eine fortgeführte Untersuchung potentieller Einflussfaktoren auf die F2 Expression wird nicht nur dazu beitragen, die engen Beziehungen zwischen der Blutgerinnung, inflammatorischen Prozessen und der Tumorbilogie weiter zu entschlüsseln, sondern wird eventuell auch eine Grundlage zur Entwicklung vielseitiger therapeutischer Ansätze, auch außerhalb des hämostatischen Systems, bieten (268).

### 5 Zusammenfassung

Thrombin ist als Schlüsselprotein der Hämostase für die Generierung eines Thrombus zur Blutstillung und zur Wiederherstellung der Gefäßintegrität bei Gefäßverletzung von zentraler Bedeutung. Hierbei spielt nicht nur seine proteolytische Aktivität eine Rolle, die zur Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin ausschlaggebend ist. Desweiteren ist Thrombin durch Aktivierung von PAR-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche zur Thrombozytenaktivierung fähig, welches zur Ausschüttung verschiedener für den Ablauf der Koagulation wichtigen Mediatoren führt (11). Neben seiner zentralen Rolle in der Hämostase spielt Thrombin außerdem wichtige Rollen in weiteren (patho)physiologischen Zuständen, darunter zählen die embryonale Entwicklung (194, 195, 269) und die Angiogenese (61, 62), aber auch inflammatorische Prozesse (71, 88) sowie die Tumorbilogie (52, 123). Obwohl die Funktion des Thrombins im Rahmen der Gerinnung, aber auch seiner weiteren Funktionen immer besser verstanden wird, ist bisher wenig bekannt über die Mechanismen, die der Regulation seiner Genexpression unterliegen und durch welche Faktoren diese beeinflusst wird.

Mit der Etablierung eines hepatozytären Zellkulturmodells auf Basis der D-InSight Mauslinie wurde in der vorliegenden Arbeit hierfür ein praktikables Instrument etabliert. Mit diesem kann die F2 Expression und Prothrombin Sekretion der Hepatozyten in Echtzeit mittels der Lumineszenzreporter FLuc und RLuc nachverfolgt werden. Das Modell steht auch künftig für die weitere Nachverfolgung der F2 Genexpression und der weitergehenden Untersuchung stimulierender Substanzen zur Verfügung. Es konnte mithilfe dieses Modells eine von der Zellkonfluenz und der Inkubationsdauer unterschiedlich regulierte Genexpression gezeigt werden. Dieses legt die Existenz genregulierender Mechanismen nahe. Bei Betrachtung der Prothrombinsekretion ins Medium konnten zudem stets konstante Prothrombin Konzentrationen gezeigt werden, die einer stark variierenden F2 Genexpression unterlag. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine hohe Prothrombinkonzentration im Medium einen negativen Feedbackmechanismus auf die F2 Expression bewirkt.

Weiter wurde das F2 Expressionslevel mithilfe von Co-Kulturen (mit MEFs bzw. HeLas) untersucht. Hierbei konnte eine variierende F2 Genexpression in Reaktion auf diese unterschiedlichen Umgebungseinflüsse gezeigt werden. So wurde die F2 Expression in Co-Kulturen mit (ebenfalls physiologischerweise in der Leber ansässigen) Fibroblasten (MEFs) tendenziell induziert, während sie in der Co-Kultur mit malignen Tumorzellen (HeLas), signifikant induziert wurde. Hier könnten sowohl direkte interzelluläre Interaktionen (Zell-Zell-Interaktionen), als auch indirekte Interaktionen der Zellen durch ins Medium sezernierte Substanzen eine Rolle spielen. Da HeLa Zellen neben anderen proinflammatorischen Zytokinen und tumorassoziierten Proteinen auch Tissue Factor exprimieren, kann hier vermutet werden, dass eine Thrombinaktivierung stattfindet. Das aktivierte Thrombin könnte hier für die Induktion der F2 Genexpression verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang wäre auch eine Induktion der F2 Expression durch erniedrigte Prothrombinkonzentrationen denkbar, die nach der stattgehabten Thrombin Generierung verbleiben.

Weiter konnten unter direkter Stimulation der Zellen mit aktiviertem Thrombin sowie dem Thrombin-Inhibitor Argatroban die zuvor erhobenen Hinweise auf einen Trend zur Heraufregulation der Expression unter dem Einfluss aktivierten Thrombins bestätigt werden. Meine Ergebnisse liefern somit erste Anhaltspunkte für autoregulatorische Mechanismen, die der F2 Genexpression zugrunde liegen. Zudem ist davon auszugehen, dass eine Anpassung an pathologische Zustände potentiell durch weitere fremdregulatorische Mechanismen stimuliert werden. Eine direkte Applikation des sowohl inflammatorisch als auch tumorassoziierten Proteins MMP-1 führte ebenfalls zu einer Induktion der F2 Expression. Der Effekt könnte unter anderem durch eine katalytische Aktivierung von PAR-1 und einer nachfolgenden p38 MAP Kinase-Aktivierung erfolgen, die konsekutiv zu einer Induktion der F2 Expression führt. Eine Applikation des gerinnungshemmenden Therapeutikums

## Zusammenfassung

Phenprocoumon zeigte keine Regulierung der F2 Expression, obschon seine klinische Anwendung dennoch sowohl bei hämostatischen als auch tumor-assoziierten Pathologien induziert sein kann.

Letztlich können mithilfe des in dieser Arbeit etablierten D-Insight Zellkulturmodells in künftigen Forschungsprojekten nicht nur weitergehende direkte Zell-Zell-Interaktionen, sondern auch weitere indirekt auf die Zellen einwirkende Substanzen untersucht werden. Hierbei können insbesondere die Hinweise auf einen autoregulatorischen Mechanismus weiter spezifiziert und weitere mögliche Einflussfaktoren der F2 Genexpression in fortgeführten Screenings in großem Umfang identifiziert werden, mit letztlich potentiell therapeutischen Implikationen.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.
2. Krem MM, Di Cera E. Molecular markers of serine protease evolution. *EMBO J.* 2001;20(12):3036-45.
3. Krem MM, Di Cera E. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem Sci.* 2002;27(2):67-74.
4. Patthy L. Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell.* 1985;41(3):657-63.
5. Day HJ. Role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Ser Haematol.* 1975;8(3):23-37.
6. Macfarlane RG. AN ENZYME CASCADE IN THE BLOOD CLOTTING MECHANISM, AND ITS FUNCTION AS A BIOCHEMICAL AMPLIFIER. *Nature.* 1964;202:498-9.
7. Davie EW, Ratnoff OD. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science.* 1964;145(3638):1310-2.
8. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):958-65.
9. Davie EW. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *J Biol Chem.* 2003;278(51):50819-32.
10. Stassen JM, Arnout J, Deckmyn H. The hemostatic system. *Curr Med Chem.* 2004;11(17):2245-60.
11. Broos K, Feys HB, De Meyer SF, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H. Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev.* 2011;25(4):155-67.
12. Byrnes JR, Wolberg AS. Red blood cells in thrombosis. *Blood.* 2017;130(16):1795-9.
13. Collen D. Fibrin-specific thrombolytic agents. *Klin Wochenschr.* 1988;66 Suppl 12:15-23.
14. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003;9(4):458-62.
15. Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinolysis: Biochemistry, Clinical Aspects, and Therapeutic Potential. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43(2):113-4.

## Literaturverzeichnis

16. Harter K, Levine M, Henderson SO. Anticoagulation drug therapy: a review. *West J Emerg Med.* 2015;16(1):11-7.
17. Periyah MH, Halim AS, Mat Saad AZ. Mechanism Action of Platelets and Crucial Blood Coagulation Pathways in Hemostasis. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2017;11(4):319-27.
18. De Marco L, Girolami A, Russell S, Ruggeri ZM. Interaction of asialo von Willebrand factor with glycoprotein Ib induces fibrinogen binding to the glycoprotein IIb/IIIa complex and mediates platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1985;75(4):1198-203.
19. Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1568-73.
20. Marguerie GA, Plow EF, Edgington TS. Human platelets possess an inducible and saturable receptor specific for fibrinogen. *J Biol Chem.* 1979;254(12):5357-63.
21. Nakamura T, Kambayashi J, Okuma M, Tandon NN. Activation of the GP IIb-IIIa complex induced by platelet adhesion to collagen is mediated by both alpha2beta1 integrin and GP VI. *J Biol Chem.* 1999;274(17):11897-903.
22. Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:95-101.
23. Ozaki Y, Asazuma N, Suzuki-Inoue K, Berndt MC. Platelet GPIb-IX-V-dependent signaling. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1745-51.
24. Löwenberg EC, Meijers JC, Levi M. Platelet-vessel wall interaction in health and disease. *Neth J Med.* 2010;68(6):242-51.
25. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-8.
26. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(5):2311-5.
27. Osterud B. The role of platelets in decrypting monocyte tissue factor. *Semin Hematol.* 2001;38(4 Suppl 12):2-5.
28. Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotsch M, Spannagl M, Kauke T, et al. Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;281(2):603-9.
29. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood.* 1993;81(3):734-44.

## Literaturverzeichnis

30. Blostein MD, Furie BC, Rajotte I, Furie B. The Gla domain of factor IXa binds to factor VIIIa in the tenase complex. *J Biol Chem.* 2003;278(33):31297-302.
31. Davie EW, Fujikawa K, Kurachi K, Kisiel W. The role of serine proteases in the blood coagulation cascade. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1979;48:277-318.
32. Mann KG. Thrombin formation. *Chest.* 2003;124(3 Suppl):4s-10s.
33. Mann KG, Brummel K, Butenas S. What is all that thrombin for? *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1504-14.
34. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* 2007;21(3):131-42.
35. Weisel JW, Litvinov RI. Mechanisms of fibrin polymerization and clinical implications. *Blood.* 2013;121(10):1712-9.
36. Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood.* 2002;100(3):743-54.
37. Lorand L, Downey J, Gotoh T, Jacobsen A, Tokura S. The transpeptidase system which crosslinks fibrin by gamma-glutamyl-epsilon-lysine bonds. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968;31(2):222-30.
38. Aleman M, Walton B, Byrnes J, Wolberg A. Fibrinogen and red blood cells in venous thrombosis. *Thromb Res.* 2014;133 Suppl 1:S38-40.
39. Adams RL, Bird RJ. Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants. *Nephrology (Carlton).* 2009;14(5):462-70.
40. Collen D, Lijnen HR. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost.* 1995;74(1):167-71.
41. Bajzar L, Manuel R, Nesheim ME. Purification and characterization of TAFI, a thrombin-activable fibrinolysis inhibitor. *J Biol Chem.* 1995;270(24):14477-84.
42. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem.* 1996;271(28):16603-8.
43. de Munk GA, Groeneveld E, Rijken DC. Acceleration of the thrombin inactivation of single chain urokinase-type plasminogen activator (pro-urokinase) by thrombomodulin. *J Clin Invest.* 1991;88(5):1680-4.
44. Esmon NL, Owen WG, Esmon CT. Isolation of a membrane-bound cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. *J Biol Chem.* 1982;257(2):859-64.

## Literaturverzeichnis

45. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):26s-32s.
46. Olson ST, Chuang YJ. Heparin activates antithrombin anticoagulant function by generating new interaction sites (exosites) for blood clotting proteinases. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12(8):331-8.
47. Tollefsen DM. Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(3):454-60.
48. Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. *J Biol Chem*. 1982;257(5):2162-9.
49. Rosenberg RD, Damus PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem*. 1973;248(18):6490-505.
50. Krüger-Genge A, Blocki A, Franke R-P, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):4411.
51. Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1861-72.
52. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med (Berl)*. 2013;91(11):1257-71.
53. Chen LB, Buchanan JM. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(1):131-5.
54. Cavanaugh KP, Gurwitz D, Cunningham DD, Bradshaw RA. Reciprocal modulation of astrocyte stellation by thrombin and protease nexin-1. *J Neurochem*. 1990;54(5):1735-43.
55. Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Jr., Coughlin SR. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature*. 1996;381(6582):516-9.
56. Jagadeeswaran P, Liu YC. Developmental expression of thrombin in zebrafish embryos: a novel model to study hemostasis. *Blood Cells Mol Dis*. 1997;23(2):147-56.
57. Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science*. 2001;293(5535):1666-70.
58. Hassan HJ, Leonardi A, Chelucci C, Mattia G, Macioce G, Guerriero R, et al. Blood coagulation factors in human embryonic-fetal development: preferential expression of the FVII/tissue factor pathway. *Blood*. 1990;76(6):1158-64.

## Literaturverzeichnis

59. Soifer SJ, Peters KG, O'Keefe J, Coughlin SR. Disparate temporal expression of the prothrombin and thrombin receptor genes during mouse development. *Am J Pathol.* 1994;144(1):60-9.
60. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Thrombin's central role in angiogenesis and pathophysiological processes. *Eur Cytokine Netw.* 2009;20(4):171-9.
61. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(2):173-7.
62. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(1):63-9.
63. Moser M, Patterson C. Thrombin and vascular development: a sticky subject. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(6):922-30.
64. Imokawa Y, Brockes JP. Selective Activation of Thrombin Is a Critical Determinant for Vertebrate Lens Regeneration. *Curr Biol.* 2003;13(10):877-81.
65. Maden M. Regeneration: Every Clot Has a Thrombin Lining. *Curr Biol.* 2003;13(13):R517-R8.
66. Turgeon VL, Houenou LJ. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997;25(1):85-95.
67. Pompili E, Fabrizi C. Thrombin in peripheral nerves: friend or foe? *Neural Regen Res.* 2021;16(6):1223-4.
68. Bar-Shavit R, Kahn A, Fenton JW, 2nd, Wilner GD. Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J Cell Biol.* 1983;96(1):282-5.
69. Naldini A, Sower L, Bocci V, Meyers B, Carney DH. Thrombin receptor expression and responsiveness of human monocytic cells to thrombin is linked to interferon-induced cellular differentiation. *J Cell Physiol.* 1998;177(1):76-84.
70. Pervin R, Kanner BI, Marx G, Razin E. Thrombin-induced degranulation of cultured bone marrow-derived mast cells: effect on calcium uptake. *Immunology.* 1985;56(4):667-72.
71. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(10):776-87.
72. Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res.* 2004;114(5-6):321-7.
73. Borissoff JI, Spronk HM, Heeneman S, ten Cate H. Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res.* 2009;82(3):392-403.

## Literaturverzeichnis

74. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*. 2006;10(5):355-62.
75. Willis Fox O, Preston RJS. Molecular basis of protease-activated receptor 1 signaling diversity. *J Thromb Haemost*. 2020;18(1):6-16.
76. Donovan FM, Cunningham DD. Signaling pathways involved in thrombin-induced cell protection. *J Biol Chem*. 1998;273(21):12746-52.
77. Papareddy P, Kasetty G, Alyafei S, Smeds E, Salo-Ahen OMH, Hansson SR, et al. An ecoimmunological approach to study evolutionary and ancient links between coagulation, complement and Innate immunity. *Virulence*. 2018;9(1):724-37.
78. Amara U, Rittirsch D, Flierl M, Bruckner U, Klos A, Gebhard F, et al. Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol*. 2008;632:71-9.
79. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*. 2006;12(6):682-7.
80. Amara U, Flierl MA, Rittirsch D, Klos A, Chen H, Acker B, et al. Molecular intercommunication between the complement and coagulation systems. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2010;185(9):5628-36.
81. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97.
82. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*. 1999;283(5405):1183-6.
83. Joyce DE, Chen Y, Erger RA, Koretzky GA, Lentz SR. Functional interactions between the thrombin receptor and the T-cell antigen receptor in human T-cell lines. *Blood*. 1997;90(5):1893-901.
84. Naldini A, Bernini C, Pucci A, Carraro F. Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *J Leukoc Biol*. 2005;78(3):736-44.
85. Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A, Aarden L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol*. 1998;160(10):5130-5.
86. Mari B, Imbert V, Belhacene N, Far DF, Peyron JF, Pouysségur J, et al. Thrombin and thrombin receptor agonist peptide induce early events of T cell activation and synergize with TCR cross-linking for CD69 expression and interleukin 2 production. *J Biol Chem*. 1994;269(11):8517-23.

## Literaturverzeichnis

87. Chen D, Dorling A. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:122-6.
88. Popović M, Smiljanić K, Dobutović B, Syrovets T, Simmet T, Isenović ER. Thrombin and vascular inflammation. *Mol Cell Biochem.* 2012;359(1-2):301-13.
89. Nawroth PP, Stern DM. A pathway of coagulation on endothelial cells. *J Cell Biochem.* 1985;28(4):253-64.
90. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost.* 2005;3(8):1800-14.
91. Hou L, Howells GL, Kapas S, Macey MG. The protease-activated receptors and their cellular expression and function in blood-related cells. *Br J Haematol.* 1998;101(1):1-9.
92. Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, et al. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest.* 1993;91(5):2253-9.
93. Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schönbeck U. Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25032-9.
94. Sugama Y, Tiruppathi C, offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, 2nd, Malik AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol.* 1992;119(4):935-44.
95. Ferrara N. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *Eur Cytokine Netw.* 2009;20(4):158-63.
96. Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(5):630-8.
97. Murakami M, Nguyen LT, Zhuang ZW, Moodie KL, Carmeliet P, Stan RV, et al. The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest.* 2008;118(10):3355-66.
98. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol.* 2010;20(9):556-67.
99. Chung SW, Park JW, Lee SA, Eo SK, Kim K. Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(3):748-54.
100. Morris R, Winyard PG, Blake DR, Morris CJ. Thrombin in inflammation and healing: relevance to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1994;53(1):72-9.

## Literaturverzeichnis

101. Shin H, Nakajima T, Kitajima I, Shigeta K, Abeyama K, Imamura T, et al. Thrombin receptor-mediated synovial proliferation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;76(3 Pt 1):225-33.
102. Chapman J. Thrombin in inflammatory brain diseases. *Autoimmun Rev.* 2006;5(8):528-31.
103. Grammas P, Samany PG, Thirumangalakudi L. Thrombin and inflammatory proteins are elevated in Alzheimer's disease microvessels: implications for disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis.* 2006;9(1):51-8.
104. Mhatre M, Nguyen A, Kashani S, Pham T, Adesina A, Grammas P. Thrombin, a mediator of neurotoxicity and memory impairment. *Neurobiol Aging.* 2004;25(6):783-93.
105. Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg.* 1996;84(1):91-6.
106. Lee KR, Drury I, Vitarbo E, Hoff JT. Seizures induced by intracerebral injection of thrombin: a model of intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg.* 1997;87(1):73-8.
107. Riek-Burchardt M, Striggow F, Henrich-Noack P, Reiser G, Reymann K. Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. *Neurosci Lett.* 2002;329:181-4.
108. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* 1996;88(10):3698-703.
109. Lyman GH, Khorana AA. Cancer, clots and consensus: new understanding of an old problem. *J Clin Oncol.* 2009;27(29):4821-6.
110. Franchini M, Montagnana M, Targher G, Manzato F, Lippi G. Pathogenesis, clinical and laboratory aspects of thrombosis in cancer. *J Thromb Thrombolysis.* 2007;24(1):29-38.
111. Khorana AA. Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym. *J Thromb Haemost.* 2003;1(12):2463-5.
112. Vitamin K deficiency in the newborn. *Lancet.* 1985;2(8457):728-9.
113. Miller GJ, Bauer KA, Howarth DJ, Cooper JA, Humphries SE, Rosenberg RD. Increased incidence of neoplasia of the digestive tract in men with persistent activation of the coagulant pathway. *J Thromb Haemost.* 2004;2(12):2107-14.
114. Ay C, Dunkler D, Simanek R, Thaler J, Koder S, Marosi C, et al. Prediction of venous thromboembolism in patients with cancer by measuring thrombin generation: results from the Vienna Cancer and Thrombosis Study. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2099-103.



## Literaturverzeichnis

115. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008;454(7203):436-44.
116. Degen JL, Palumbo JS. Hemostatic factors, innate immunity and malignancy. *Thromb Res*. 2012;129 Suppl 1:S1-5.
117. Palumbo JS. Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor dissemination. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(2):154-60.
118. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer. *Semin Thromb Hemost*. 2008;34(2):147-53.
119. Schaffner F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(12):1999-2004.
120. Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*. 2003;124(3 Suppl):58s-68s.
121. Nierodzik ML, Chen K, Takeshita K, Li JJ, Huang YQ, Feng XS, et al. Protease-activated receptor 1 (PAR-1) is required and rate-limiting for thrombin-enhanced experimental pulmonary metastasis. *Blood*. 1998;92(10):3694-700.
122. Zain J, Huang YQ, Feng X, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood*. 2000;95(10):3133-8.
123. Green D, Karpatkin S. Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle*. 2010;9(4):656-61.
124. Carney DH, Stiernberg J, Fenton JW, 2nd. Initiation of proliferative events by human alpha-thrombin requires both receptor binding and enzymic activity. *J Cell Biochem*. 1984;26(3):181-95.
125. Nierodzik ML, Kajumo F, Karpatkin S. Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. *Cancer Res*. 1992;52(12):3267-72.
126. Hu L, Lee M, Campbell W, Perez-Soler R, Karpatkin S. Role of endogenous thrombin in tumor implantation, seeding, and spontaneous metastasis. *Blood*. 2004;104(9):2746-51.
127. Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Nelson KK, Walz DA, Diglio CA, Honn KV. Thrombin enhances tumor cell adhesive and metastatic properties via increased alpha IIb beta 3 expression on the cell surface. *Thromb Res*. 1992;68(3):233-45.
128. Nierodzik ML, Bain RM, Liu LX, Shivji M, Takeshita K, Karpatkin S. Presence of the seven transmembrane thrombin receptor on human tumour cells: effect of activation on tumour adhesion to platelets and tumor tyrosine phosphorylation. *Br J Haematol*. 1996;92(2):452-7.

## Literaturverzeichnis

129. Klepfish A, Greco MA, Karpatkin S. Thrombin stimulates melanoma tumor-cell binding to endothelial cells and subendothelial matrix. *Int J Cancer*. 1993;53(6):978-82.
130. Konstantoulaki M, Kouklis P, Malik AB. Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(2):L434-42.
131. Radjabi AR, Sawada K, Jagadeeswaran S, Eichbichler A, Kenny HA, Montag A, et al. Thrombin induces tumor invasion through the induction and association of matrix metalloproteinase-9 and beta1-integrin on the cell surface. *J Biol Chem*. 2008;283(5):2822-34.
132. Wojtukiewicz MZ, Tang DG, Ciarelli JJ, Nelson KK, Walz DA, Diglio CA, et al. Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells. *Int J Cancer*. 1993;54(5):793-806.
133. Wysoczynski M, Liu R, Kucia M, Drukala J, Ratajczak MZ. Thrombin regulates the metastatic potential of human rhabdomyosarcoma cells: distinct role of PAR1 and PAR3 signaling. *Mol Cancer Res*. 2010;8(5):677-90.
134. Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(2):663-8.
135. Li JJ, Huang YQ, Basch R, Karpatkin S. Thrombin induces the release of angiopoietin-1 from platelets. *Thromb Haemost*. 2001;85(2):204-6.
136. Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karpatkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiopoietin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*. 2002;99(5):1646-50.
137. Wang L, Luo J, He S. Induction of MMP-9 release from human dermal fibroblasts by thrombin: involvement of JAK/STAT3 signaling pathway in MMP-9 release. *BMC Cell Biol*. 2007;8:14.
138. Fang Q, Liu X, Al-Mugotir M, Kobayashi T, Abe S, Kohyama T, et al. Thrombin and TNF-alpha/IL-1beta synergistically induce fibroblast-mediated collagen gel degradation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(6):714-21.
139. Henderson JM, Stein SF, Kutner M, Wiles MB, Ansley JD, Rudman D. Analysis of Twenty-three plasma proteins in ascites. The depletion of fibrinogen and plasminogen. *Ann Surg*. 1980;192(6):738-42.
140. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D160-4.
141. Bode W, Turk D, Karshikov A. The refined 1.9-A X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. *Protein Sci*. 1992;1(4):426-71.

## Literaturverzeichnis

142. Degen SJ, Davie EW. The prothrombin gene and serine proteinase evolution. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;485:66-72.
143. Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J. The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment. *EMBO J.* 1989;8(11):3467-75.
144. Degen SJ. The prothrombin gene and its liver-specific expression. *Semin Thromb Hemost.* 1992;18(2):230-42.
145. Pozzi N, Chen Z, Gohara DW, Niu W, Heyduk T, Di Cera E. Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J Biol Chem.* 2013;288(31):22734-44.
146. Tie JK, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost.* 2016;14(2):236-47.
147. Vermeer C. Gamma-carboxyglutamate-containing proteins and the vitamin K-dependent carboxylase. *Biochem J.* 1990;266(3):625-36.
148. Degen SJ, Davie EW. Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin. *Biochemistry.* 1987;26(19):6165-77.
149. Hamed A, Matagrín B, Spohn G, Prouillac C, Benoit E, Lattard V. VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. *J Biol Chem.* 2013;288(40):28733-42.
150. Eichinger S. Reversing vitamin K antagonists: making the old new again. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2016;2016(1):605-11.
151. Butt HR, Allen EV, Bollman JL. A preparation from spoiled sweet clover. 3, 3'-methylene-bis-(4-hydroxy-coumarin) which prolongs coagulation and prothrombin time of the blood: preliminary report of experimental and clinical studies. *Proceedings of Staff Meetings of the Mayo Clinic.* 1941;16:388-95.
152. Qureshi SH, Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Membrane-dependent interaction of factor Xa and prothrombin with factor Va in the prothrombinase complex. *Biochemistry.* 2009;48(22):5034-41.
153. Wood JP, Silveira JR, Maille NM, Haynes LM, Tracy PB. Prothrombin activation on the activated platelet surface optimizes expression of procoagulant activity. *Blood.* 2011;117(5):1710-8.
154. Hageman TC, Scheraga HA. Mechanism of action of thrombin on fibrinogen. Reaction of the N-terminal CNBr fragment from the A $\alpha$  chain of human fibrinogen with bovine thrombin. *Arch Biochem Biophys.* 1974;164(2):707-15.

## Literaturverzeichnis

155. Boknäs N, Faxälv L, Sanchez Centellas D, Wallstedt M, Ramström S, Grenegård M, et al. Thrombin-induced platelet activation via PAR4: pivotal role for exosite II. *Thromb Haemost.* 2014;112(3):558-65.
156. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(20):11023-7.
157. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature.* 2000;407(6801):258-64.
158. Schmidt VA, Nierman WC, Feldblyum TV, Maglott DR, Bahou WF. The human thrombin receptor and proteinase activated receptor-2 genes are tightly linked on chromosome 5q13. *Br J Haematol.* 1997;97(3):523-9.
159. Kahn ML, Hammes SR, Botka C, Coughlin SR. Gene and locus structure and chromosomal localization of the protease-activated receptor gene family. *J Biol Chem.* 1998;273(36):23290-6.
160. Adams MN, Ramachandran R, Yau MK, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacol Ther.* 2011;130(3):248-82.
161. Lin H, Liu AP, Smith TH, Trejo J. Cofactoring and dimerization of proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2013;65(4):1198-213.
162. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell.* 1991;64(6):1057-68.
163. Vu TK, Wheaton VI, Hung DT, Charo I, Coughlin SR. Domains specifying thrombin-receptor interaction. *Nature.* 1991;353(6345):674-7.
164. Soh UJ, Dores MR, Chen B, Trejo J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol.* 2010;160(2):191-203.
165. Gerszten RE, Chen J, Ishii M, Ishii K, Wang L, Nanevicz T, et al. Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature.* 1994;368(6472):648-51.
166. Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature.* 2000;404(6778):609-13.
167. Oldham WM, Hamm HE. How do receptors activate G proteins? *Adv Protein Chem.* 2007;74:67-93.
168. Oldham WM, Hamm HE. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):60-71.

## Literaturverzeichnis

169. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev.* 2001;53(2):245-82.
170. Heuberger DM, Schuepbach RA. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thrombosis journal.* 2019;17:4-.
171. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature.* 1997;386(6624):502-6.
172. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(12):6642-6.
173. Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, et al. A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature.* 1998;394(6694):690-4.
174. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(20):9208-12.
175. Molino M, Barnathan ES, Numerof R, Clark J, Dreyer M, Cumashi A, et al. Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem.* 1997;272(7):4043-9.
176. Camerer E, Huang W, Coughlin SR. Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2000;97(10):5255.
177. Loew D, Perrault C, Morales M, Moog S, Ravanat C, Schuhler S, et al. Proteolysis of the exodomain of recombinant protease-activated receptors: prediction of receptor activation or inactivation by MALDI mass spectrometry. *Biochemistry.* 2000;39(35):10812-22.
178. Mihara K, Ramachandran R, Saifeddine M, Hansen KK, Renaux B, Polley D, et al. Thrombin-Mediated Direct Activation of Proteinase-Activated Receptor-2: Another Target for Thrombin Signaling. *Mol Pharmacol.* 2016;89(5):606-14.
179. Russo A, Soh UJ, Paing MM, Arora P, Trejo J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(15):6393-7.
180. Zhao P, Metcalf M, Bunnett NW. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:67.
181. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Hung DT, Rose J, Vu TK, et al. Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J Biol Chem.* 1992;267(19):13146-9.
182. Chen J, Ishii M, Wang L, Ishii K, Coughlin SR. Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an

## Literaturverzeichnis

- alternative intermolecular liganding mode. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(23):16041-5.
183. Lerner DJ, Chen M, Tram T, Coughlin SR. Agonist recognition by proteinase-activated receptor 2 and thrombin receptor. Importance of extracellular loop interactions for receptor function. *J Biol Chem*. 1996;271(24):13943-7.
184. Hollenberg MD, Mihara K, Polley D, Suen JY, Han A, Fairlie DP, et al. Biased signalling and proteinase-activated receptors (PARs): targeting inflammatory disease. *Br J Pharmacol*. 2014;171(5):1180-94.
185. Kahn ML, Nakanishi-Matsui M, Shapiro MJ, Ishihara H, Coughlin SR. Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J Clin Invest*. 1999;103(6):879-87.
186. Dorsam RT, Kim S, Jin J, Kunapuli SP. Coordinated signaling through both G12/13 and G(i) pathways is sufficient to activate GPIIb/IIIa in human platelets. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47588-95.
187. Leger AJ, Jacques SL, Badar J, Kaneider NC, Derian CK, Andrade-Gordon P, et al. Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation*. 2006;113(9):1244-54.
188. Gieseler F, Ungefroren H, Settmacher U, Hollenberg MD, Kaufmann R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal*. 2013;11:86-.
189. Meeks SL, Abshire TC. Abnormalities of prothrombin: a review of the pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Haemophilia*. 2008;14(6):1159-63.
190. Degen SJ, MacGillivray RT, Davie EW. Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin. *Biochemistry*. 1983;22(9):2087-97.
191. Lancellotti S, Basso M, De Cristofaro R. Congenital prothrombin deficiency: an update. *Semin Thromb Hemost*. 2013;39(6):596-606.
192. Aradjanski M, Djordjevic V, Pruner I, Tomic B, Gvozdenov M, Kovac M, et al. The 3' end prothrombin gene variants in serbian patients with idiopathic thrombophilia. *Balkan J Med Genet*. 2014;17(2):43-8.
193. Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron*. 1991;6(4):575-81.
194. Sun WY, Witte DP, Degen JL, Colbert MC, Burkart MC, Holmbäck K, et al. Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7597-602.

## Literaturverzeichnis

195. Xue J, Wu Q, Westfield LA, Tuley EA, Lu D, Zhang Q, et al. Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(13):7603-7.
196. Poort SR, Njo KT, Vos HL, Bertina RM. Two novel mutations in the prothrombin gene cause severe bleeding in a compound heterozygous patient. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;9(8):761-4.
197. Girolami A, Ferrari S, Cosi E, Girolami B, Lombardi AM. Congenital prothrombin defects: they are not only associated with bleeding but also with thrombosis: a new classification is needed. *Hematology*. 2018;23(2):105-10.
198. Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, et al. Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet*. 2001;28(4):389-92.
199. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *J Thromb Haemost*. 2004;2(1):119-27.
200. Carter AM, Sachchithananthan M, Stasinopoulos S, Maurer F, Medcalf RL. Prothrombin G20210A is a bifunctional gene polymorphism. *Thromb Haemost*. 2002;87(5):846-53.
201. Jacobson A, Peltz SW. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 1996;65:693-739.
202. Muñoz M, Vilos C, Cantín M. Prothrombin C20209T mutation in deep vein thrombosis: a case report. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(7):11225-9.
203. Ceelie H, Bertina RM, van Hylckama Vlieg A, Rosendaal FR, Vos HL. Polymorphisms in the prothrombin gene and their association with plasma prothrombin levels. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):1066-70.
204. Nierodzik M, Karpatkin S. Hypercoagulability preceding cancer. Does hypercoagulability awaken dormant tumor cells in the host? *J Thromb Haemost*. 2005;3(3):577-80.
205. Pasma JJ, Posthuma JJ, Spronk HM. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J Thromb Haemost*. 2016;14(10):1908-16.
206. de Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1987;7(2):725-37.
207. Salem ESB, Murakami K, Takahashi T, Bernhard E, Borra V, Bethi M, et al. Isolation of Primary Mouse Hepatocytes for Nascent Protein Synthesis Analysis by Non-radioactive L-azidohomoalanine Labeling Method. *J Vis Exp*. 2018(140).

## Literaturverzeichnis

208. Olsavsky KM, Page JL, Johnson MC, Zarbl H, Strom SC, Omiecinski CJ. Gene expression profiling and differentiation assessment in primary human hepatocyte cultures, established hepatoma cell lines, and human liver tissues. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;222(1):42-56.
209. Ghaffari A, Li Y, Karami A, Ghaffari M, Tredget EE, Ghahary A. Fibroblast extracellular matrix gene expression in response to keratinocyte-releasable stratifin. *J Cell Biochem.* 2006;98(2):383-93.
210. Houssaint E. Differentiation of the mouse hepatic primordium. I. An analysis of tissue interactions in hepatocyte differentiation. *Cell Differ.* 1980;9(5):269-79.
211. Guguen-Guillouzo C, Clément B, Baffet G, Beaumont C, Morel-Chany E, Glaise D, et al. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp Cell Res.* 1983;143(1):47-54.
212. Wang G, Zheng Y, Wang Y, Cai Z, Liao N, Liu J, et al. Co-culture system of hepatocytes and endothelial cells: two in vitro approaches for enhancing liver-specific functions of hepatocytes. *Cytotechnology.* 2018;70(4):1279-90.
213. Clement B, Guguen-Guillouzo C, Campion JP, Glaise D, Bourel M, Guillouzo A. Long-term co-cultures of adult human hepatocytes with rat liver epithelial cells: modulation of albumin secretion and accumulation of extracellular material. *Hepatology.* 1984;4(3):373-80.
214. Mesnil M, Fraslin JM, Piccoli C, Yamasaki H, Guguen-Guillouzo C. Cell contact but not junctional communication (dye coupling) with biliary epithelial cells is required for hepatocytes to maintain differentiated functions. *Exp Cell Res.* 1987;173(2):524-33.
215. Donato MT, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Drug metabolizing enzymes in rat hepatocytes co-cultured with cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990;26(11):1057-62.
216. Rincón-Sánchez AR, Hernández A, López ML, Mendoza-Figueroa T. Synthesis and secretion of lipids by long-term cultures of female rat hepatocytes. *Biol Cell.* 1992;76(2):131-8.
217. Morin O, Goulet F, Normand C. Liver sinusoidal endothelial cells: isolation, purification, characterization and interaction with hepatocytes. *Revis Biol Celular.* 1988;15:1-85.
218. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Microfabrication of hepatocyte/fibroblast co-cultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol Prog.* 1998;14(3):378-87.
219. Kim D, Seo Y, Kwon S. Role of gap junction communication in hepatocyte/fibroblast co-cultures: Implications for hepatic tissue engineering. *Biotechnology and Bioprocess Engineering.* 2015;20(2):358-65.
220. Dunn JC, Tompkins RG, Yarmush ML. Hepatocytes in collagen sandwich: evidence for transcriptional and translational regulation. *J Cell Biol.* 1992;116(4):1043-53.



## Literaturverzeichnis

221. Bhatia SN, Balis UJ, Yarmush ML, Toner M. Probing heterotypic cell interactions: hepatocyte function in microfabricated co-cultures. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1998;9(11):1137-60.
222. Wang C, Chi Q, Xu C, Xu K, Zhang Y, Liu Y, et al. Expression of LOXs and MMP-1, 2, 3 by ACL Fibroblasts and Synoviocytes Impact of Coculture and TNF- $\alpha$ . *J Knee Surg.* 2019;32(4):352-60.
223. Bainbridge P. Wound healing and the role of fibroblasts. *J Wound Care.* 2013;22(8):407-8, 10-12.
224. Schuetz EG, Li D, Omiecinski CJ, Muller-Eberhard U, Kleinman HK, Elswick B, et al. Regulation of gene expression in adult rat hepatocytes cultured on a basement membrane matrix. *J Cell Physiol.* 1988;134(3):309-23.
225. Fujita M, Spray DC, Choi H, Saez J, Jefferson DM, Hertzberg E, et al. Extracellular matrix regulation of cell-cell communication and tissue-specific gene expression in primary liver cultures. *Prog Clin Biol Res.* 1986;226:333-60.
226. Otsu K, Ito K, Kuzumaki T, Iuchi Y. Differential regulation of liver-specific and ubiquitously-expressed genes in primary rat hepatocytes by the extracellular matrix. *Cell Physiol Biochem.* 2001;11(1):33-40.
227. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA.* 2005;293(6):715-22.
228. Ruf W, Mueller BM. Thrombin generation and the pathogenesis of cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32 Suppl 1:61-8.
229. Gilbert LA, Hemann MT. DNA damage-mediated induction of a chemoresistant niche. *Cell.* 2010;143(3):355-66.
230. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.
231. Danckwardt S, Gantzer AS, Macher-Goeppinger S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, et al. p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell.* 2011;41(3):298-310.
232. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, et al. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem.* 1995;270(13):7420-6.
233. Yin X, Wright J, Wall T, Grammas P. Brain endothelial cells synthesize neurotoxic thrombin in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 2010;176(4):1600-6.
234. Murakami H, Okazaki M, Amagasa H, Oguchi K. Increase in hepatic mRNA expression of coagulant factors in type 2 diabetic model mice. *Thromb Res.* 2003;111(1-2):81-7.

## Literaturverzeichnis

235. Levi M, van der Poll T, Büller HR. Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*. 2004;109(22):2698-704.
236. Esmon CT. The interactions between inflammation and coagulation. *Br J Haematol*. 2005;131(4):417-30.
237. Grosso AR, Martins S, Carmo-Fonseca M. The emerging role of splicing factors in cancer. *EMBO Rep*. 2008;9(11):1087-93.
238. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-99.
239. Bancroft JD, McDowell SA, Degen SJ. The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells. *Biochemistry*. 1992;31(49):12469-76.
240. Riewald M, Kravchenko VV, Petrovan RJ, O'Brien PJ, Brass LF, Ulevitch RJ, et al. Gene induction by coagulation factor Xa is mediated by activation of protease-activated receptor 1. *Blood*. 2001;97(10):3109-16.
241. Abu El-Asrar AM, Alam K, Nawaz MI, Mohammad G, Van den Eynde K, Siddiquei MM, et al. Upregulation of Thrombin/Matrix Metalloproteinase-1/Protease-Activated Receptor-1 Chain in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr Eye Res*. 2016;41(12):1590-600.
242. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.
243. Zhang G, Li W, Guo Y, Li D, Liu Y, Xu S. MMP Gene Polymorphisms, MMP-1 -1607 1G/2G, -519 A/G, and MMP-12 -82 A/G, and Ischemic Stroke: A Meta-Analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27(1):140-52.
244. Tressel SL, Kaneider NC, Kasuda S, Foley C, Koukos G, Austin K, et al. A matrix metalloprotease-PAR1 system regulates vascular integrity, systemic inflammation and death in sepsis. *EMBO Mol Med*. 2011;3(7):370-84.
245. Abdul-Muneer PM, Pfister BJ, Haorah J, Chandra N. Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):6106-23.
246. Amin M, Pushpakumar S, Muradashvili N, Kundu S, Tyagi SC, Sen U. Regulation and involvement of matrix metalloproteinases in vascular diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2016;21:89-118.
247. Schröpfer A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Feix S, Anacker J. Expression pattern of matrix metalloproteinases in human gynecological cancer cell lines. *BMC Cancer*. 2010;10:553-.
248. Austin KM, Covic L, Kuliopulos A. Matrix metalloproteases and PAR1 activation. *Blood*. 2013;121(3):431-9.

## Literaturverzeichnis

249. Tantivejkul K, Loberg RD, Mawocha SC, Day LL, John LS, Pienta BA, et al. PAR1-mediated NFkappaB activation promotes survival of prostate cancer cells through a Bcl-xL-dependent mechanism. *J Cell Biochem.* 2005;96(3):641-52.
250. Rullier A, Senant N, Kisiel W, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Le Bail B, et al. Expression of protease-activated receptors and tissue factor in human liver. *Virchows Arch.* 2006;448(1):46-51.
251. Marra F, DeFranco R, Grappone C, Milani S, Pinzani M, Pellegrini G, et al. Expression of the thrombin receptor in human liver: up-regulation during acute and chronic injury. *Hepatology.* 1998;27(2):462-71.
252. Godoy P, Widera A, Schmidt-Heck W, Campos G, Meyer C, Cadenas C, et al. Gene network activity in cultivated primary hepatocytes is highly similar to diseased mammalian liver tissue. *Arch Toxicol.* 2016;90(10):2513-29.
253. Schulman S, Lindmarker P. Incidence of cancer after prophylaxis with warfarin against recurrent venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation Trial. *N Engl J Med.* 2000;342(26):1953-8.
254. Kuderer NM, Ortel TL, Francis CW. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *J Clin Oncol.* 2009;27(29):4902-11.
255. Dahlberg S, Ede J, Schött U. Vitamin K and cancer. *Scand J Clin Lab Invest.* 2017;77(8):555-67.
256. Kalmanti L, Lindhoff-Last E. Treatment of Vascular Thrombosis in Antiphospholipid Syndrome: An Update. *Hamostaseologie.* 2020;40(1):31-7.
257. Pottegård A, Friis S, Hallas J. Cancer risk in long-term users of vitamin K antagonists: a population-based case-control study. *Int J Cancer.* 2013;132(11):2606-12.
258. Kristensen KB, Jensen PH, Skriver C, Friis S, Pottegård A. Use of vitamin K antagonists and risk of prostate cancer: Meta-analysis and nationwide case-control study. *Int J Cancer.* 2019;144(7):1522-9.
259. Ikushima S, Ono R, Fukuda K, Sakayori M, Awano N, Kondo K. Trousseau's syndrome: cancer-associated thrombosis. *Jpn J Clin Oncol.* 2016;46(3):204-8.
260. Escolar G, Bozzo J, Maragall S. Argatroban: a direct thrombin inhibitor with reliable and predictable anticoagulant actions. *Drugs Today (Barc).* 2006;42(4):223-36.
261. Davie EW, Kulman JD. An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32 Suppl 1:3-15.
262. Acquasaliente L, Pelc LA, Di Cera E. Probing prothrombin structure by limited proteolysis. *Sci Rep.* 2019;9(1):6125.

263. Carr BI, Kar S, Wang M, Wang Z. Growth inhibitory actions of prothrombin on normal hepatocytes: influence of matrix. *Cell Biol Int.* 2007;31(9):929-38.
264. Wang Z, Wang M, Carr BI. Integrin alpha5-induced EGFR activation by prothrombin triggers hepatocyte apoptosis via the JNK signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2008;216(2):551-7.
265. Tormos AM, Taléns-Visconti R, Bonora-Centelles A, Pérez S, Sastre J. Oxidative stress triggers cytokinesis failure in hepatocytes upon isolation. *Free Radic Res.* 2015;49(8):927-34.
266. Richert L, Liguori MJ, Abadie C, Heyd B, Manton G, Halkic N, et al. Gene expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(5):870-9.
267. Riek-Burchardt M, Striggow F, Henrich-Noack P, Reiser G, Reymann KG. Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. *Neurosci Lett.* 2002;329(2):181-4.
268. Franchini M, Mannucci PM. Thrombin and cancer: from molecular basis to therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(1):95-101.
269. Zoubine MN, Ma JY, Smirnova IV, Citron BA, Festoff BW. A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev Biol.* 1996;179(2):447-57.

## Lebenslauf

### Universitäre und schulische Ausbildung

Seit 03/2016	<b>Promotionsarbeit</b> Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH), Mainz Thema: „Mechanismen der Genexpressionsregulation von Prothrombin“
04/2013 – 05/2020	<b>Studium der Humanmedizin</b> Johannes Gutenberg-Universität, Mainz Ärztliche Prüfung & Approbation
10/2012 – 04/2013	<b>Studium der Biowissenschaften</b> Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
09/2011 – 07/2012	<b>Studium der chinesischen Sprache und Kultur</b> Language and Culture University Beijing, China
09/2011 – 07/2012	<b>Gymnasium Osterholz-Scharmbeck</b> Allgemeine Hochschulreife (Abitur)
06/2001 – 08/2009	<b>HuaWei Chinesisch-Schule Bremen</b> Chinesischunterricht in Kultur, Wort und Schrift

### Berufserfahrung / Praktika

05/2021 – jetzt	<b>Assistenzarztstelle</b> Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Kalk, Köln
09/2020 – 02/2021	Allgemein-, Visceral und Gefäßchirurgie, St. Vinzenz Hospital, Köln
01/2020 – 04/2020	<b>Praktisches Jahr</b> Innere Medizin – Diakonie Krankenhaus Bad Kreuznach
09/2019 – 12/2019	Thoraxchirurgie – National University Hospital Taiwan
05/2019 – 08/2019	Allgemeinchirurgie – Gachon University Incheon Südkorea
09/2018	Laboratoriumsmedizin – Universitätsmedizin Mainz
	<b>Freiwilliges Praktikum</b> Intensivstation - United Christian Hospital Hong Kong SAR
04/2016 – 02/2019	<b>Wissenschaftliche Hilfskraft</b> CTH, AG Danckwardt, Universitätsmedizin Mainz
10/2015 – 03/2016	Gutenberg Brain Study (GBS), Focus Program Translational Neuroscience (FTN), Johannes Gutenberg-Universität Mainz

### Auszeichnungen

12/2016	<b>SPMD Promotionsstipendium</b> Stiftung für Pathochemie und Molekulardiagnostik von der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) mit einer monatlichen Förderung von 550€ für 8 Monate.
03/2016	<b>Doctoral Candidate Fellowship</b> des Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz mit einer monatlichen Unterstützung von 750€ für 6 Monate
01/2012	<b>Stipendium für hervorragende Semesterstudienleistungen</b> Language and Culture University Beijing China

### Poster Präsentationen

2017	<b>26<sup>th</sup> Biennial International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Congress and 63<sup>rd</sup> Annual Scientific and Standardization Committee (SSC) Meeting, Berlin.</b> Khokhar S., Schott L., Mühlbach K., Tokalov S., Danckwardt S. <i>D-Insight – an integrated animal and cell model system to</i>
------	---

## Lebenslauf

- interrogate the expression and secretion dynamics of F2 real-time in vivo.*
- 2017 **3<sup>rd</sup> European Spring School on the Science and Practice of Venous Thromboembolism, Chalkidiki, Griechenland.**  
**Schott L.\***, Khokhar S.\*, Mühlbach K., Tokalov S., Danckwardt S. (\* contributed equally) *Defining modifiers of F2 expression dynamics with a potential role in thrombosis formation by using an integrated animal and cell model system.*
- 2020 **International Society of Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Virtual Congress, initial geplant für Mailand, Italien.**  
**Schott L.\***, Pruschinski L.\*, Khokhar S.\*, Eder L.\*, Muhammad K., Tokalov S., Satrapa J, Klein M., Lackner K., Danckwardt S.\*\* , (\* contributed equally, \*\* correspondence) *Non-invasive optical in vivo imaging reveals tumor-derived prothrombin with a functional role in hemostasis and tumor.*
- Vorträge**
- 2016 **13. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL). Mannheim, Germany.**  
**Schott L.\***, Khokhar S.\*, Mühlbach K., Tokalov S., Danckwardt S. (\*equal contribution) *Elucidation of feedback gene regulatory mechanisms controlling the F2 expression*
- 2018 **Staudinger Symposium, Deutsche Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.V. Banz.**  
**Schott L.\***, Khokhar S.\*, Mühlbach K., Tokalov S., Danckwardt S. (\*equal contribution) *D-Insight – an integrated animal and cell model system to interrogate modifiers of F2 expression dynamics with a potential role in thrombosis formation*

### Ehrenamtliche Tätigkeiten

06/2015 – 05/2019 Teddyklinik Mainz - Organisationsteam, Kreativ- und Pressetätigkeiten

### Kenntnisse, Interessen und Fähigkeiten

#### Sprachen

Deutsch (Muttersprache)  
Chinesisch (Muttersprache)  
Englisch (exzellent)  
Französisch (Grundlagen)

#### Sonstige Aktivitäten

Rudern, Laufen, Lesen, Klavier