

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

Regulation und Funktion extrahepatischen Prothrombins in Fibrosarkomen

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

Vorgelegt von

Lisa Hinz
aus Böblingen

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.12.2022

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung	1
1.1 Hämostase & Fibrinolyse	1
1.1.1 Die primäre Hämostase	1
1.1.2 Die sekundäre Hämostase	3
1.1.3 Thrombosen und die Inhibition der Gerinnung im klinischen Alltag	6
1.2 Die Serinprotease Thrombin	7
1.2.1 Eigenschaften.....	7
1.2.2 F2-Genregulation und p38 als zentrale Figur der F2-Genregulation	8
1.3 Krebs	10
1.3.1 Thrombin in der Tumorbilogie	10
1.3.2 Fibrosarkome und ihre Eigenschaften	13
1.4 Epigenetik.....	14
1.5 Ziel der Arbeit	16
2 Material & Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Verwendete Laborgeräte	18
2.1.2 Reagenzien, Chemikalien, Lösungen, Medien.....	19
2.1.3 Puffer.....	22
2.1.4 Primer.....	22
2.1.5 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.1.6 Software	25
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.1 RNA-Isolation	25
2.2.2 cDNA-Synthese.....	26
2.2.3 qPCR.....	27
2.3 Versuchstier- und Zellkulturmethoden.....	28
2.3.1 Maus- und Zellkulturlinien.....	28
2.3.2 Das D-Insight-Mausmodell	28
2.3.3 RNAi-vermitteltes Knock-Down-Modell	29
2.3.4 Zellkulturarbeiten	30
2.3.5 Isolierung primärer muriner Hepatozyten	31
2.3.6 Isolierung primärer muriner Fibrosarkome	32
2.3.7 Isolierung primärer muriner Fibroblasten	32
2.3.8 Injektion von Fibroblasten/Fibrosarkomen mit Follow-Up in IVIS®.....	32
2.3.9 Inkubation mit epigenetischen Substanzen.....	33

2.3.10 Messung der Proteinkonzentration	35
2.3.11 Firefly-Luciferase(FLUC)-Assay.....	35
2.3.12 Colony-Forming-Unit-Assay.....	35
2.3.13 Matrigel-Invasion-Assay	36
2.3.14 Direkte und Indirekte FII-Inhibition mittels Argatroban und Phenprocoumon.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Generieren eines Fibrosarkoms und Detektion von extrahepatischem Prothrombin <i>in vivo</i>	38
3.2 Ektope Prothrombinexpression in Fibrosarkomen	39
3.3 FII-Expression innerhalb unterschiedlicher Fibrosarkom-Klone.....	41
3.4 FII-Expression und Proliferation von Fibrosarkomen.....	43
3.5 Transkriptionsfaktoren der F2-Genexpression	44
3.6 FII und Tumorinvasivität.....	45
3.7 FII-Depletion und das Wachstum von Zellkolonien.....	46
3.8 Pharmakologische FII-Inhibition und Fibrosarkom-Wachstum.....	49
3.9 Epigenetische Regulation der FII-Expression.....	51
4 Diskussion.....	53
4.1 Ausblick	61
5 Zusammenfassung	62
6 Literaturverzeichnis	64
7 Anhang.....	72
7.1 DNMT-Inhibition mit Decitabine im Langzeitscreening	72
7.2 O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferasen-Inhibition mit Lomeguatrib im Langzeitscreening.....	73
7.3 DNMT-Inhibition mit Zebularine im Langzeitscreening	73
8 Danksagung	Fehler! Textmarke nicht definiert.
9 Tabellarischer Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
B6	Black 6
Ca ²⁺ /CaCl	Kalziumionen/Calciumchlorid
c-/DNA	complementary desoxyribonucleic acid
CFU	colony forming unit
CIL	contact inhibition of locomotion
CIP	contact inhibition of proliferation
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor
CstF	cleavage stimulation factor
CTCs	circulating tumor cells
D-I	D-Insight
DNMT/I	DNA-Nukleotid-Methyltransferase/-inhibitor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOX	Doxycyclin
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DTT	Dithiothreitol
EMT/MET	epitheliale-mesenchymale/mesenchymale-epitheliale Transition
EV	extrazelluläre Vesikel
FI-XIII(a)	Gerinnungsfaktor I-XIII und die aktivierte Form
F2	Prothrombin-Gen
FII/FIIa	Prothrombin/Thrombin
F2KD	F2-Knockdown
FB	Fibroblast
FBS	fetal bovine serum
FLUC	Firefly Luciferase
FS	Fibrosarkom/e

GPCR/s	G-Protein gekoppelte Rezeptor/-en
HDAC/-i	Histon-Deacetylasen/-inhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
Hep	Hepatozyten
IVIS®	In vivo imaging system
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
k-/Da	kilo-/Dalton
MAP-Kinase	mitogen-activated-protein-Kinase
MCA	Methylcholantren
NaCl	Natriumchlorid
NMH	niedermolekulares Heparin
NOAK	neue orale Antikoagulanzen
p38	p38-MAPKinase
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
q-/PCR	quantitative-/polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RNPs	RNA-bindende Proteine
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
Serpin	Serinproteasen-Inhibitor
TF	Tissue Factor
TSS	Transcription Start Site
USE	upstream sequence element
vWF	von Willebrand – Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Plättchenaktivierung in der primären Hämostase	2
Abbildung 2: Das zellbasierte Modell der Gerinnungskaskade	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des 3'-End-Prozessierungssignals	9
Abbildung 4: p38 als zentraler Part in der Regulierung der alternativen Prozessierung	9
Abbildung 5: Thrombin und Tumormetastasierung	12
Abbildung 6: FII-Expression im In Vitro Imaging System in einem Mausembryo.....	14
Abbildung 7: Schemahafte Darstellung epigenetischer Modifikationen	15
Abbildung 8: D-Insight-Mausmodell – Ein F2-Knock-In-Allel zum in-vitro-Imaging	29
Abbildung 9: Schematische Darstellung des RNAi-vermittelten Knock-Down-Modells.....	30
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Matrigel-Invasion-Assays	36
Abbildung 11: Detektion ektopen Prothrombins in Fibrosarkomen.....	39
Abbildung 12: F2-RNA-Expression in Hep, FS und FB.....	40
Abbildung 13: Fibrosarkome exprimieren ektop FII.....	41
Abbildung 14: Heterogenität der FII-Expression in unterschiedlichen Fibrosarkomklonen	42
Abbildung 15: Die FII-Proteinexpression korreliert negativ mit der Verdopplungszeit	43
Abbildung 16: F2-assoziierte Transkriptionsfaktoren	44
Abbildung 17: FII-Depletion bewirkt eine verminderte Tumorinvasivität bei Fibrosarkomen ..	46
Abbildung 18: Repräsentatives Bild behandelter F2KD-Fibrosarkome im CFU-Assay	47
Abbildung 19: Einfluss von FII-Depletion auf die Koloniezahl im CFU-Assay.....	48
Abbildung 20: Einfluss von FII-Depletion auf Zellgröße und Zellkolonien im CFU-Assay	48
Abbildung 21: Pharmakologische indirekte FII-Inhibition führt zu einem verminderten Zellwachstum von Fibrosarkomen, direkte FIIa-Inhibition hat keinen Effekt ...	50
Abbildung 22: Pharmakologische direkte und indirekte FIIa-Inhibition führt zu keiner Veränderung der FII-Expression	50
Abbildung 23: Eine Inhibition der DNA-Methyltransferase führt zu einer Hochregulation der FII-Expression in Hepatozyten und Fibrosarkomen.....	52
Abbildung 24: Potenzieller Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Antikoagulanzen auf Fibrosarkomzellen	58

1 Einleitung

1.1 Hämostase & Fibrinolyse

Als Hämostase bezeichnet man den Prozess, der abläuft, sobald es zu einer Verletzung von Blutgefäßen kommt. Dabei wird die Blutung gestillt und ein Fibrinthrombus an der Stelle der Läsion gebildet. Die Hämostase wird in zwei Teilprozesse unterteilt, die primäre und die sekundäre Hämostase. Die primäre Hämostase wird vorwiegend über Blutplättchen, die sogenannten Thrombozyten, vermittelt. Dabei entsteht am Ende der primären Hämostase ein Thrombozyten-thrombus [1]. Ein in der sekundären Hämostase gebildetes Fibrinnetz stabilisiert dann den Thrombus, um dessen Auflösung innerhalb des Blutgefäßes zu verhindern. Im Verlauf der Wundheilung erfolgt nach der Hämostase die Fibrinolyse, in der das Fibrin aufgelöst wird. Physiologischerweise herrscht stets ein Gleichgewicht zwischen vaskulären „Mikroläsionen“ auf der einen und Thrombenbildungen auf der anderen Seite [2].

1.1.1 Die primäre Hämostase

Thrombozyten sind das wichtigste Glied der primären Hämostase. Dies erklärt, warum ein Mangel an Thrombozyten Blutungen auslösen und eine erhöhte Thrombozytenzahl zu vermehrten Thrombosen führen kann. Physiologisch finden sich 150 bis 400 Blutplättchen pro Nanoliter Blut [3]. Thrombozyten sind ubiquitär vorkommende Zellen, die ohne aktivierendes Signal nicht verklumpen. Erst eine Verletzung der Gefäßwand löst die primäre Hämostase aus [4]. Sie kann dann in drei Schritte unterteilt werden: Die Adhäsion, die Aktivierung und die Aggregation. Die Blutplättchen haften an subendotheliale Bindegewebsfasern, die durch die Verletzung frei gelegt wurden, insbesondere an Collagen I und III [5, 6]. Dies geschieht jedoch indirekt über den von-Willebrand-Faktor (vWF), welcher durch Endothelzellen und Thrombozyten sezerniert wird (s. Abbildung 1). Der vWF ist ein Glykoprotein und interagiert mit seiner A1-Domäne bei hohen Scherraten mit dem GPIIb/IIIa-Rezeptor als Teil des Proteinkomplexes GPIIb/IIIa/IX/V, welcher sich auf der Plättchenmembran befindet [7]. Diese Verbindung allein bewirkt noch keine stabile Adhäsion, sondern ein Verlangsamen und „Rollen“ der Plättchen. Explizit bedeutet dieses Rollen, dass die Thrombozyten sich rotierend

und in verlangsamer Geschwindigkeit entlang der Endothelwand bewegen [8]. Für eine stabile Adhäsion sorgt schließlich der Kontakt zwischen dem freigelegten Kollagen und den Integrinen, einer Gruppe von Proteinen, die aus α - und β -Untereinheiten bestehen. Vorrangig binden hierbei $\alpha_{IIb}\beta_3$ (auch: Glykoprotein IIb/IIIa) und $\alpha_2\beta_1$ an das Kollagen, $\alpha_{IIb}\beta_3$ indirekt über vWF. Voraussetzung ist hierbei jedoch, dass mindestens eines der Integrine eine Konformationsänderung in einen hochaffinen Zustand eingeht [9]. Dieser kann über Stimulation von GPVI erreicht werden [10]. GPVI ist ein Collagenrezeptor, der sich auf der Plättchenmembran befindet und zur Familie der Immunglobuline gehört [11].

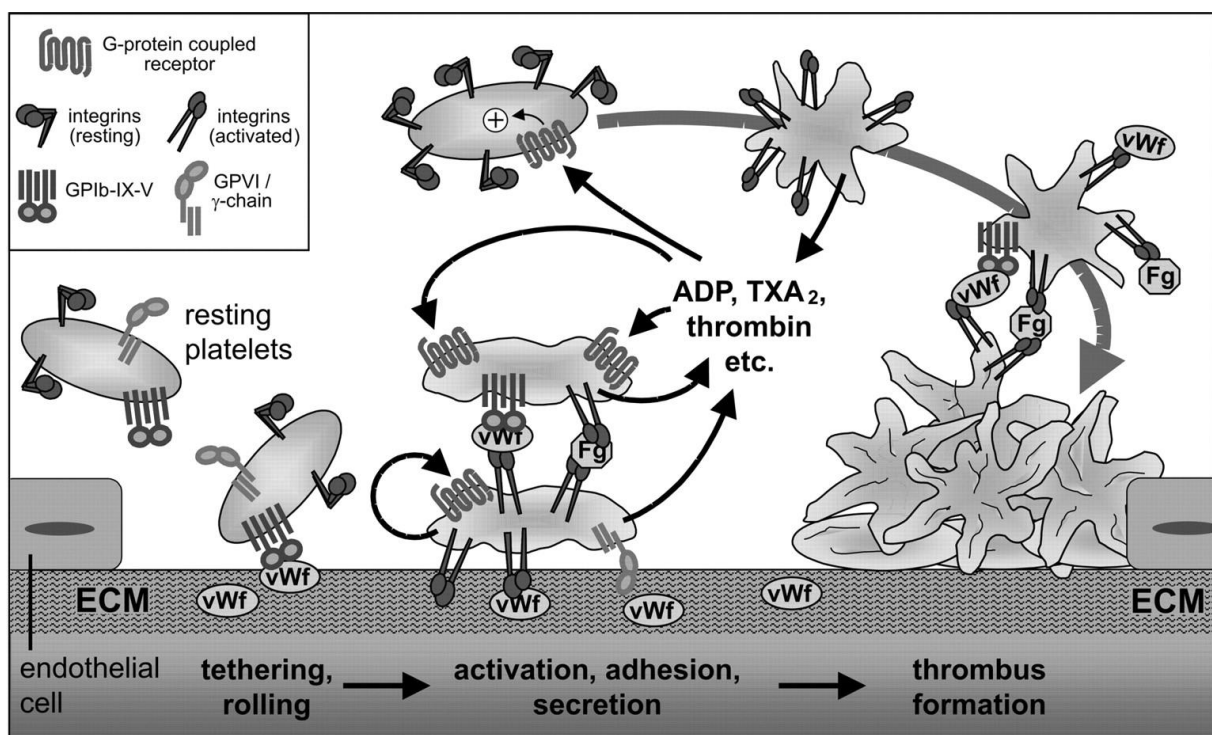


Abbildung 1: Plättchenaktivierung in der primären Hämostase

Thrombozyten haften mittels vWF an subendotheliale Bindegewebsfasern [7], die Thrombozyten verlangsamen sich und „rollen“ [8]. Weitere Integrine bewirken eine Konformationsänderung und verstärken die Adhäsion zwischen den Thrombozyten [9]. Das membranständige Glykoprotein VI führt zu einer Ausschüttung von ADP und Thromboxan A₂, die Thrombozyten werden aktiviert, was einen intrazellulären Ca²⁺-Anstieg bewirkt [12]. Es entstehen negativ geladene Oberflächen, die einen Ort zur Synthese von Faktor X und II bereitstellen, hier entsteht der spätere Fibrinthrombus [13]. Abbildung aus [12].

Durch die GPVI-vermittelte Änderung kommt es zur hochaffinen Bindung von Liganden wie Fibrinogen, vWF, Thrombospondin, Vitronektin und Fibronektin, die sich ebenfalls in der subendothelialen Matrix befinden [14, 15]. Weiter führt GPVI zu einer Ausschüttung der sekundären Mediatoren ADP und Thromboxan A₂, welche

zusammen mit dem lokal sezernierten Thrombin über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen. Der GPCR-Signalweg hat zudem zur Folge, dass es zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus und damit zur Ausschüttung weiterer Mediatoren sowie Rekrutierung umliegender Thrombozyten kommt, letztlich entsteht dadurch der wachsende Thrombus [12, 16]. Thrombin findet sich somit nicht nur in der Gerinnungskaskade, sondern trägt über die Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 4 (PAR1 und PAR4) vielfach zur Plättchenaktivierung bei [17]. Während der Plättchenaktivierung kommt es zu einem Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} , was zur Folge hat, dass Phospholipidtranslokatoren in der Plättchenmembran stimuliert werden. Dies bewirkt eine Exposition negativ geladener Phosphatidylserine auf der Plättchenoberfläche. Die Hauptfunktion dieser negativen Oberfläche ist es, einen Ort zur Synthese von FX und FII bereitzustellen. Als Ergebnis bildet sich an dieser Stelle der spätere Fibrinthrombus [13].

1.1.2 Die sekundäre Hämostase

Bereits 1905 stellte der Internist und Physiologe Paul Morawitz die klassische Theorie der Gerinnung auf, in welcher unter Einfluss von Calcium und Thromboplastin der Gerinnungsfaktor Prothrombin zu Thrombin konvertiert werde und dieses folglich Fibrinogen zu Fibrin umwandle [18]. 1964 erweiterten Davie et al. sowie Macfarlane et al. diese Theorie um weitere Gerinnungsfaktoren, die am Ende ihrer „wasserfallartigen“ Kettenreaktion die Generation eines Fibringerinnsels zur Folge hatten [19, 20]. Heute finden beide Theorien Anwendung in der Gerinnungskaskade, die die sekundäre Hämostase darstellt.

Bei der Gerinnungskaskade handelt es sich um Kettenreaktionen, bei denen jeweils inaktive Enzymvorstufen (z.B. Faktor II) zur aktiven Protease (dann Faktor IIa) umgewandelt werden. Die beteiligten Gerinnungsfaktoren gehören zu den Glykoproteinen und werden primär in der Leber produziert. Sie werden bezeichnet mit römischen Ziffern, der Reihenfolge ihrer Entdeckung entsprechend [21]. Man unterscheidet Serinproteasen (FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII) und Serinproteasen-Kofaktoren (FV, FVIII). Vier der Gerinnungsfaktoren (II, VII, IX, X) sind Vitamin-K-abhängig und unterliegen einer posttranslationalen Modifizierung durch eine Gamma-Glutamyl-Carboxylierung [22].

Die klassische Vorstellung der Gerinnungskaskade lässt sie in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg einteilen, beide enden in einer gemeinsamen Endstrecke. Der extrinsische Weg der Gerinnungskaskade wird eingeleitet durch Tissue Factor (TF), im Deutschen Thromboplastin/Faktor III (s. Abbildung 2). Es ist ein zellmembran-assoziiertes Protein, das einen essenziellen Kofaktor für Gerinnungsfaktoren VII/VIIa darstellt [23]. TF wird hauptsächlich in Zellen subendothelialen Gewebes (z.B. glatte Muskulatur, Fibroblasten) oder Monozyten exprimiert, nicht jedoch von Plättchen, um eine Isolation vom Blutplasma zu gewährleisten [24]. Kommt es nun zu einer vaskulären Verletzung, gelangen diese TF-exprimierenden Zellen in das Blutplasma. Der im Plasma befindliche Gerinnungsfaktor VII bindet an TF und wird in seine aktive Form VIIa umgewandelt [25]. Der gebildete TF/VIIa-Komplex aktiviert nun die Gerinnungsfaktoren IX und X zu IXa und Xa [26].

Der intrinsische Weg wird über Kontaktaktivierung ausgelöst, wenn Faktor XII (Hagemann-Faktor) mit negativ geladenen Oberflächen in Berührung kommt [27]. Der aktivierte Faktor XIIa bewirkt dann eine Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein. Kallikrein initiiert einen Verdau von Hochmolekularem Kininogen und damit eine Freisetzung des vasoaktiven Peptids Bradykinin. Zudem löst FXIIa die Umwandlung von FXI zu FXIa aus [28]. Zusätzlich kann Thrombin (FIIa) FXI zu FXIa aktivieren [29, 30]. Faktor XI aktiviert zudem IX zu IXa, zusätzlich zum extrinsischen Weg, da dieser raschen inhibitorischen Regulationsmechanismen unterliegt [31]. Der aktivierte Faktor IXa assoziiert mit FVIIIa, welcher sich auf der Plättchenmembran befindet. Dieser entstandene Komplex sorgt ebenfalls, calciumabhängig, für eine Umwandlung von FX zu FXa [32].

Die gemeinsame Endstrecke wird über die Aktivierung des FX zu FXa eingeleitet. Der aktivierte Faktor Xa assoziiert mit FVa und es bildet sich der Prothrombinasekomplex, der calciumabhängig FII (Prothrombin) zu FIIa (Thrombin) spaltet. Es handelt sich dabei um den zentralen Faktor der Gerinnungskaskade [33, 34]. Thrombin aktiviert nun Fibrinogen zu Fibrin, welches für eine netzartige Stabilisierung des in der primären Hämostase gebildeten Thrombozytenthrombus sorgt [35]. Eine abschließende Stabilisierung dieses Fibrinthrombus erfolgt durch Faktor XIIIa. wird von Thrombin aus der Vorstufe FXIII aktiviert. FXIIIa quervernetzt Fibrinmoleküle im Thrombus [36].

Man geht mittlerweile davon aus, dass die klassische Theorie über den extrinsischen und intrinsischen Weg möglicherweise überholt ist, da diese Erkenntnisse durch *in-vitro*-Versuche gewonnen wurden und *in vivo* ein anderer Ablauf realistisch ist [37].

Die Tatsache, dass beispielsweise der FVIIa/Tissue Factor-Komplex nicht nur FX, sondern auch FIX aktiviert, stützt die These, dass beide Wege, extrinsisch und intrinsisch, miteinander verknüpft sein müssen [26]. Die Ergebnisse von Nemerson et al. legen nahe, dass die Aktivität des FVIIa/TF-Komplexes das wichtigste initiiierende Ereignis der Hämostase zu sein scheinen [38, 39]. Die moderne Vorstellung der sekundären Hämostase gliedert diese somit in Initiation (entspricht dem extrinsischen Weg), Amplifikation (entspricht dem intrinsischen Weg) und Propagation (Aufrechterhaltung) [40].

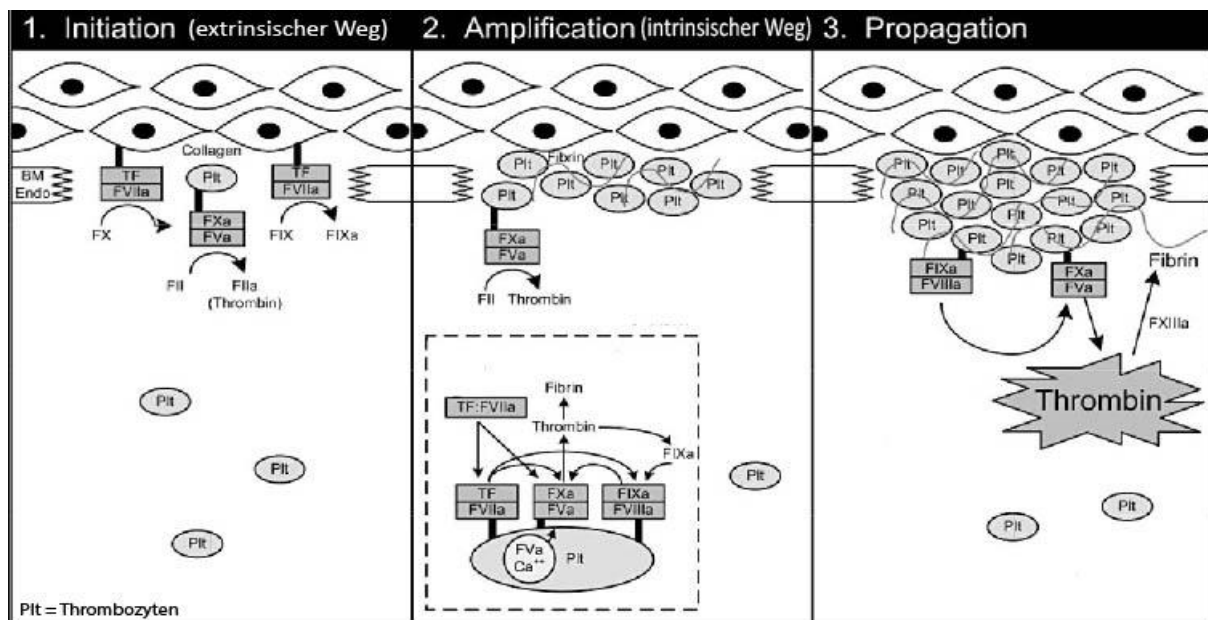


Abbildung 2: Das zellbasierte Modell der Gerinnungskaskade

Negativ geladene Oberflächen lösen den intrinsischen Weg bzw. die Initiation der Gerinnungskaskade aus [27, 41], der in der Aktivierung von FXIa endet [28]. Vaskuläre Verletzungen legen TF frei, welcher FVII zur FVIIa aktiviert und den extrinsischen Weg bzw. die Amplifikation einleitet (s. gestrichelter Kasten) [23, 41], hier werden FIX und FX zu FIXa und FXa aktiviert [26]. FIXa assoziiert mit dem plättchenmembranständigen FVIIIa und aktiviert ebenfalls FX zu FXa [32]. FXa assoziiert mit FVa zum sog. Prothrombinasekomplex und aktiviert schließlich FII zu Thrombin (FIIa) [33, 34], welches weiter Fibrinogen zu Fibrin spaltet [35]. FXIIIa, welches ebenfalls von Thrombin aktiviert wird, quervernetzt in der Propagation Fibrinmoleküle im Thrombus [36, 41].
Abbildung modifiziert aus [41].

1.1.3 Thrombosen und die Inhibition der Gerinnung im klinischen Alltag

Die Thrombose ist ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Aktivitäten. 1856 veröffentlichte Rudolf Virchow seine bekannte Trias zur Entstehung von Thrombosen. Demnach sollen eine Stase, Endothelschäden und Hyperkoagulabilität die Ursachen dieses Krankheitsbildes sein [42, 43].

Anders als bei arteriellen Embolien, die vor allem von den Thrombozyten selbst ausgehen, ist bei der Venenthrombose im Allgemeinen die Gerinnungskaskade betroffen. Klassische Auslöser der Thrombose sind dabei (postoperative) Immobilität, beispielsweise nach Hüft- und Knieoperationen aber auch Zustände, welche mit hormonellen Veränderungen einhergehen, z.B. Schwangerschaft, Wochenbett, medikamentöse Kontrazeption und Adipositas [44-46]. Zudem ist die vermehrte Neigung zu Thrombosen unter einer aktiven Krebserkrankung zu nennen. Heit et al. fanden 2000 in einer Fall-Kontroll-Studie heraus, dass eine Tumorerkrankung zu einem 4,1-fach erhöhten Thromboserisiko führt, eine Chemotherapiebehandlung sogar zu einem 6,5-fachen [47]. Die Pathogenese der vermehrten Thromboseneigung bei Krebserkrankungen ist bislang noch wenig erforscht.

Je nach Entstehungsort oder Schwere der Thrombose aber auch prophylaktisch nach Operationen oder Frakturen werden unterschiedliche Substanzen zur Antikoagulation verabreicht. Zum aktuellen Zeitpunkt werden vier Hauptklassen der Antikoagulanzen unterschieden: Aktivatoren von Antithrombin III (z.B. Heparine), Vitamin-K-Reduktasehemmer (Cumarinderivate), direkte Faktor-IIa-Inhibitoren (z.B. Argatroban) sowie direkte Faktor-Xa-Inhibitoren (z.B. Rivaroxaban).

Heparine agieren als Antithrombin-III-Aktivatoren. Antithrombin III ist ein physiologisch im Plasma zirkulierender Serinproteasen-Inhibitor (Serpine). Zu den von Antithrombin III inhibierten Serinproteasen zählen unter anderem Gerinnungsfaktor IIa (Thrombin), IXa, Xa, XIa, XIIa und Kallikrein [48, 49]. Die Aktivität von Antithrombin III kann durch Heparin bis 1000-fach verstärkt [50]. Heparine werden vor allem zur Thromboseprophylaxe und Behandlung akuter Thrombosen eingesetzt, meist werden dafür niedermolekulare Heparine wie z.B. Enoxaparin verwendet. Cumarinderivate wie z.B. Warfarin oder Phenprocoumon inhibieren die Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und blockieren somit die Synthese der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X sowie der Proteine C und S. Sie finden oftmals Anwendung in der (Rezidiv-)prophylaxe von

Schlaganfällen bei Vorhofflimmern oder bei Herzklappenersatz [51]. Cumarinderivate werden immer häufiger abgelöst durch die sogenannten neuen oralen Antikoagulanzen (NOAK), die gezielt die Gerinnungsfaktoren Xa (z.B. Rivaroxaban) oder IIa (Dabigatran) inhibieren, zu weniger Nebenwirkungen und Wechselwirkungen führen und eine engmaschige INR-Kontrolle überflüssig machen [52].

1.2 Die Serinprotease Thrombin

1.2.1 Eigenschaften

Im vorangegangenen Abschnitt wurde bereits erläutert, dass Thrombin, die aktivierte Form des Gerinnungsfaktors Prothrombin, das zentrale Molekül der Gerinnung darstellt, indem es Fibrinogen zu Fibrin aktiviert. Prothrombin ist ein etwa 71,6 kDa schweres Molekül, welches in einer Konzentration von etwa 2 μM im Plasma vorkommt. Es besteht aus 622 Aminosäuren und wird hauptsächlich von Hepatozyten in der Leber synthetisiert [53]. Das Gen, welches für Prothrombin codiert, ist 21 kb lang und liegt auf Chromosom 11 (11p11-q12). Es enthält 14 Exons, welche durch 13 Introns voneinander getrennt werden [54, 55]. Bevor Prothrombin jedoch ins Plasma sezerniert wird, wo es aus 579 Aminosäuren und 8 % Kohlenhydraten besteht, erfährt es einige posttranslationale Veränderungen [56, 57].

Unter anderem werden am n-terminalen Ende 43 Aminosäuren entfernt und die Aminosäuren an Position 78, 100 und 373 n-glykosyliert. Zudem werden die n-terminalen Glutaminsäurereste Vitamin-K-abhängig γ -carboxyliert, dies wird dann als Gla-Domäne bezeichnet [53, 58]. Während die Glykosylierung unter anderem die Stabilität des Moleküls verbessert, dient die γ -Carboxylierung der Glutaminsäurereste dazu, einen Ca^{2+} -abhängigen Anknüpfungspunkt für negativ geladene Phospholipide zu erzeugen [59, 60]. Das Besondere an der Thrombin-Molekülstruktur sind die sogenannten Anion-bindenden Exosites I und II. Diese Exosites sorgen dafür, dass Thrombin spezifisch an seine Substrate, Cofaktoren und Inhibitoren bindet. Es handelt sich dabei um Oberflächenregionen, welche jeweils gegenüberliegend nahe der Substratbindungsstelle positioniert sind. Diese Exosites bestehen überwiegend aus basischen Resten und interagieren über elektrostatische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Komponenten der Thrombinsubstrate [61].

Seine Wirkung auf Thrombozyten entfaltet Thrombin über GPIIb und Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR). Es werden vier Arten von PAR bei Säugetieren unterschieden: PAR1, PAR2, PAR3 und PAR4 [62]. PAR2 wird nicht von Thrombin aktiviert, eine Thrombinwirkung auf PAR3 in Thrombozyten wurde bislang nur in Mäusen beschrieben [63, 64]. PAR1 und PAR4 koppeln an G_{12/13}- sowie G_q-Proteine, PAR1 koppelt zusätzlich an G_i-Proteine [65, 66]. Thrombin bindet jedoch mit höherer Affinität an PAR1 als an PAR4 [67]. Am Ende all dieser Signalkaskaden stehen Prozesse wie eine Induktion von Proliferation, Formveränderung, Hypertrophie, Entzündung oder Adhäsion [68].

Die zentrale Rolle des Prothrombins in der Gerinnungskaskade ist vielfach beschrieben worden. Seine Aufgaben sind jedoch viel weitreichender als bisher angenommen. Es wurde identifiziert, dass Thrombin eine wichtige Rolle in Prozessen wie Embryonalentwicklung, Angiogenese, Organregeneration [69, 70], angeborene Immunantwort, akute und chronische Entzündungsprozesse [71], Atherosklerose [72], Neuropathologien [73] und Tumorbologie [74, 75] spielt. Die Vernetzung von Blutgerinnung und Immunantwort lässt sich zum Teil darüber erklären, dass auch auf vielen Immunzellen PAR exprimiert werden [76]. Zudem ist aktiviertes Thrombin in der Lage direkt C5a zu generieren und die üblichen Aktivierungswege (klassischer, alternativer sowie Lektinweg) zu umgehen [77]. Es wurde beobachtet, dass eine FII-Inaktivierung bei Mausembryonen letal ist [78]. Doch nicht nur die Angiogenese ist hierbei entscheidend, auch während der Gehirnentwicklung [79] und des neonatalen synaptischen Remodelings [80] wird eine erhöhte FII-Expression beobachtet. Im adulten Organismus findet sich vor allem eine Expression und Synthese in den Hepatozyten.

1.2.2 F2-Genregulation und p38 als zentrale Figur der F2-Genregulation

Die Aktivität der meisten Gene wird über proximale Promotor-Elemente reguliert, welche sich innerhalb der 100-200 Nukleotide abwärts der *Transcription Start Site* (TSS) befinden. Im Prothrombin-Gen befindet sich die zuständige Enhancer-Region für den Promotor jedoch fast 1 kb abwärts der TSS [81, 82]. Unterschiedliche Transkriptionsfaktoren sind in der Lage an die Prothrombin Enhancer-Region zu binden, unter anderem HNF4-Alpha, HNF1-Alpha und HNF3-Beta (FOXA2) [83]. Das F2-Gen hat ein relativ ineffizientes 3'-End-Prozessierungssignal (CG), dieses wird

jedoch von einem sogenannten *upstream sequence element* (USE) ausbalanciert (s. Abbildung 3). Es ist damit ein Beispiel aus einer Reihe von Säugetiergenen, welche ein solches USE besitzen. Das USE ist eine Sequenz, welche 30 Nukleotide downstream der Polyadenylierungsstelle gelegen ist [84].

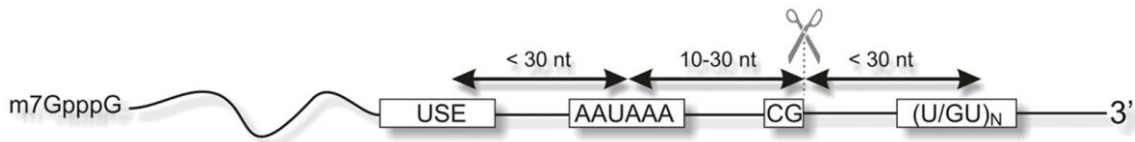


Abbildung 3: Schematische Darstellung des 3'-End-Processing-Signals (GC), welches von einem USE ausbalanciert wird [85].
Abbildung aus [85].

Äußere Einflüsse können die 3'-End-Processing modulieren, so wurde dies beispielsweise im Immunreifungsprozess [86, 87] oder während der Tumorgenese [88] beschrieben. Wie genau dieser Prozess zu einer veränderten FII-Expression führt, ist bisher nicht vollständig beleuchtet worden. Kürzlich wurde die MAP-Kinase p38 als zentraler Teil in der Regulierung der RNA-Reifung identifiziert (s. Abbildung 4).

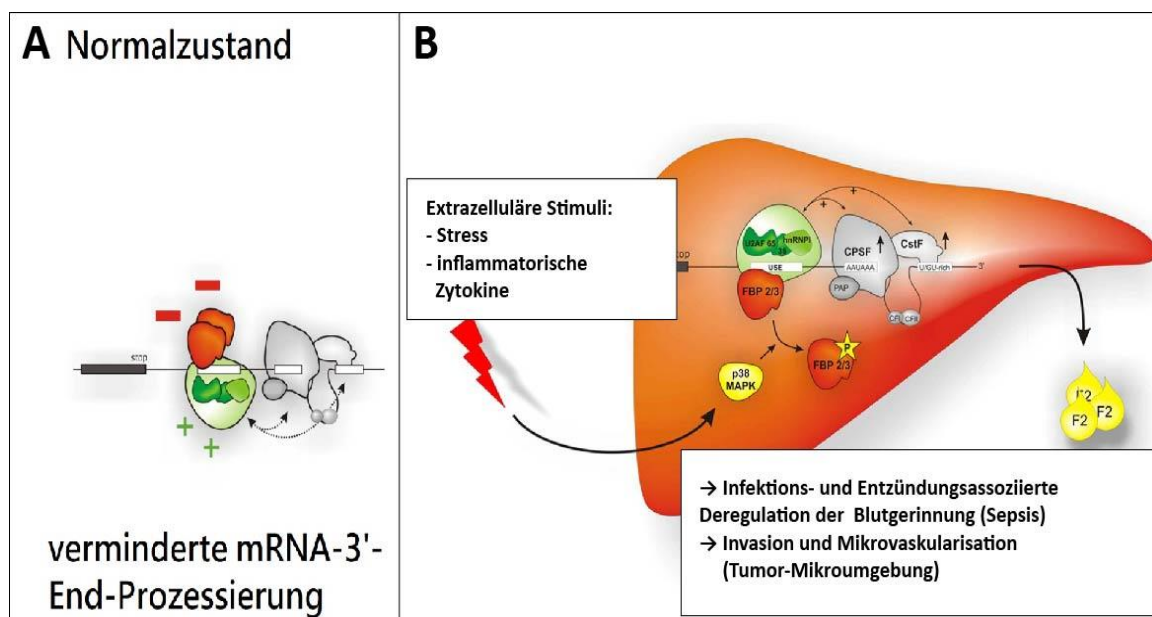


Abbildung 4: p38 als zentraler Part in der Regulierung der alternativen Prozessierung
A) Unterschiedliche Proteine binden an das USE des F2-Gens und stimulieren die 3'-End-Processing, im physiologischen Zustand werden sie jedoch durch RNA-bindende Proteine gehemmt.
B) Externe Stimuli wie z.B. Stress werden über den p38-Signalweg diese RNP's phosphoryliert und ihre Bindung vom USE gelöst, was zu einer vermehrten FII-Expression führt [85].
Abbildung modifiziert aus [85].

Im F2-Gen binden die Proteine hnRNPI, U2AF65 und U2AF35 an das USE und stimulieren die 3'-End-Prozessierung, indem sie den Prozessierungsapparat, bestehend aus *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) und *cleavage stimulation factor* (CstF), rekrutieren. Physiologisch binden die RNA-bindenden Proteine (RbPs) FBP2 und FBP3 an die stimulatorischen Proteine und vermindern dadurch die Prozessierungseffizienz. In einer Stresssituation werden über den p38-Signalweg die RbPs phosphoryliert und ihre Bindung wird vom USE gelöst. Dadurch haben die Prozessierungsfaktoren hnRNPI, U2AF65 und U2AF35 einen vereinfachten Zugang an das USE und es erfolgt eine vermehrte mRNA-Expression und damit Proteinsynthese des Prothrombins [85].

1.3 Krebs

1.3.1 Thrombin in der Tumorbiologie

Die Assoziation zwischen venösen Thrombosen und Krebserkrankungen ist seit vielen Jahren bekannt. Armand Trousseau wird häufig als Erstbeschreiber dieses Zusammenhangs erwähnt [89]. Er stellte seine Beobachtungen 1865 vor der New Sydenham Society vor. Tragischerweise diagnostizierte der französische Internist einige Zeit später eine Thrombophlebitis bei sich selbst und prophezeite seinen baldigen Tod, verursacht durch ein Magenkarzinom. 6 Monate später starb Trousseau [90]. Noch heute hat das sogenannte *Trousseau-Syndrom* klinische Relevanz. Die Prävalenz einer Krebserkrankung bei akut an Thrombose erkrankten Patient:innen beträgt je nach Quelle 10-20 % [89, 91].

Patient:innen mit malignen Tumoren weisen erhöhte Biomarker der Thrombinsynthese auf [92], diese stehen in einem negativen Zusammenhang mit der Prognose [93]. Die Beziehung zwischen Krebs und Thrombosen ist bidirektional. Einerseits wird ein Mechanismus beschrieben, bei welchem Hämostasekomponenten die Tumorentwicklung beeinflussen [74, 94]. Andererseits ist es der Tumor selbst, der über parakrine Regulation die Hämostase moduliert und diese nutzt um einer „Überwachung“ durch das wirtseigene Immunsystem zu entgehen [94]. Fibrindeposition im Stroma sowie eine Expression von TF durch Zellen in der Mikroumgebung ist kennzeichnend für viele invasive Tumorarten [95, 96]. In Kombination mit Gerinnungsfaktor FVIIa wird dadurch

eine vermehrte Thrombinsynthese ermöglicht. In der sekundären Hämostase benötigt der vorangehende Prothrombinase-Komplex eine negativ geladene Oberfläche, die im physiologischen Zustand aus der Membran oder extrazellulären Vesikeln (EV) der Blutplättchen bereitgestellt wird. Auch Tumore sezernieren diese EV und können damit eine negative Oberfläche für den Prothrombinasekomplex bieten [97]. Thrombin stimuliert die sogenannte Intravasation, d.h. Tumorzellen migrieren in das Gefäßsystem [74] und werden fortan als *circulating tumor cells* (CTCs) bezeichnet [98].

Im Blut zirkulierende CTCs sind mehreren Verteidigungsmechanismen ausgesetzt, beispielsweise mechanischen Scherkräften, die ein Anheften an die Gefäßwand verhindern. Ein weiterer Mechanismus ist Anoikis, der programmierte Zelltod, bei welchem Zellen, die den Zell-Matrix-Kontakt verloren haben, eliminiert werden [98, 99]. Um diesen Kontrollen zu entgehen, durchlaufen Tumore einen Defensivprozess, das *epithelial to mesenchymal transition* (EMT) oder der reverse Prozess *mesenchymal to epithelial transition* (MET), welche ebenfalls teilweise durch Thrombin reguliert werden [100]. Im Rahmen des EMT gehen Merkmale differenzierten Epithels verloren (z.B. apiko-basale Polarität oder Zell-Zell-Kontakte) und werden durch mesenchymale Eigenschaften (Verlust der Zellpolarität, individuelle Zellmigration sowie Invasion der Basallamina und Blutgefäße) ersetzt [101].

Weiter unterstützt Thrombin die Metastasierung, indem es zur Formation eines metastatischen Thrombus beiträgt (s. Abbildung 5). TF, welches von der Tumorzelle exprimiert wird, generiert über FVIIa und FXa Thrombin, welches Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Thrombin aktiviert zudem über PAR-1 Thrombozyten, welche eine Konformationsänderung eingehen und über das - nun aktivierte $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin-Fibrinogen binden [74]. Tumorzellen exprimieren eine Vielzahl von Integrinen, unter anderem $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, welches ebenfalls Fibrinogen bindet [102]. Es kommt zu einer Brückenbildung aus Tumor, Thrombozyt und Fibrinogen. Diese Bindung wird aufrecht erhalten durch Fibrinbildung (stimuliert durch Thrombin) und sogar weiter verstärkt durch eine weitere Bindung, die des membranständigen P-Selektins der Thrombozyten an die Glykane der Tumorzellen. Neben der Metastasenbildung stimuliert Thrombin auch die Tumorangiogenese, indem es im Tumorthrombus die Ausschüttung der Angiogenesefaktoren VEGF oder Angiopoietin-2 aus den Plättchen auslöst [74]. In metastasierten Kolonkarzinomen wurde eine erhöhte Expression der p38-MAPKinase beobachtet, welche im Verlauf zudem zu einer erhöhten FII-

Expression durch die Mikroumgebung des Tumors führte. Das sezernierte Thrombin aktivierte daraufhin PAR und vermittelte eine Expression von Genen, die ihrerseits ebenfalls zu Neoangiogenese und Tumordissemination beitragen [85]. Da 40-50 % aller Karzinome mit chronischer Entzündung in Verbindung stehen [103] und auch Ereignisse wie DNA-Schäden und oxidativer Stress im Tumorgewebe [104], die ebenfalls p38 stimulieren können, ist denkbar, dass dies eine Schlüsselverbindung zwischen Tumor und Thrombosenbildung ist.

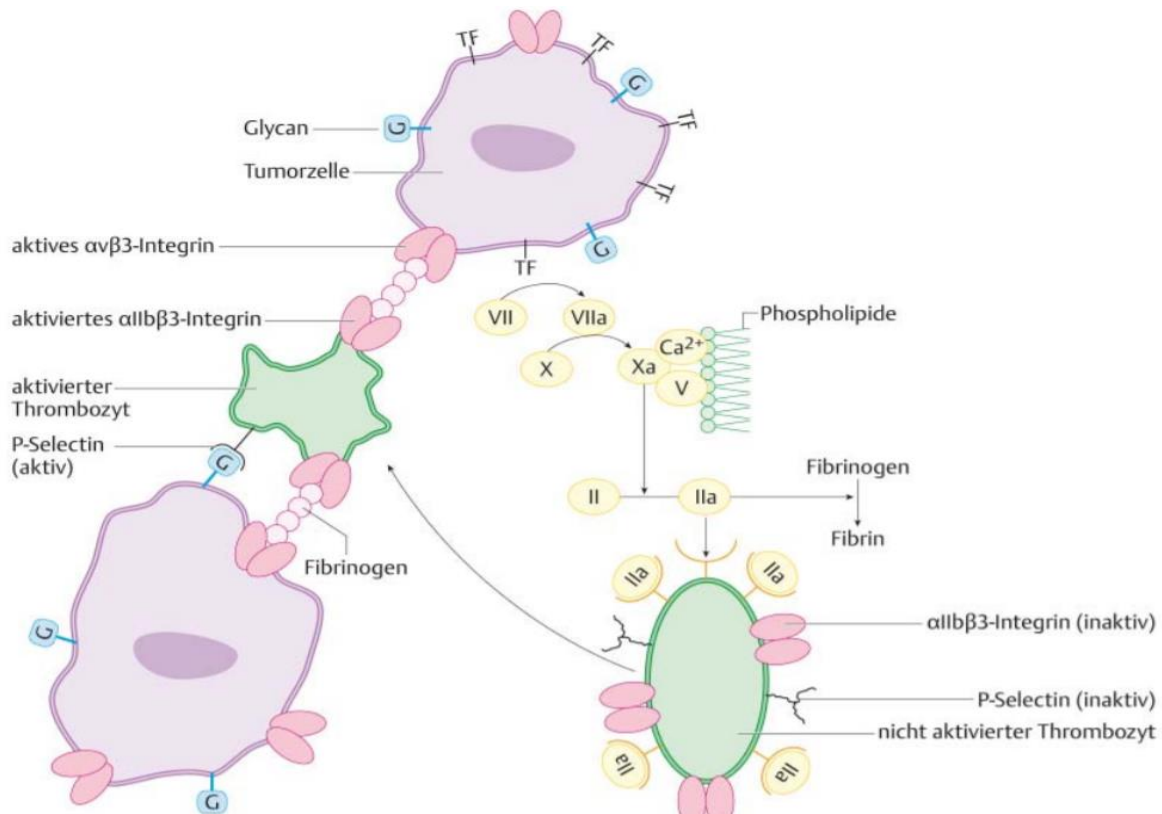


Abbildung 5: Thrombin und Tumormetastasierung

Die Tumorzelle exprimiert TF, über zwischengeschaltete Signalwege wird FII zu Thrombin aktiviert, welches Fibrin aus Fibrinogen bildet und an PAR an Thrombozyten bindet. Diese werden aktiviert und erleben eine Konformationsänderung mittels des membranständigen Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin und binden folglich Fibrinogen. Auf der anderen Seite bindet das membranständige Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin der Tumorzellen ebenfalls Fibrinogen. Es entsteht eine Brücke, die durch Fibrin weiter vernetzt wird. Das Tumorerinnsel wird verstärkt durch das Binden von P-Selektin der Thrombozyten an Glykane des Tumors [74].

Abbildung aus [105].

Andererseits kann eine Chemotherapie im Rahmen der Krebsbehandlung den Zustand der Hyperkoagulabilität ebenfalls verstärken. Venöse Thromboembolien sind zudem die Haupttodesursache bei Patient:innen in chemotherapeutischer Behandlung [106, 107]. Die genauen Ursachen dieser gefürchteten Komplikation sind bislang noch weitgehend unerforscht.

1.3.2 Fibrosarkome und ihre Eigenschaften

Die Bedeutung von Thrombin in der Tumorbilogie der Fibrosarkome ist bisher weitgehend ungeklärt. Die WHO definiert Fibrosarkome als maligne Neoplasie bestehend aus Fibroblasten mit variierender Kollagenproduktion und fischzugartiger Architektur. Die Inzidenz des Fibrosarkoms hat in den letzten Jahrzehnten abgenommen, da seine Klassifikation immer weiter eingeschränkt wurde und andere (nicht-)mesenchymale Tumore, die dem Fibrosarkom ähnelten, eher korrekt diagnostiziert wurden [108, 109]. Ursprungsgewebe sind meist Sehnen oder Faszien im tieferen Gewebe, seltener auch das Knochenmark oder das Periosteum. Während infantile Fibrosarkome eher selten metastasieren, sind Fibrosarkome des Erwachsenen hochmaligne [110]. Fibrosarkome kommen vor allem im mittleren Alter, etwas häufiger bei Männern, vor und sind meist lokalisiert in den Weichteilen der Extremitäten, des Rumpfes, des Kopfes und des Halses [109, 111].

Histologisch zeigen sich unterschiedliche Bilder. Zum einen werden mäßig zeldichte Tumore - ohne besondere mitotische Aktivität oder Kernatypien - und mit viel Kollagen sowie fischzugartiger Anordnung beschrieben. Zum anderen gibt es jedoch auch zellreiche, kollagenarme und ungeordnete Fibrosarkome mit auffallender Pleomorphie. Auch mikroskopisch ist ein infiltratives Wachsen in das umgebende Gewebe zu erkennen [112].

Die Prognose ist abhängig vom histologischen Bild, wenig differenzierte Tumore gehen mit einer schlechteren Prognose einher. Es wird von einer 5-Jahres-Überlebenschance von 73 % bei Grad-1-Tumoren und 30 % bei Grad-3-Tumoren berichtet [113]. Weichteilsarkome metastasieren überwiegend hämatogen in die Lunge, bei der Erstdiagnose weisen 10 % der Patient:innen Lungenmetastasen auf [114]. Als kurativer Ansatz kommt vor allem die radikale chirurgische Resektion in Frage. Um ein möglichst langes rezidivfreies Überleben zu sichern, kann dies noch mit adjuvanter Strahlen- und/oder Chemotherapie ergänzt werden [115].

1.4 Epigenetik

Während im Embryo Prothrombin quasi ubiquitär exprimiert ist (s. Abbildung 6), ist die Expression im Erwachsenen zumeist auf Hepatozyten beschränkt [116]. Wann immer Änderungen vom embryonalen zum adulten Organismus stattfinden, die die Genexpression, Morphologie oder Funktionalität betreffen, wird ein Einfluss der Epigenetik diskutiert [117].

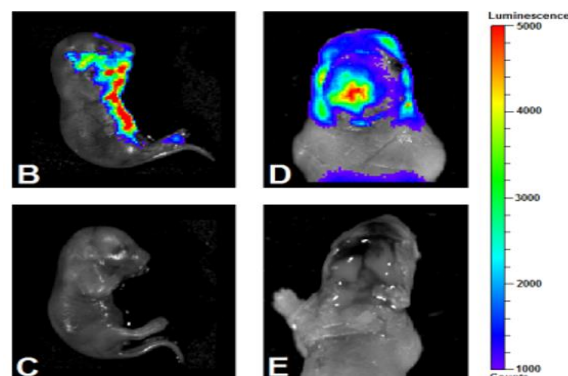


Abbildung 6: FII-Expression im In Vitro Imaging System in einem Mausembryo

FII wird nicht wie im adulten Organismus nur in Hepatozyten, sondern ubiquitär im Körper exprimiert. Abbildung aus [116]

Historisch betrachtet war vermutlich Lamarck 1809 der Erstbeschreiber der Epigenetik. So vertrat er die These, dass die Elterngeneration ein phänotypisches Merkmal erwerben und dies an die nächste Generation weitervererben könne [118]. In jener Zeit waren jedoch die Lehren von Darwin und Mendel prominenter vertreten und so traten Lamarcks Thesen zunächst in den Hintergrund. Conrad Waddington war es schließlich, der den Begriff „Epigenetik“ prägte als „Zweig der Biologie, der die kausalen Zusammenhänge zwischen Genen und deren Produkten, die einen Phänotypen ergeben, beschreibt“ [119].

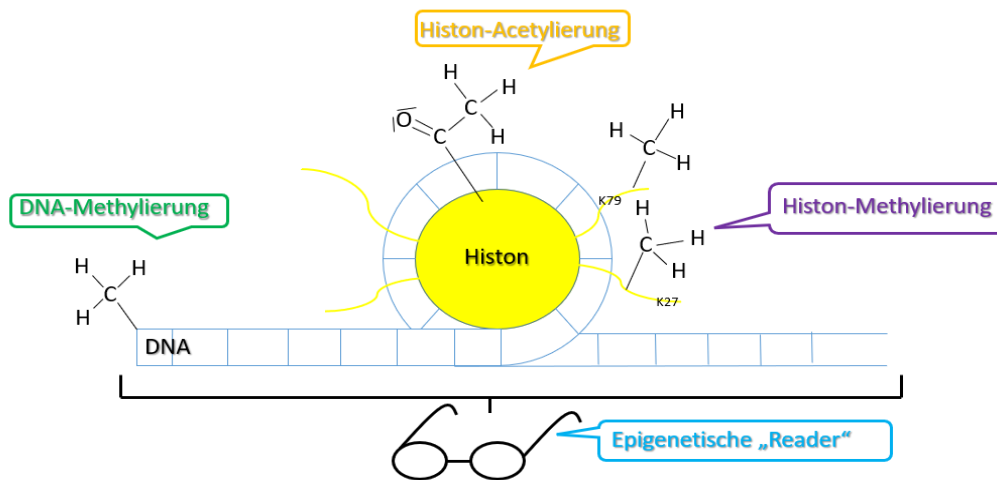


Abbildung 7: Schemahafte Darstellung epigenetischer Modifikationen

Chromatin besteht aus DNA, welche um Histone gewickelt ist, hier können unterschiedliche Mechanismen epigenetisch regulieren. Zum einen können die einzelnen Bestandteile wie DNA oder Histone methyliert oder acetyliert werden, zum anderen können sog. Reader epigenetische Modifikationen erkennen und an weitere Signalpartner vermitteln [120].

Diese Definition kann jedoch auf alle molekularen Wege, die die Expression von Gen zu Phänotyp modulieren, angewandt werden. Daher ist die heutige Definition eher „die Lehre der Veränderungen der Genfunktion, welche mitotisch oder meiotisch vererblich sind, jedoch keine Veränderungen in der DNA-Sequenz selbst bewirken“ [121]. Im engeren Sinne beschreiben epigenetische Modifikationen (s. Abbildung 7) Histonvarianten, posttranslationale Modifikationen von Aminosäuren am N-Terminus der Histone und kovalente Modifikationen von DNA-Basen [122]. DNA-Methylierung moduliert die Transkription, ohne die DNA-Sequenz selbst zu verändern. In eukaryotischer DNA methylieren DNA-Nukleotid-Methyltransferasen (DNMTs) zunächst Cytosin und wandeln es dann in 5'-Methylcytosin um [123]. Diese Methylierung findet mehrheitlich in sogenannten CpG-Inseln statt, also in Abschnitten der DNA, in denen sich die Reihenfolge Cytosin-Guanin häufig wiederholt. Es wurde jedoch auch eine Methylierung in CpHpG-Inseln (H steht dabei für Adenin, Thymin oder Cytosin) beobachtet [124]. In Säugetieren wurden bis lang 3 DNMTs identifiziert: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B [125-127]. DNMT1 hält den bereits vorhandenen Methylierungsstatus während der DNA-Replikation aufrecht. DNMT3A und DNMT3B nehmen *de novo*-Methylierung an zuvor unmethylierten DNA-Stellen vor. Dabei können diese *de novo*-DNMTs entweder direkt an bestimmte DNA-Abschnitte oder über andere DNA-bindende Proteine binden [128].

Etwa 147 Basenpaare wickeln sich um die sogenannten Histone (2 Sets von jeweils H2A, H2B, H3 und H4) und bilden ein Nukleosom. Zusätzliche Proteine komprimieren diese Nukleosome weiter und bilden Chromatin. Histone können über Acetylierung und Methylierung epigenetisch modifiziert werden, so wird der Zugang an die DNA bzw. das Chromatin verändert und die Transkriptionsaktivität vermindert oder erhöht. Liegen Histone acetyliert vor, sind sie weniger dicht gepackt und ihr zugehöriger DNA-Strang erlaubt mehr Zugriff und daher mehr Transkription. Je nach Ort der Methylierung kann es bei methylierten Histonen zu verminderter oder erhöhter Transkription kommen. Im Allgemeinen ist eine Methylierung des Lysins an Stelle 4, 36 und 79 des Histons H3 als transkriptionserhöhende Modifikation zu werten, eine Methylierung an Lysin an Position 9 oder 27 des gleichen Histons hingegen als transkriptionsmindernd [129]. Enzyme, die Acetyl- oder Methylgruppen an Histone anbringen werden "Writer"-Enzyme genannt. Enzyme, die diese Gruppen entfernen, nennt man "Eraser"-Enzyme. Zusätzlich gibt es eine weitere Klasse von Proteinen, die sogenannten „Reader“. Sie erkennen epigenetische Modifikationen der Histone und der DNA und vermitteln deren Effekte [120].

1.5 Ziel der Arbeit

Die physiologische Rolle des Prothrombins (FII) in der Blutgerinnung ist bereits seit mehreren Jahrzehnten Gegenstand der Forschung. Neben der physiologischen Funktion der Blutstillung wurde Thrombin als Kofaktor in diversen pathophysiologischen Zuständen identifiziert, so zum Beispiel im Rahmen von Sepsis oder Atherosklerose.

Bereits Trousseau erkannte einen Zusammenhang zwischen vermehrter Gerinnungsneigung und Krebserkrankungen, welcher fortan als *Trousseau-Syndrom* bezeichnet wurde [89]. Bekannt ist zwar, dass Thrombin die Angiogenese, Metastasierung und das Wachstum eines Tumors positiv stimuliert [74], jedoch nicht, ob dieses Thrombin vom Tumor selbst oder von Zellen der Mikroumgebung exprimiert bzw. sezerniert wird. Während FII in der Embryonalentwicklung fast ubiquitär exprimiert wird, beschränkt sich die Expression im Adulten zum größten Teil auf die Hepatozyten [116]. Eine solche Veränderung der Expression wird häufig über epigenetische Mechanismen erklärt, genauere epigenetische Modifikationsmechanismen der FII-Expression wurden jedoch bislang noch nicht identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es, eine „ektopye“ FII-Expression in Fibrosarkomen zu untersuchen. Hierzu wurden physiologisch exprimierende Hepatozyten nicht exprimierenden Fibroblasten gegenübergestellt und mit Fibrosarkomen verglichen. Die Methodik sollte die Expression dabei sowohl auf Ebene des Proteins als auch der RNA untersuchen. Hierzu wurde ein neu etabliertes Mausmodell eingesetzt, welches durch ein Lumineszenz-Knock-in Allel eine genaue Nachverfolgung der Expression im FLUC-Assay erlaubt. Die RNA-Analyse erfolgte mittels qPCR. Mit einem neu etablierten RNAi-vermittelten Knock-Down Modell sollte eine FII-Depletion in Fibrosarkomen und der Einfluss auf Tumorwachstum und Invasivität in CFU (Colony Forming Unit)- und Matrigel-Invasion-Assays getestet werden. Zudem sollte die Rolle der Epigenetik in der FII-Expression sowohl physiologisch in Hepatozyten als auch pathophysiologisch in Fibrosarkomen durch Inhibition unterschiedlicher DNA- und Histonmodulatoren untersucht werden. Schließlich sollte eine mögliche therapeutische Anwendung einer FII-Suppression getestet werden. Hierfür wurden Fibrosarkome mit den im Klinikalltag bekannten Antikoagulanzen Phenprocoumon und Argatroban behandelt.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Laborgeräte

Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe Millipore	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Analaysewaage AC 210 S	Sartorius, Göttingen, DE
Biometra Standard Power Pack P25T	Analytik Jena AG, Jena, DE
CFX-Connect™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Hercules, USA
FlexCycler	Analytik Jena AG, Jena, DE
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr, Bulle, CH
Gefrierschrank (-80 °C) V8683d	Ewald, Rodenberg, DE
IVIS® Spectrum Imaging System	PerkinElmer, Waltham, USA
Kühlschrank (+4 °C)	Liebherr, Bulle, CH
Laborwaage LC 2200 P	Sartorius, Göttingen, DE
Lichtmikroskop DM-IL	Leica Camera, Wetzlar, DE
Luminoskan™	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnetrührer MR-Hei Standard	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Mikropipette 0,1-2 µl	VWR, Darmstadt, DE
Mikropipette 0,5-10 µl	VWR, Darmstadt, DE
Mikropipette 100-1000 µl	VWR, Darmstadt, DE
Mikropipette 10-100 µl	VWR, Darmstadt, DE
Mikropipette 2-20 µl	VWR, Darmstadt, DE
Mikrozentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, DE
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
Novaspec Plus Photometer	Amersham Biosciences
NU-8700 IR Autoflow Incubator	Nuaire, Plymouth, USA
Peristaltic Pump 2115	LKB, Bromma, Schweden

pH-Meter inolab pH 720	WTW, Weilheim, DE
Pipettierhilfe peqMATE	PEQLAB, Erlangen, DE
Plattformschüttler Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Sicherheitswerkbank NU-437-600E	NuAire, Plymouth, USA
Sonopuls Ultraschall-Homogenisator	Bandelin, Berlin, DE
Standautoklav V75	Systemec, Linden, DE
SW23 Schüttelwasserbad	JULABO GmbH, Seelbach, DE
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, DE
TissueRuptor	Qiagen, Venlo, NL
Vortex-Schüttler peqTWIST	PEQLAB, Erlangen, DE
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich GmbH + Co. KG, Tuttlingen, DE
Eiswürfelbereiter AF 124	Scotsman Industries, Vernon Hills, USA
Trockenschrank	Heraeus, Hanau, DE
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzplattenreader Fluoroskan Ascent	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.2 Reagenzien, Chemikalien, Lösungen, Medien

Bezeichnung	Hersteller
(+)-JQ1	Selleckchem, Houston, USA
2-Propanol (ROTIPURAN® ≥ 99,8 % p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
5X RT Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Argatroban	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Azacididine	Selleckchem, Houston, USA
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega, Fitchburg, USA

Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
C646	Selleckchem, Houston, USA
Collagenase (Clostridiopeptidase A) EC: 3.4.24.3	Serva Electrophoresis, Heidelberg, DE
Decitabine	Selleckchem, Houston, USA
Diff-Quik® Stain	Medion Diagnostics, Miami, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DMEM + 10 % FBS + 1 % P/S	Biochrom GmbH, Berlin GIBCO, Paisley, UK PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
dNTP	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Doxycyclin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DPBS w/o Ca, Mg	Life Technologies Limited, Paisley, UK
DTT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EPZ005687	Selleckchem, Houston, USA
Ethanol (ROTIPURAN® ≥ 70 % p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Gelatine	Merck Millipore, Darmstadt, DE
GSK J4 HCl	Selleckchem, Houston, USA
HCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Heparin	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Isofluran (Forane®)	AbbVie, North Chicago, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Ketamin	Inresa, Arzneimittel GmbH, Freiburg, DE
Kristallviolett	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lomeguatrib	Selleckchem, Houston, USA
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Oligo(dT)-Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Panobinostat (LBH589)	Selleckchem, Houston, USA
Passive Lysis 5X Buffer	Promega, Fitchburg, USA
peqGOLD TriFAST™	VWR, Darmstadt, DE
Phenprocoumon	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Pinometostat (EPZ5676)	Selleckchem, Houston, USA
Primary Hepatocytes Supplements	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Hercules, USA
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Venlo, NL
Quisinostat (JNJ-26481585)	Selleckchem, Houston, USA
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RG108	Selleckchem, Houston, USA
RNA Grade Glykogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI	Gibco by Life Technologies, Paisley, UK
Selisistat (EX 527)	Selleckchem, Houston, USA
Terralin Flächendesinfektion	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, DE
Trichlormethan (ROTIPURAN® ≥ 99 % p.a.)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Trichostatin A (TSA)	Selleckchem, Houston, USA

Trypanblau (0,4 %)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Vorinostat (SAHA)	Selleckchem, Houston, USA
Williams E	Merck Millipore, Darmstadt, DE
Xylazin (Rompun ®)	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE
Zebularine	Selleckchem, Houston, USA
ROTI®Histofix 4%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

2.1.3 Puffer

Puffer	Zusammensetzung	Zweck
Puffer zur Isolation primärer Hepatozyten (I)	Natriumchlorid (NaCl; 136,89 mM), Kaliumchlorid (KCl; 52,31 mM), HEPES (10 mM), pH 7,4	Isolation primärer Hepatozyten
Puffer zur Isolation primärer Hepatozyten (II)	Natriumchlorid (NaCl; 136,89 mM), Kaliumchlorid (KCl; 52,31 mM), Calciumchlorid (CaCl ₂ ; 1,62 mM), HEPES (10 mM), Collagenase (0,05%), pH 7,6	Isolation primärer Hepatozyten
Puffer zur Isolation primärer Hepatozyten (III)	Natriumchlorid (NaCl; 136,89 mM), Kaliumchlorid (KCl; 52,31 mM), Calciumchlorid (CaCl ₂ ; 1,62 mM), HEPES (10 mM), pH 7,6	Isolation primärer Hepatozyten

2.1.4 Primer

Primer	Sequenz (5-3)
mF2 forward	GGT GAA CCT GCC CAT TGT AGA
mF2 reverse	TCC TCG CTT GGT GTC ATT CA

mp38 forward	TGA CCC TTA TGA CCA GTC CTT T
mp38 reverse	GTC AGG CTC TTC CAC TCA TCT AT
mHNF1-ALPHA forward	CAG AAA GCC GTG GAG
mHNF1-ALPHA reverse	ACA GGT GGG ACT GGT TGA GA
mHNF3-BETA forward	CCT TCA ACC CCT TCT CT
mHNF3-BETA reverse	GCC TTG AGG TCC ATT TTG TG
mHNF4-ALPHA forward	GGT TTA GCC GAC AAT GTG TGG
mHNF4-ALPHA reverse	TCC CGC TCA TTT TGG ACA GC
mGAPDH forward	AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG
mGAPDH reverse	TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA
mBETA-Actin forward	GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG
mBETA-Actin reverse	CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Matrigel GFR Invasion Chamber 24 well	Corning, Corning, USA
Handschuhe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
PCR Platte mit Halbrahmen 96 well	Axon Labortechnik, Kaiserslautern, DE
Falcon® Cell Strainer 40 µm	Corning, Corning, USA
Kosmetiktücher	WEPA Professional, Arnsberg, DE
Heat Sealing Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	VWR, Darmstadt, DE
Pipettenspitzen 100-1250 µl	VWR, Darmstadt, DE
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, DE

Kryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellschaber mit weicher Klinge	Sarstedt AG, Nümbrecht, DE
6-Well-Plate Zellkultur	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
12-Well-Plate	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
24-Well-Plate	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Plate für Zellkultur	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
96-Well-Plate für Luminoskan	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Vasofix® Braunüle® (blau)	B. Braun, Melsungen, DE
Serologische Pipetten 25 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten 25 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten 25 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kanüle 24G lila s.c.	BD, Franklin Lakes, USA
Autoklavierband	Labormedic GmbH, Bonn, DE
Leukofix® Fixierpflaster	BSN medical, Hamburg, DE
Zellkulturflasche T75	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturflasche T175	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Zellkulturschale 100 mm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falcon 50 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Falcon 15 mL	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Glastrichter	DURAN®, Mainz, DE
Alu-Folie	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ES-Kompressen	Paul Hartmann AG, Heidenheim, DE
UV-Küvette	Brand, Wertheim, DE

2.1.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator®	Adobe Inc., San José, USA
Luminoskan Ascent Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CFX Manager™	Bio-Rad, Hercules, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
ImageJ	Wayne Rasband, NIH, Wisconsin, USA
IVIS® Living Image Software	PerkinElmer, Waltham, USA
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolation

Homogenisiertes Gewebe oder Zellen wurden in 1 ml peqGOLD TriFAST™ resuspendiert. Die Probe wurde bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert, anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, die Probe wurde mittels Vortex-Mixer durchmischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 17 Minuten wurde die Probe für 5 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Es bildeten sich 3 Phasen. In einem neuen Probengefäß wurden 500 µl Isopropanol und 1 µl Glykogen vorgelegt. Aus der oberen Phase des alten Probengefäßes wurden etwa 300 µl entnommen und in das neue Probengefäß überführt. Die Probe wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert anschließend wurde sie für 10 Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. An der Gefäßseite hatte sich ein RNA-Pellet gebildet. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Ethanol resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert. Für ein reineres Ergebnis wurde dieser Waschschrift wiederholt. Anschließend wurde der

Überstand verworfen und das Pellet wurde in 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Um Ethanolreste zu entfernen, wurde das Probengefäß offen auf dem Thermomixer bei 50°C und 500 rpm für etwa 5 Minuten geschüttelt. Zum Schluss wurde die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA im NanoDrop gemessen.

2.2.2 cDNA-Synthese

In einem PCR-Probengefäß wurde folgender Pippetieransatz vorbereitet:

Substanz	Volumen
H ₂ O	9-x µl
RNA (1,0 µg/µl)	x µl
Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
dNTPS (10 mM)	1 µl
Σ Volumen	11 µl

Das Probengefäß wurde für 10 Minuten bei 65°C inkubiert, anschließend wurde es für wenige Minuten auf Eis gekühlt. Zu dem bereits angefertigten Ansatz wurden folgende Bestandteile zugegeben:

Substanz	Volumen
5x Reverse Transkriptase Puffer	4 µl
0,1 µM DTT	2 µl
RiboLock	1 µl
RevertAid Reverse Transkriptase	1 µl
Neues Σ Volumen	19 µl

Der Ansatz wurde für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert, anschließend wurde die Reaktion bei 70 °C für 10 Minuten terminiert.

2.2.3 qPCR

In einem Reaktionsgefäß wurde folgender Pipettieransatz vorbereitet:

Substanz	Volumen
2x Quantitect SYBR GREEN PCR MM	10 µl
Primer (forward)	0,6 µl
Primer (reverse)	0,6 µl
H ₂ O	6,8 µl
cDNA	2 µl
Σ Volumen	20 µl

Die Suspension wurde schließlich in eine 96-Well-PCR-Plate überführt.

Im Real Time PCR Detection System wurde folgende Einstellung programmiert:

Schritt	Zeit	Temperatur	Ramp Rate
Aktivierung	15 min	95 °C	20 °C/s
Denaturierung	15 s	94 °C	20 °C/s
Primerhybridisierung	20-30 s	50-60 °C	20 °C/s
Elongation	10-30 s	72 °C	2 °C/s
Datenakquirierung	5 s	X °C	20 °C/s

Die Schritte 2-5 verstehen sich als ein Zyklus und wurden abhängig von der amplifizierten DNA-Menge 35-55 mal wiederholt.

Neben dem jeweiligen Ziel-Primer (z.B. F2) der Untersuchung wurde stets ein Primer eines Housekeeping-Gens (GAPDH und/oder Actin) für die Messung der Genexpression eingesetzt. Die gemessenen Werte der Zielprimer wurden anschließend auf den Wert der Housekeeping-Gene normalisiert.

2.3 Versuchstier- und Zellkulturmethoden

2.3.1 Maus- und Zellkulturlinien

Name	Mauslinie	Ursprung
B6	C57BL/6J	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
D-Insight	C57BL/6J NTac-F2 ^{tm3427} (Rluc-P2A-iRFP-P2A-DTR-P2A-Fluc2CP)Arte	Taconic Biosciences, Köln, DE
F2KD (F2-1)	C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor ^{tm2756} (H1/tetO-RNAi:F2)Arte	Taconic Biosciences, Köln, DE

Die nachfolgenden Maus- und Zellkulturarbeiten wurden an den oben genannten Maus- bzw. Zelllinien durchgeführt. Die Vorgaben der Ethik-Kommission, gemäß Tierschutzgesetz und gemäß Gentechnikgesetz in ihrer jeweils geltenden Fassung wurden von mir zur Kenntnis genommen und ihre Grundsätze sind bei der wissenschaftlichen Arbeit eingehalten worden.

2.3.2 Das D-Insight-Mausmodell

Vor kurzem wurde in der AG Danckwardt ein neues Mausmodell etabliert. In diesen transgenen Mäusen wurde innerhalb des endogenen Prothrombin(F2)-Genlokus ein Knock-in-Allel eingefügt (s. Abbildung 8). Dieses enthält zwei Lumineszenz-Reporter Gene, RLuc8.6 und FLuc2CP sowie ein Fluoreszenz-Reporter Gen, das infrared fluorescence protein (iRFP). Zusätzlich sind ein FLAG-Tag für immunhistochemische Anwendungen und ein Diphtheriatoxin-Rezeptor (DTR) enthalten. Die Genexpression des Knock-In-Allels verläuft, aufgrund der Spaltung durch virale kotranslationale P2A Peptide, polyzistronisch. Dadurch werden das endogene FII Protein mit RLuc und das dazugehörige zellständige Reporter Gen stöchiometrisch 1:1 ko-exprimiert [116].

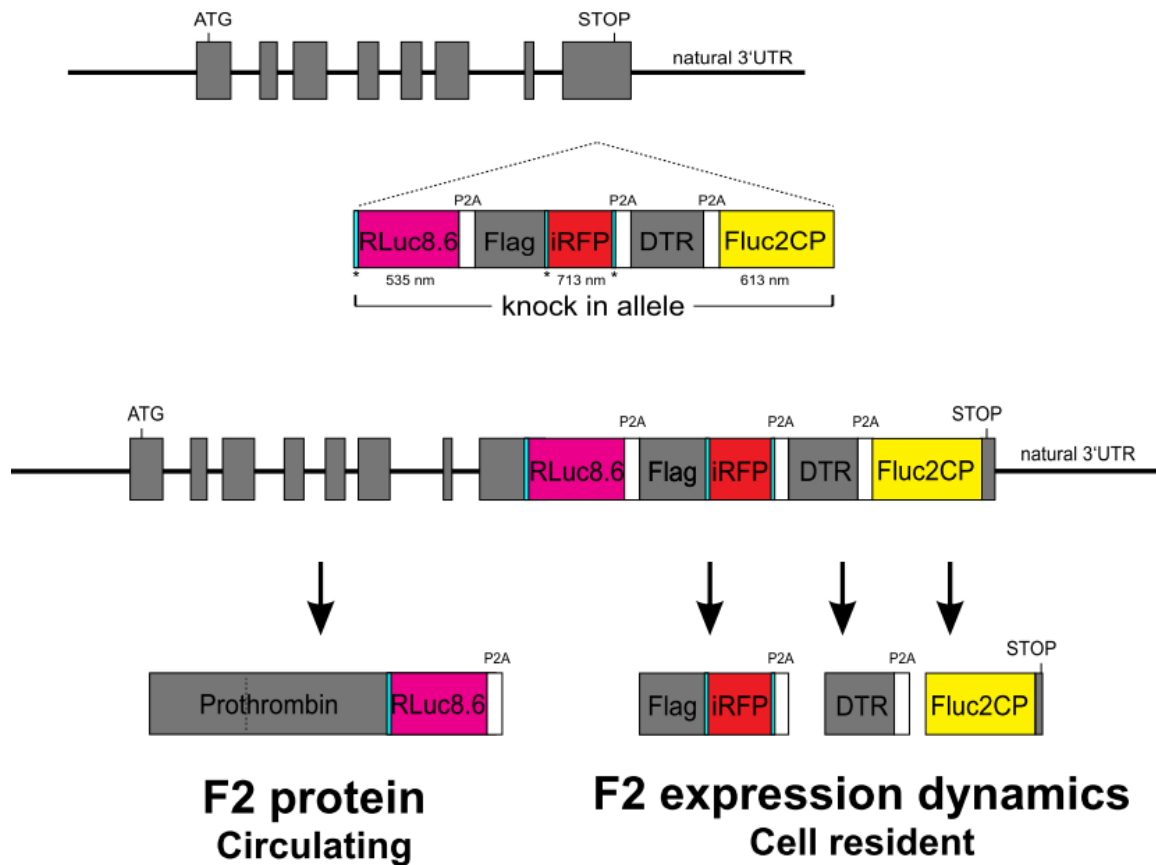


Abbildung 8: D-Insight-Mausmodell – Ein F2-Knock-In-Allel zum in-vitro-Imaging

Innerhalb des endogenen F2-Genlokus wurde ein Knock-In-Allel eingefügt, welches die Luminiszenz-Reportergene RLuc und Fluc sowie ein Fluoreszenz-Reportergen iRFP enthält. Zusätzlich sind ein Flag-Tag und ein Diphtheriatoxin-Rezeptor (DTR) integriert. Das endogene FII-Protein mit RLuc (links) und das zellständige Reportergen (rechts) werden 1:1 stöchiometrisch ko-exprimiert [116]. Abbildung aus [116].

2.3.3 RNAi-vermitteltes Knock-Down-Modell

Im Folgenden wird das kürzlich in der AG Danckwardt etablierte F2KD-RNAi-Mausmodell beschrieben (s. Abbildung 9). In diesen transgenen Tieren wird *eine short hairpin* (sh)RNA exprimiert, welche Prothrombin (F2) als Ziel hat. Dabei wird diese shRNA abhängig von einem Tetrazyklin (tet)-Promotor H1-tetO exprimiert. Unter physiologischen Bedingungen, d.h. ohne Doxycyclin-Zugabe, inhibiert der tet-Repressor (itetR) den tet-Promotor H1-tetO. Gibt man Doxycyclin hinzu, dissoziiert der tet-Repressor vom tet-Promotor, wodurch die shRNA exprimiert wird und der Knockdown des F2-Gens induziert wird [116].

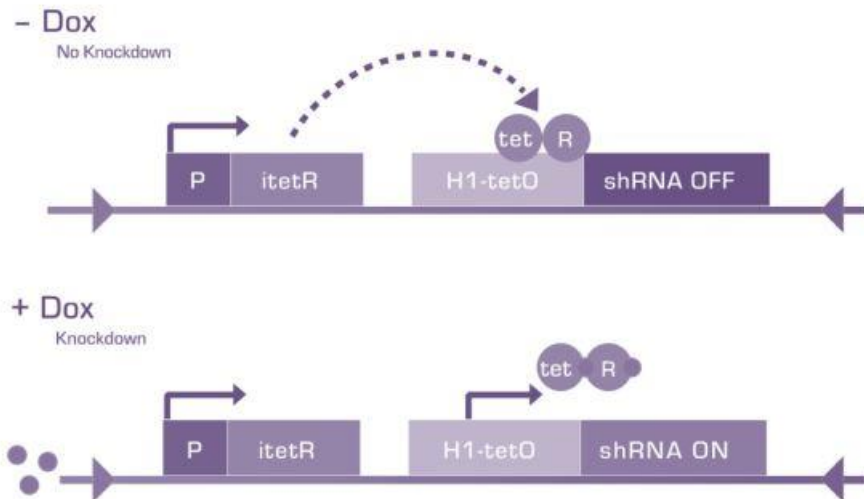


Abbildung 9: Schematische Darstellung des RNAi-vermittelten Knock-Down-Modells

In diesem transgenen Mausmodell wird eine sh-RNA exprimiert, welche F2 anzielt. Diese sh-RNA wird abhängig vom Tetrazyklin-Promotor H1-tetO exprimiert.

Oben: Ohne Doxycyclin-Einfluss inhibiert der Repressor itetR den Promotor. F2 wird exprimiert. Unten: Unter Doxycyclin-Einfluss dissoziiert der itetR vom Promotor, die shRNA wird exprimiert und inhibiert F2-Expression, was zu einem Knockdown des Gens führt [209]

Abbildung der AG Danckwardt

2.3.4 Zellkulturarbeiten

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter der Sicherheitswerkbank NU-437-600E (Nuaire) durchgeführt.

Zuvor wurde die Arbeitsfläche in der Bank sowie alle eingebrachten Materialien mit Terralin desinfiziert. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ und 100% Feuchtigkeit im NU-8700 IR Autoflow Incubator inkubiert. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen mittels Trypsinverdau in 1:4-Verdünnung passagiert, das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für das Einfrieren der Zellen wurde ein Einfriermedium (1:10 DMSO:FBS) angesetzt und das Zellpellet darin resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Kryo-Einfrierbehälter im -80°C – Gefrierschrank eingefroren.

Für die Zellzählung wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (0,4 %) gemischt. Die Auszählung erfolgte auf der Neubauer-Zählkammer unter dem DM-IL Lichtmikroskop (Leica). Die Zellkonzentration wurde über folgende Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl der 8 ausgezählten Quadrate}}{8} \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl/mL}$$

Die Verdopplungszeit wurde mithilfe folgender Formel berechnet [130]:

$$DT = T \times \ln 2 / \ln \left(\frac{X_e}{X_b} \right)$$

Dabei sei T die Inkubationszeit, X_e die Zellzahl nach und X_b die Zellzahl zu Beginn der Inkubation.

2.3.5 Isolierung primärer muriner Hepatozyten

Vor dem Isolierungsprogramm wurden die Isolationspuffer auf 37°C erwärmt. Puffer II wurde 170 µl Collagenase zugesetzt. Die Mäuse wurden mit Xylazin (5-10 mg/kg) und Ketamin (80-120 mg/kg) anästhesiert. Die Injektion erfolgte intraperitoneal. Die Narkosetiefe wurde mittels Schwanz- und Zehenreflex überprüft und die Extremitäten mit Leukofix-Pflaster fixiert. Der Bauch wurde 2 mal mit 70 % Ethanol desinfiziert. Es erfolgte ein V-förmiger Schnitt von der Symphyse zu den beiden Axillen, um die Abdominalorgane freizulegen. Das Omentum majus wurde zur Seite geklappt und der Leberlappen wurde so positioniert, dass die Vena portae freilag. Die V. portae wurde mit einem an eine Peristaltikpumpe angeschlossene peripheren Venenkatheter kanüliert. Es erfolgte eine Perfusion von 100 mL Puffer I und 50 mL Puffer II (+Collagenase). Eine Petrischale mit 25 mL Puffer III wurde vorbereitet. Die Leber wurde entnommen und in die Petrischale überführt. Mithilfe zweier Pinzetten wurde die Leber in der Petrischale ausgeschabt, um ein Lösen der Hepatozyten zu bewirken. Es erfolgte zunächst ein grober Filtrationsschritt mit Kompressen in einem Glastrichter gefolgt von einer feinen Filtration durch einen 40 µm-Cell strainer. Das Filtrat wurde mit weiteren 25 mL Puffer III aufgefüllt und bei 300g für 5 min (ohne Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 15 mL 37°C warmen DPBS resuspendiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 90g für 2 min. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 15 mL William's E Medium (+hepatocytes supplements) resuspendiert. Es erfolgte eine Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer und eine Aussaat auf gelatinisierte Zellkulturplatten.

2.3.6 Isolierung primärer muriner Fibrosarkome

8-12 Wochen alte Mäuse wurden einmalig mit 0,1 mg/30 µl Methylcolantrene in Maisöl injiziert, um ein Tumorwachstum zu induzieren. Die Injektion erfolgte i.m. in die Glutealmuskulatur. Nach 3-6 Monaten wurde der Tumor, bevor der Endpunkt max. 2 cm Durchmesser erreicht wurde, entnommen. Der Tumor wurde unter sterilen Bedingungen mit DPBS gewaschen, in mehrere Stücke geteilt und diese in eine 6-Well-Plate verteilt. In jedes Well wurden 2 ml RPMI (+ 20 % FBS; + 10 x P/S) sowie 10,6 µl Collagenase (für eine Konzentration von 8 mg/ml) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Collagenaseverdau mithilfe der Mikropipette resuspendiert. Die Suspension wurde über einen 40 µm Cell Strainer filtriert und 5 min lang bei 1024g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml DMEM (+ 10% FBS + 10 x P/S) aufgelöst. Anschließend erfolgte eine Auszählung und Aussaat auf eine Zellkulturplatte.

2.3.7 Isolierung primärer muriner Fibroblasten

Das unbehaarte Ohr der Maus wurde für 5 min in 70 % Ethanol eingeweicht. Das Ohr wurde unter sterilen Bedingungen mit DPBS gewaschen, in mehrere Stücke geteilt und diese in eine 6-Well-Plate verteilt. In jedes Well wurden 2 ml RPMI (+ 20 % FBS; + 10 x P/S) sowie 10,6 µl Collagenase (für eine Konzentration von 8 mg/ml) hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Collagenaseverdau mithilfe der Mikropipette resuspendiert. Die Suspension wurde über einen 40 µm Cell Strainer filtriert und 5 min lang bei 1024g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml DMEM (+ 10% FBS + 10 x P/S) aufgelöst. Anschließend erfolgte eine Auszählung und Aussäen auf eine Zellkulturplatte.

2.3.8 Injektion von Fibroblasten/Fibrosarkomen mit Follow-Up in IVIS®

Es wurden 200.000 D-Insight-Fibroblasten bzw. D-Insight-Fibrosarkome in pro 100 µl DPBS resuspendiert. Diese Suspensionen wurden subkutan in den Rücken von B6-Mäusen injiziert. Es erfolgte eine tägliche Inspektion und Palpation der Injektionsstelle. Nach 9, 13 und 15 Tagen erfolgte eine indirekte Messung des FII-Signals über

Messung der Firefly Luciferase Aktivität. Hierfür wurde den Mäusen 100 µl Luciferin injiziert und eine Exposure-Zeit von 600 Sekunden im IVIS® eingestellt.

2.3.9 Inkubation mit epigenetischen Substanzen

Es wurden Zellkulturmedien (Williams E für Hepatozyten, DMEM für Fibrosarkome und Fibroblasten) mit folgenden Testsubstanzen und Konzentrationen hergestellt:

Substanzname	Konzentrationen [µM]	Wirkmechanismus	Untersuchte Zellart und Art des Screenings
(+)-JQ1	0,1; 1; 10; 100	BET-Bromodomänen- Inhibitor (epigen. Reader)	Hep (lt,st)
Decitabine	0,1; 1; 10; 100	DNMT-Inhibitor	Hep (st,lt); FS (lt); FB (lt)
Azacitidine	0,1; 1; 10; 100	DNMT-Inhibitor	Hep (lt,st)
RG108	1; 10; 25; 100	DNMT-Inhibitor	Hep (lt,st)
Zebularine	10	DNMT-Inhibitor	Hep (lt);
EPZ5676 (Pinometostat)	0,0001; 0,001; 0,01; 0,1	DOT1L - Histon- Methyltransferasen- Inhibitor	Hep (st)
EPZ005687	0,1; 1; 10; 100	EZH2 - Histon- Methyltransferasen- Inhibitor	Hep (st)
C646	0,1; 1; 10; 100	Histon- Acetyltransferasen- Inhibitor	Hep (st)
Vorinostat (SAHA)	0,1; 1; 10; 100	Histon-Deacetylasen- Inhibitor	Hep (st)
Quisinostat (JNJ- 26481585)	0,01; 0,1; 1; 10	Histon-Deacetylasen- Inhibitor	Hep (lt,st)

Trichostatin A	0,1; 1; 10; 100	Histon-Deacetylasen-Inhibitor	Hep (st)
Panobinostat (LBH589)	0,01; 0,1; 1; 10	Histon-Deacetylasen-Inhibitor	Hep (lt,st)
GSK J4 HCl	1; 10; 25; 100	Histon-Demethylasen-Inhibitor	Hep (st)
Lomeguatrib	10	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferasen-Inhibitor	Hep (lt);
EX527 (Selisistat)	0,1; 1; 10; 100	SIRT1 - Histon-Deacetylasen-Inhibitor	Hep (st)

Angewandt wurden diese Substanzen entweder auf D-Insight-Hepatozyten (Hep), -Fibrosarkomen (FS) oder -Fibroblasten (FB).

Für die Kurzzeit-Screenings wurden jeweils 5000 Zellen pro Well in 3 technischen Replikaten in einer 96-Well-Plate in substanzfreiem Medium ausgesät. Nach ca. 12-20 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und jeweils durch die o.g. Substanzmedien ersetzt. Da die Substanzen in DMSO und DPBS gelöst wurden, erfolgte Kontrollen mit DMSO- bzw. DPBS-zugesetzten Medien. Auf diese Art und Weise wurden 8 96-Well-Plates vorbereitet und mit Messzeitpunkten beschriftet. Nach 10 min, 30 min, 60 min, 2 h, 3 h, 6 h, 24 h und 48 h wurde das Medium bei der jeweiligen Platte entfernt und die Platte wurde im FLUC-Assay gemessen.

Für die Langzeit-Screenings wurden jeweils 100.000 Zellen pro Well in 3 technischen Replikaten in einer 6-Well-Plate in substanzfreiem Medium ausgesät. Nach ca. 12-20 Stunden Inkubation wurde das Medium abgesaugt und jeweils durch die o.g. Substanzmedien ersetzt. Da die Substanzen in DMSO und DPBS gelöst wurden, erfolgte Kontrollen mit DMSO- bzw. DPBS-zugesetzten Medien. Bei den Fibrosarkomen/Fibroblasten erfolgten zusätzliche Kontrollen mit dem B6-Genotyp. Auf diese Art und Weise wurden 6 6-Well-Plates vorbereitet und mit Messzeitpunkten beschriftet. Nach 2, 3, 4, 5, 6, und 7 Tagen wurde das Medium entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber gelöst und in 1x Passive Lysis Buffer resuspendiert. Diese Suspension wurde im FLUC-Assay gemessen. Die gemessenen

Werte wurden auf die Proteinkonzentration und auf DMSO als Lösungssubstanz normalisiert.

2.3.10 Messung der Proteinkonzentration

Das zu messende Gewebe bzw. die geernteten Zellen wurden homogenisiert und in 1x Passive Lysis Buffer resuspendiert. Es wurden 1:10- und 1:100-Verdünnungen mit Passive Lysis Buffer hergestellt. Messküvetten wurde 1000 µl Protein Assay Dye Reagent Concentrate vorgelegt. Die erste Messung, zum Zweck der Kalibrierung, erfolgte dann mit 2 µl Passive Lysis Buffer, die anschließenden mit der Proteinmesslösung sowie 2 µl Probe. Bei Werten außerhalb der Erfassungsgrenze wurden die Verdünnungen gemessen, Messwerte wurden angezeigt in µg/µl.

2.3.11 Firefly-Luciferase(FLUC)-Assay

Das zu messende Gewebe bzw. die geernteten Zellen wurden homogenisiert und in 1x Passive Lysis Buffer resuspendiert. Die Suspension wurde in 3 technischen Replikaten zu 50 µl in weißen 96-Well-Plates verteilt. Die Platte wurde dann bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf dem Plattformschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde reihenweise pro Well 50 µl Bright-Glo™ Luciferase zugegeben und im Luminoskan™ bei einer integration time von 1000 ms gemessen. Die Proteinkonzentration (s. Abschnitt „Messung der Proteinkonzentration“) aller gemessener Proben wurde bestimmt und der gemessene Wert der Luminoskan-Software wurde auf die Proteinkonzentration normalisiert.

2.3.12 Colony-Forming-Unit-Assay

Auf eine 6-Well-Plate wurden 100 Fibrosarkomzellen (F2KD und B6) pro Well in (+/-)-Doxycyclin-DMEM-Medium ausgesät. Eine Kontrolle wurde mittels 0,1% DMSO durchgeführt. Die Platte wurde für etwa 14 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt. Nach etwa 14 Tagen waren makroskopisch sichtbare Kolonien vorhanden. Das Medium wurde entfernt und die Wells wurden mit DPBS gewaschen. Nun wurde in jedes Well 1 ml Histofix zugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das PFA wurde entfernt und es wurde 2 ml Kristallviolettlösung (0,5 g Kristallviolett Pulver; 20 ml

100 % Methanol; 80 ml destilliertes Wasser) in jedes Well gegeben. Anschließend wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wurde entfernt und die Platten wurden 3 mal mit Leitungswasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Software ImageJ. Es wurden die Kolonien gezählt und die Koloniefäche ausgemessen.

2.3.13 Matrigel-Invasion-Assay

F2KD- bzw. B6-Fibrosarkome wurden für 1 Woche in (+/-)-Doxycyclin-DMEM-Medium (10 µg/ml) inkubiert. Es wurden zwei DMEM-Medien vorbereitet. Dem ersten Medium waren außer Doxycyclin (bzw. 0,1% DMSO als Kontrollsubstanz) keine Zusatzstoffe beigefügt, das zweite Medium enthielt zusätzlich 10 % FBS als Chemoattraktans. Zunächst wurde die 24-Well-Plate des Matrigel-Invasion-Assay-Sets mit 750 µl des FBS-haltigen Mediums befüllt. Nun wurden die Inlets eingesetzt und mit 500 µl des ersten Mediums + 10.000 Fibrosarkomzellen befüllt.

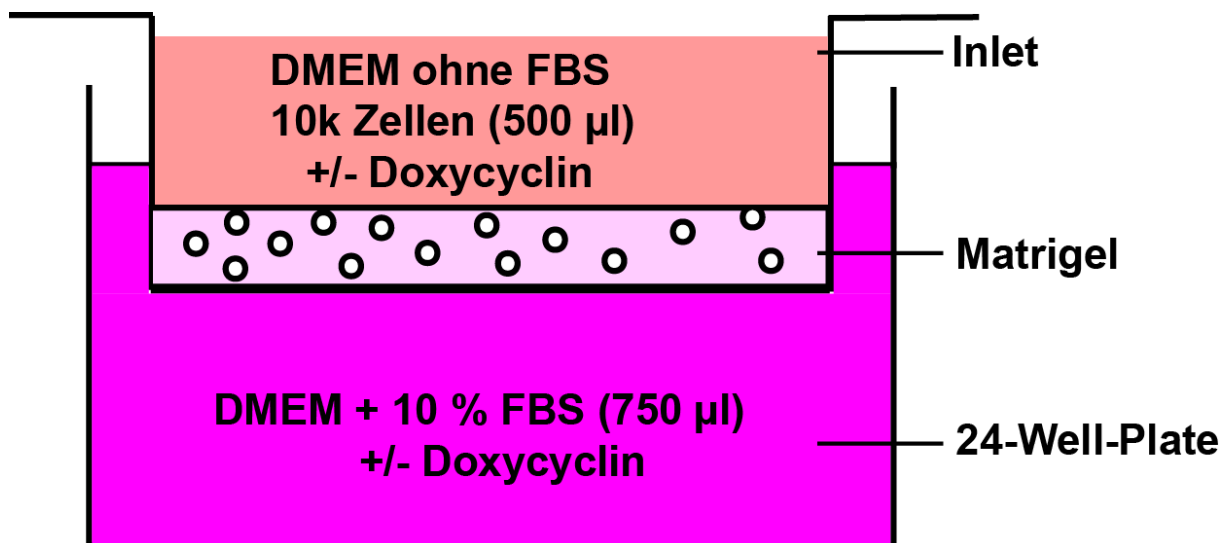


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Matrigel-Invasion-Assays

Die Fibrosarkomzellen befinden sich in einem Inlet in Medium ohne FBS. Eine Schicht poröses Matrigel trennt sie von der 24-Well-Platte, welche mit Medium mit dem Attraktans FBS gefüllt ist.

Die Matrigel-Invasion-Platte wurde für 24 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden die Inlets abgesaugt und die innere Gelseite vorsichtig mit einem nassen Wattestäbchen abgewischt, um nicht verwertbare Zellen zu entfernen. Die Inlets wurden dann gemäß Diff-Quik™-Protokoll gefärbt. Hierfür wurde in einer zusätzlichen 12-Well-Plate eine Färbereihe aus Fixierlösung,

Färbelösung I, Färbelösung II und destilliertem Wasser hergestellt. Die Inlets wurden in dieser Reihenfolge etwa 3-5 mal für 1 Sekunde in die jeweilige Lösung gehalten und dann für ca. 24 Stunden an der Luft getrocknet. Die Auswertung erfolgte durch Fotografieren der Inlet-Gelaußenseite im Mikroskop und anschließendes Auszählen der Zellen mit der Software ImageJ.

2.3.14 Direkte und Indirekte FII-Inhibition mittels Argatroban und Phenprocoumon

Auf eine 6-Well-Plate wurden 50.0000 Fibrosarkomzellen (D-Insight und B6) pro Well in DMEM-Medium ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder mit 1 µg/ml Argatroban (Kontrolle DMSO 0,1 %) oder 100 µg/ml Phenprocoumon (Kontrolle MetOH 1%) in DMEM behandelt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen ausgezählt, anschließend wurde die FII-Expression im Lumineszenz-Reader gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Generieren eines Fibrosarkoms und Detektion von extrahepatischem Prothrombin *in vivo*

Prothrombin wird überwiegend von Hepatozyten in der Leber exprimiert. Im Rahmen unterschiedlicher Krebserkrankungen konnte jedoch gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und erhöhter Thrombinexpression gibt. [131] In dieser Arbeit wurde ein neugeneriertes Modell, das sogenannte D-Insight-Mausmodell [116] (s. Abbildung 8) verwendet, um eine Detektion der FII-Expression in unterschiedlichen Geweben zu ermöglichen.

In dieser Untersuchung wurden Methylcolanthren(MCA)-induzierte murine Fibrosarkome isoliert und in Zellkultur gebracht. Um zu überprüfen, ob es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Fibrosarkomzellen handelt und um eine „ektopy“ FII-Expression in Tumoren zu untersuchen, wurden 100.000 bzw. 200.000 D-Insight-Fibrosarkomzellen in B6-Mäuse injiziert. Diese B6-Mäuse dienten als Negativkontrolle, um etwaige FII-Expressionssignale durch das Hauptproduktionsorgan Leber auszuschließen. Es erfolgte ein Imaging-Follow-Up nach 9, 13 und 15 Tagen. Bereits nach wenigen Tagen war bei den Fibrosarkom-Mäusen ein solider Tumor tastbar. Nach 9 Tagen bzw. 13 Tagen (s. Abbildung 11) war eine vermehrte Luciferase-Aktivität über den Tumoren feststellbar. In zwei B6-Mäuse wurden zur weiteren Negativkontrolle 100.000 D-Insight Fibroblasten injiziert. 12 Tage *post injectionem* war noch immer kein solider Tumor tastbar, es war keine FII-Signalanreicherung im IVIS® festzustellen.

Somit konnte mit diesem Experiment gezeigt werden, dass eine Injektion von Fibrosarkomzellen erneut zu einer Tumorformation führt und dieser Tumor anschließend eine ektopye Prothrombinexpression aufweist.



Abbildung 11: Detektion ectopen Prothrombins in Fibrosarkomen

Eine Injektion von D-Insight-Fibrosarkom-Zellen führt zur Bildung eines soliden Tumors, welcher ein Signal im In-Vivo-Imaging-System zeigt. In B6-Mäuse wurden entweder 100.000 oder 200.000 D-Insight Fibrosarkome injiziert. Nach 9 bzw. 13 Tagen post injectionem zeigte sich ein erhöhtes FII-Signal im IVIS®.

3.2 Ektope Prothrombinexpression in Fibrosarkomen

Im vorigen Experiment wurde gezeigt, dass sich injizierte Fibrosarkomzellen zu einem soliden Tumor formieren. Dieser Tumor zeigte folglich eine FII-Signalanreicherung im IVIS®. Nun sollte untersucht werden, ob dieses Signal von den Tumorzellen selbst ausgeht oder ob die Expression nur im Tumorverbund vorhanden und damit eher in der Mikroumgebung bzw. in den umliegenden Blutgefäßen zu finden ist.

Hierfür wurden MCA-induzierte Fibrosarkome isoliert, in Zellkultur gebracht und 3 Tage lang inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abgelöst und lysiert. Es wurde indirekt die FII-Expression über Messung der Firefly Luciferase-Aktivität gemessen (s. Abbildung 12). Da Prothrombin überwiegend in der Leber synthetisiert wird, wurden den D-Insight Fibrosarkomen D-Insight Hepatozyten als Positivkontrolle gegenübergestellt. Die entsprechenden Wildtyp-Zellen dienten als Negativkontrolle. Die untersuchten Fibrosarkome zeigten eine signifikant erhöhte ($p < 0,001$) FII-Expression gegenüber beiden Negativkontrollen. Um diese Resultate weiter zu validieren, wurde mittels qPCR die relative F2-RNA-Expression gemessen und Hepatozyten (Positivkontrolle) und Fibroblasten (Negativkontrolle) gegenübergestellt.

Im Vergleich zu den Hepatozyten fand sich hier keine erhöhte F2-RNA-Expression (s. Abbildung 12).

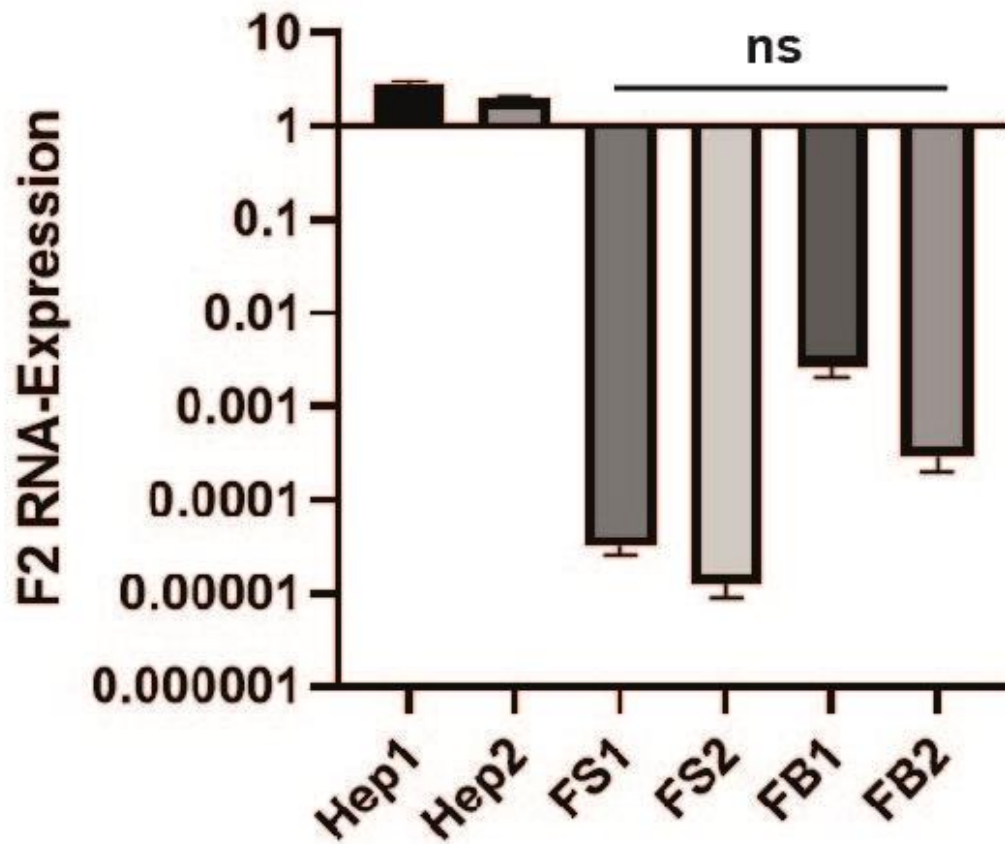


Abbildung 12: F2-RNA-Expression in Hep, FS und FB

Mittels qPCR wurde die relative F2-RNA-Expression in Hep, FB und FS gemessen. Fibroblasten dienen als Negativkontrolle, Hepatozyten als Positivkontrolle. Verglichen mit der Negativkontrolle gibt es in den Fibrosarkomen keine signifikante F2-Genexpression. (n = 4 technische/ 2 biologische Replikate)

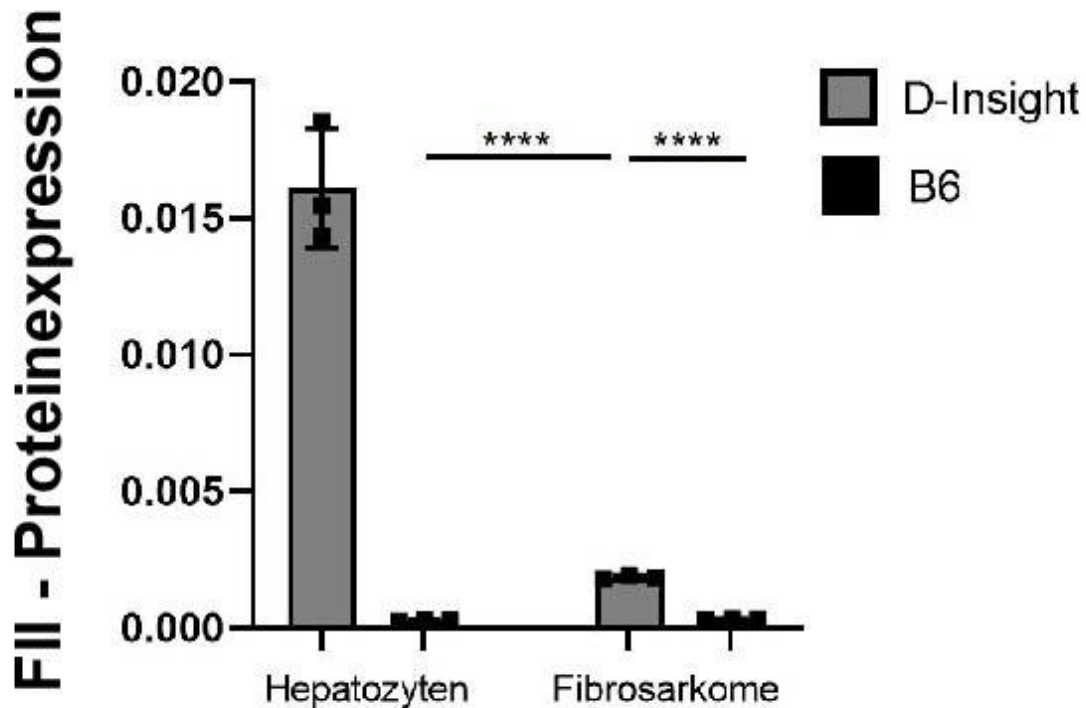


Abbildung 13: Fibrosarkome exprimieren ektope FII

Über Messung der Firefly Luciferase Aktivität wurde indirekt die Proteinexpression von FII in Hepatozyten und Fibrosarkomen gemessen. Hepatozyten dienen als Positivkontrolle, B6-Fibrosarkome als Negativkontrolle. Ungepaarter zweiseitiger T-Test ($p < 0,001$; $n=3$ technische Replikate, einzelne Werte werden durch Punkte dargestellt)

Es konnte gezeigt werden, dass nicht nur im Tumorverbund, sondern auch in den solitären Tumorzellen eine FII-Expression vorhanden ist und damit unabhängig von der Tumormikroumgebung abläuft.

3.3 FII-Expression innerhalb unterschiedlicher Fibrosarkom-Klone

Zuvor wurde beobachtet, dass einzelne Fibrosarkome losgelöst vom soliden Tumorverbund „ektop“ FII exprimieren. Abgeleitet aus diesen Resultaten, galt es herauszufinden, ob es innerhalb unterschiedlicher Fibrosarkomklone eine Heterogenität der FII-Expression gibt.

Hierfür wurden unterschiedliche MCA-Fibrosarkome isoliert und in Zellkultur gebracht. Anschließend wurden die Zellklone 3 Tage lang inkubiert. Die Zellen wurden abgelöst und lysiert. Im FLUC-Assay wurde indirekt die FII-Expression gemessen. Als Negativkontrolle dienten D-Insight-Fibroblasten (s. Abbildung 14).

Alle D-Insight-Fibrosarkome wiesen eine signifikante Erhöhung bezüglich der Negativkontrolle Fibroblasten auf. Doch auch beim Vergleichen der einzelnen Fibrosarkomklone gab es zum Teil signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede. Diese Beobachtungen suggerierten somit, dass jeder Fibrosarkomtumor ein individuelles Maß an FII-Expression mitbringt.

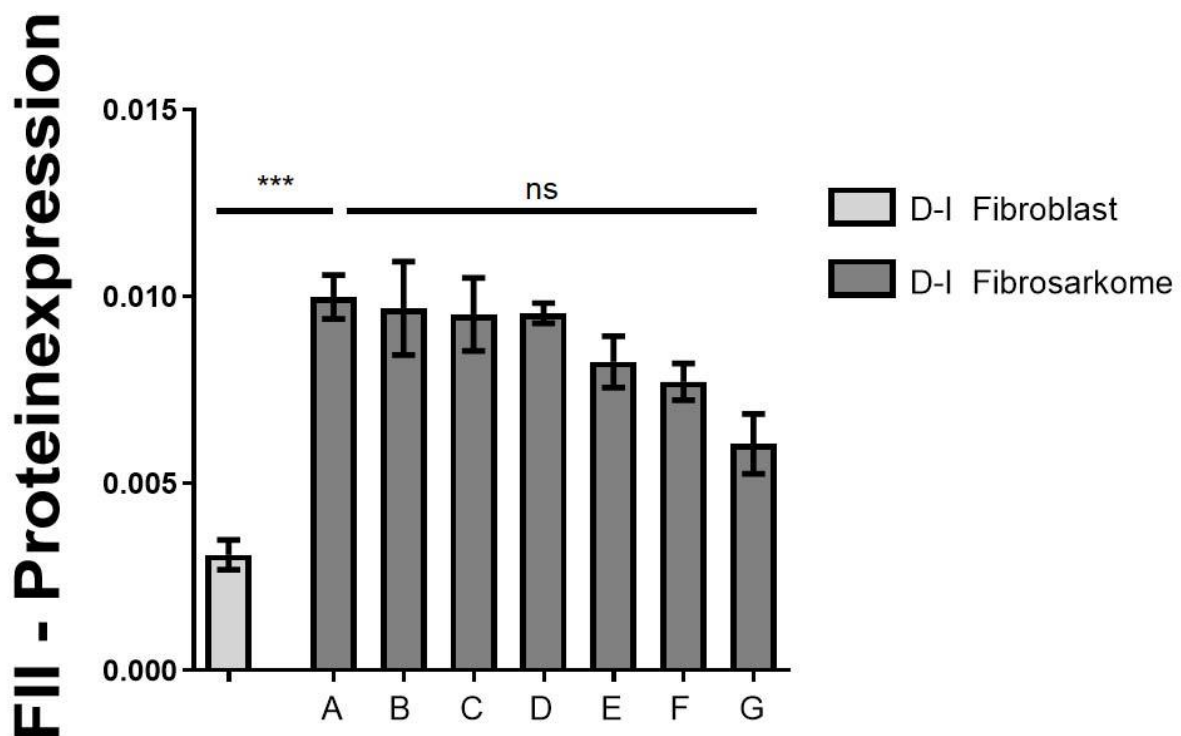


Abbildung 14: Heterogenität der FII-Expression in unterschiedlichen Fibrosarkomklonen
 Über Messung der Firefly Luciferase Aktivität wurde indirekt die Proteinexpression von FII in unterschiedlichen Fibrosarkomklonen gemessen. D-Insight Fibroblasten dienten als Negativkontrolle. One-Way ANOVA. Tukey post-hoc Test ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$; $n=3$ biologische Replikate)

3.4 FII-Expression und Proliferation von Fibrosarkomen

Es konnte demonstriert werden, dass es innerhalb unterschiedlicher Fibrosarkomklone eine Heterogenität der FII-Expression gibt. Es ist bekannt, dass Malignome mit erhöhten Biomarkern der Thrombinsynthese einhergehen [92] und dass diese in einem negativen Zusammenhang mit der Prognose [93] stehen. Nicht abschließend geklärt ist, ob sich diese Prognoseverschlechterung folglich durch letale thromboembolische Ereignisse ergibt oder ob sie sich auf den Tumorprogress selbst beziehen. Innerhalb dieser Versuchsreihe sollte daher untersucht werden, ob die FII-Expression der unterschiedlichen Fibrosarkomklone im Zusammenhang mit deren Proliferation steht.

Hierfür wurden unterschiedliche MCA-Fibrosarkome isoliert und in Zellkultur gebracht. Anschließend wurden die Zellklone 3 Tage lang inkubiert. Die Zellen wurden abgelöst, in der Neubauer-Zählkammer gezählt und lysiert. Mittels FLUC-Assay wurde indirekt die FII-Expression gemessen. Es wurde die Verdopplungszeit jedes Klons berechnet und dem entsprechenden Signal der FII-Proteinexpression gegenübergestellt (s. Abbildung 15).

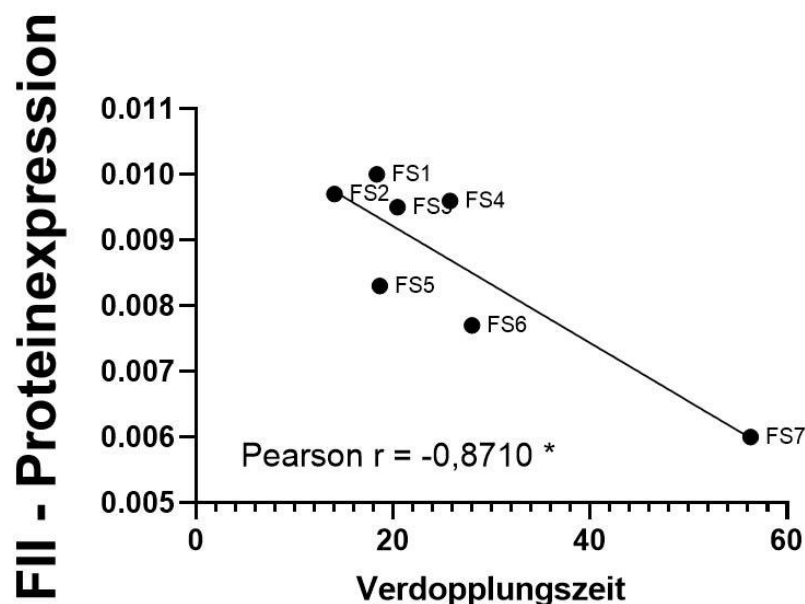


Abbildung 15: Die FII-Proteinexpression korreliert negativ mit der Verdopplungszeit

Über Messung der Firefly Luciferase Aktivität wurde indirekt die Proteinexpression von FII in unterschiedlichen Fibrosarkoklonen gemessen. Dieser Proteinexpression wurde die Verdopplungszeit der Fibrosarkome gegenübergestellt. Korrelationsanalyse, zweiseitig ($p=0,0107$; Pearsons $r = -0,8710$)

Es ergab sich eine negative Korrelation mit signifikantem Korrelationskoeffizienten ($p < 0,05$). Zu sehen ist, dass mit steigender Verdopplungszeit (d.h. mit langsamerer Proliferation) eine geringere FII-Proteinexpression einhergeht. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die ektope FII-Expression des Tumors dessen Tumorprogress positiv beeinflusst.

3.5 Transkriptionsfaktoren der F2-Genexpression

In den Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass Fibrosarkome ektope FII exprimieren und dass diese Expression in positivem Zusammenhang mit deren Proliferation steht. Bislang größtenteils der Leber zugeordnet wurden bereits die Transkriptionsfaktoren HNF4-Alpha, HNF1-Alpha und HNF3-Beta (FOXA2) identifiziert. Dabei binden diese an die Prothrombin Enhancer-Region und stimulieren dessen Expression. Die stärkste Wirkung geht hierbei von FOXA2 aus [83, 132]. Jedoch ist auch von einigen Malignomen bekannt, dass sie erhöhte Genexpressionslevel von FOXA2 aufweisen und diese mit der Proliferation korrelieren [133]. Daher sollte überprüft werden, ob diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls beteiligt sind an der F2-Genexpression in den Fibrosarkomen. Mittels qPCR wurde die Expression von HNF1-Alpha, HNF4-Alpha und HNF3-Beta untersucht. Dabei dienten Hepatozyten als Positivkontrolle und Fibroblasten als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt.

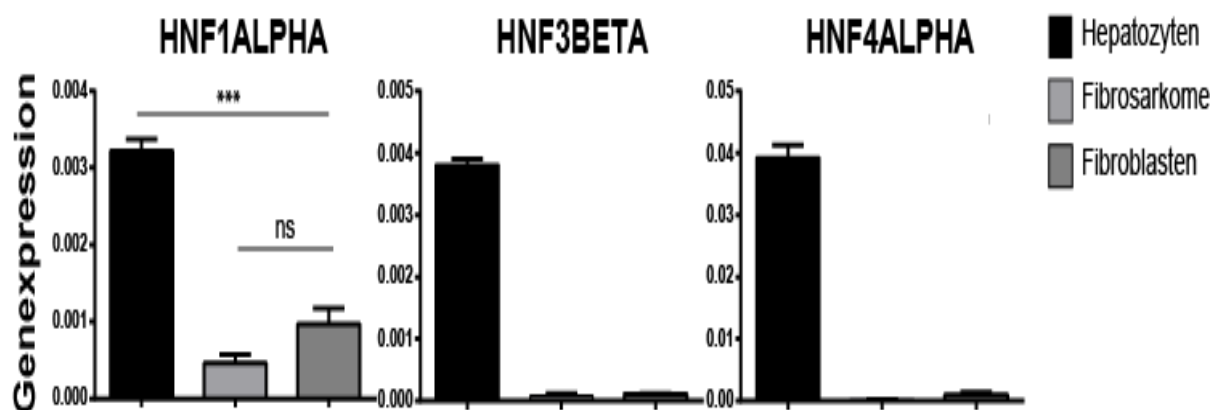


Abbildung 16: F2-assoziierte Transkriptionsfaktoren

Mittels qPCR wurde die Expression dreier F2-assoziiierter Transkriptionsfaktoren gemessen. Verglichen wurden Hepatozyten und Fibrosarkome, Fibroblasten dienten als Negativkontrolle. F2-assoziierte Transkriptionsfaktoren werden in Hepatozyten exprimiert, jedoch nicht in Fibrosarkomen. Ungepaarter zweiseitiger T-Test ($p < 0,001$; $n = 3$ biologische Replikate)

Beobachtet wurde die bekannte Expression in den Hepatozyten. In den Fibrosarkomen hingegen konnte keiner der drei Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen suggerieren damit keine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren HNF1-Alpha, HNF4-Alpha oder FOXA2 an der Prothrombinexpression in Fibrosarkomen.

3.6 FII und Tumorinvasivität

Aus den vorangehenden Experimenten ergibt sich, dass innerhalb unterschiedlicher Fibrosarkomklone eine Heterogenität der FII-Expression besteht. Zudem wurde beobachtet, dass mit höherer FII-Expression eine stärkere Proliferation der Fibrosarkomzellen einhergeht. Nun galt es zu untersuchen, ob FII neben der Proliferation auch das invasive Wachstumsmuster der Sarkome beeinflusst. In einer Studie wurde beobachtet, wie die Reduktion zirkulierenden Prothrombins das Tumorwachstum in einem Kolonkarzinommodell reduzierte [134], in einer anderen bewirkte eine Thrombininhibition eine verminderte Knochenmetastasierung in einem Mammakarzinommodell [135].

Kürzlich wurde in der AG Danckwardt ein RNAi-vermitteltes F2-Knock-Down-Modell (im Folgenden „F2KD“) etabliert, welches durch Zugabe von Doxycyclin eine FII-Depletion in jeder beliebigen Körperzelle dieser Mauslinie erlaubt [116]. MCA-induzierte Fibrosarkome wurden aus diesen F2KD-Mäusen isoliert und in Kultur gebracht. Anschließend wurde (unter Zugabe von 10 µg/ml Doxycyclin oder der Kontrollsubstanz DMSO) das invasive Wachstum der Zellen im Matrigel-Invasion-Assay analysiert. Als Negativkontrolle dienten Wildtyp-Fibrosarkomzellen.

Nach 24 Stunden Substanzinkubation wurden die Inlets der Matrigelplatte entfernt und die Zellen angefärbt. Im Anschluss wurden die Inlets für 24 Stunden luftgetrocknet und die Zellen mikroskopisch ausgezählt.

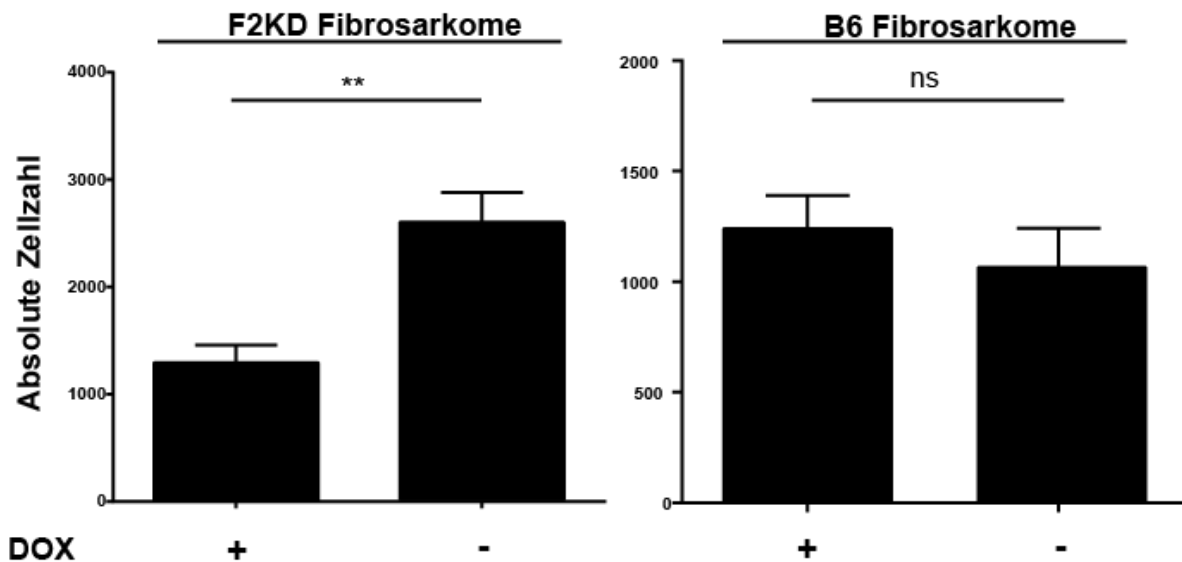


Abbildung 17: FII-Depletion bewirkt eine verminderte Tumorinvasivität bei Fibrosarkomen
 F2KD-Fibrosarkome wurden mit 10 µg/ml Doxycyclin behandelt, um eine FII-Depletion zu auszulösen. Im Matrigel-Invasion-Assay wurde anschließend die Invasivität bestimmt, indem die Zellzahl auf dem Inlet der Matrigel-Platte ausgezählt wurde. B6-Fibrosarkome dienen als Negativkontrolle. Ungepaarter zweiseitiger T-Test (** $p < 0,01$; $n = 6$ biologische Replikate)

In Abbildung 17 sind die absoluten Zellzahlen der Untersuchungs- und Kontrollgruppe dargestellt. In der Untersuchungsgruppe (F2KD-Fibrosarkome) fiel die Zellzahl der durch die Matrigelmembran migrierten Zellen bei Zugabe von Doxycyclin signifikant ($p < 0,01$) niedriger aus im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe unterschied sich die Zellzahl der beiden Substanzgruppen nicht signifikant. Insgesamt lässt dies also vermuten, dass eine FII-Depletion zu einer geringeren Invasivität der Fibrosarkomzellen führt.

3.7 FII-Depletion und das Wachstum von Zellkolonien

Das Vorexperiment deutet an, dass eine FII-Depletion das invasive Wachstum der Fibrosarkomzellen reduziert. Diese Erkenntnis ist besonders relevant in Zusammenschau mit einem fortgeschrittenen Krebsleiden, wenn der Tumor bereits Faszien oder andere benachbarte Strukturen infiltriert hat. Es sollte daher analysiert werden, ob möglicherweise auch in einem früheren Stadium eine FII-Depletion Auswirkung auf die Tumorzinzidenz und das Größenwachstum hat.

In einem Colony-Forming-Unit-Assay (im Folgenden „CFU“) wurden daher FII-depletierte F2KD-Fibrosarkomzellen mit einer Wildtyp-Kontrollgruppe verglichen. Beide Gruppen wurden in 10 µg/ml Doxycyclin bzw. der Kontrollsubstanz DMSO

inkubiert. Es wurden jeweils 500 Fibrosarkomzellen ausgesät. Nach 14 Tagen Substanzinkubation wurden die Zellkolonien angefärbt und ausgezählt, bzw. ausgemessen. Die Auszählung erfolgte mithilfe der Software ImageJ, die Ausmessung erfolgt händisch nach Ausdrucken einer Fotokopie der 6-Well-Plates (etwaige Unterschiede in den Umrechnungsfaktoren ergaben sich durch unterschiedliche Druckerskalierungen). In Abbildung 18 ist ein repräsentatives Bild einer angefärbten CFU-Platte zu sehen. Dargestellt ist die Untersuchungsgruppe der F2KD-Sarkome, die mit Doxycyclin (oben) bzw. DMSO (unten) behandelt wurde. Bereits makroskopisch ist festzustellen, dass eine FII-Depletion zu kleineren Koloniedurchmessern bei den Sarkomen führt.

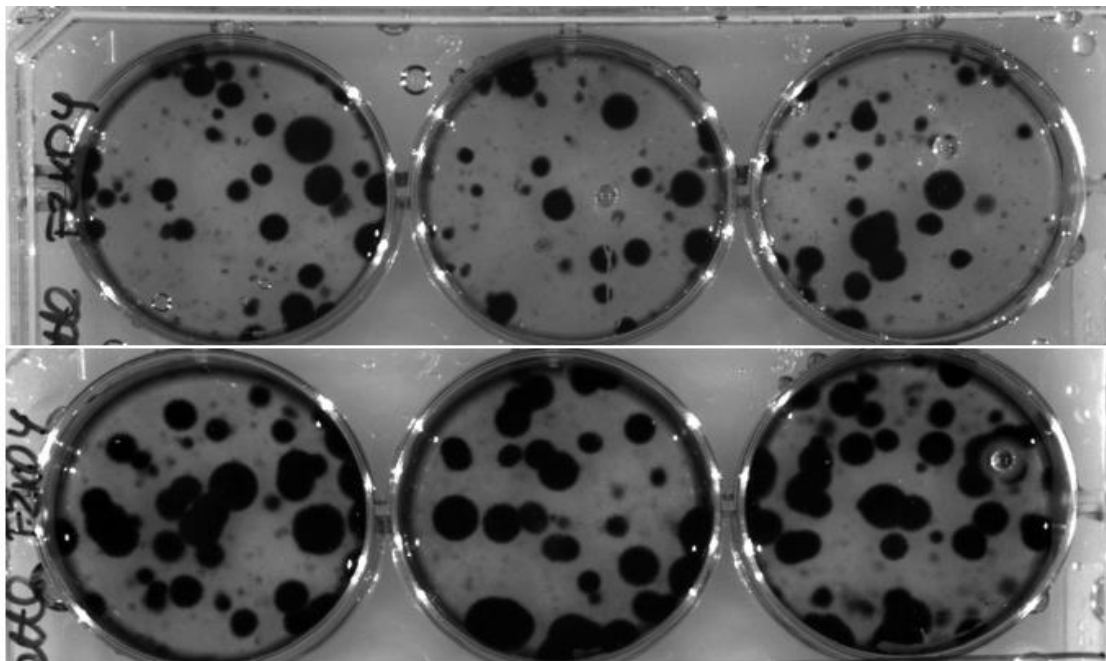


Abbildung 18: Repräsentatives Bild behandelter F2KD-Fibrosarkome im CFU-Assay

Die Zellen der oberen Reihe wurden mittels 10 µg/ml Doxycyclin FII-depletiert, die Zellen der unteren Reihe wurden mit der Kontrollsubstanz DMSO behandelt. Makroskopisch fällt auf, dass die Kolonien der FII-depletierten Gruppe kleiner sind.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Anzahl der Kolonien der Untersuchungs- und Kontrollgruppe bzw. deren Koloniedurchmesser. Zu sehen ist hierbei, dass sich die Kolonienanzahl zwischen Doxycyclin- und DMSO-Gruppe nicht signifikant unterschied, weder in der F2KD- noch in der Kontrollgruppe. Die Koloniedurchmesser hingegen waren in der FII-depletierten F2KD-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) geringer als in der Kontrollgruppe. Diesen Unterschied stellte man bei den Kontroll Sarkomen nicht fest.

Hieraus kann man schließen, dass eine FII-Depletion keine Auswirkung auf die Tumorinzidenz selbst hat. Das Größenwachstum der Kolonien scheint FII jedoch positiv zu beeinflussen.

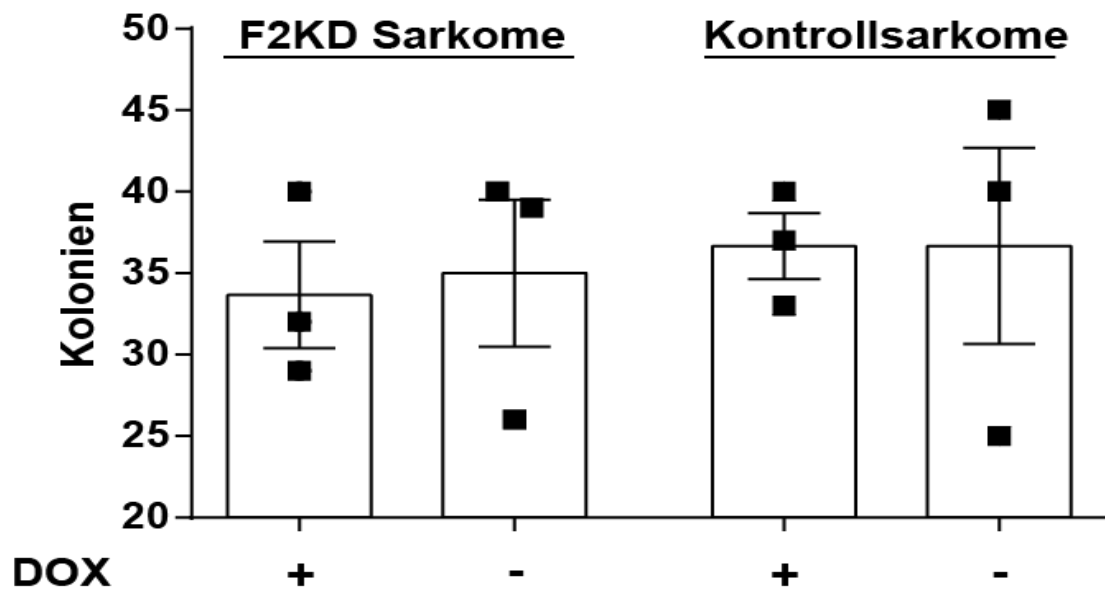


Abbildung 19: Einfluss von FII-Depletion auf die Kolonieanzahl im CFU-Assay
 500 Zellen wurden in 10µg/ml Doxycyclin ausgesät, um eine FII-Depletion zu erzeugen. Nach 14 Tagen Inkubation wurden die Zellkolonien angefärbt und ausgezählt. B6-Fibrosarkome dienen als Negativkontrolle. Ungepaarter zweiseitiger T-Test (n=3 technische Replikate, einzelne Werte werden durch Punkte dargestellt).

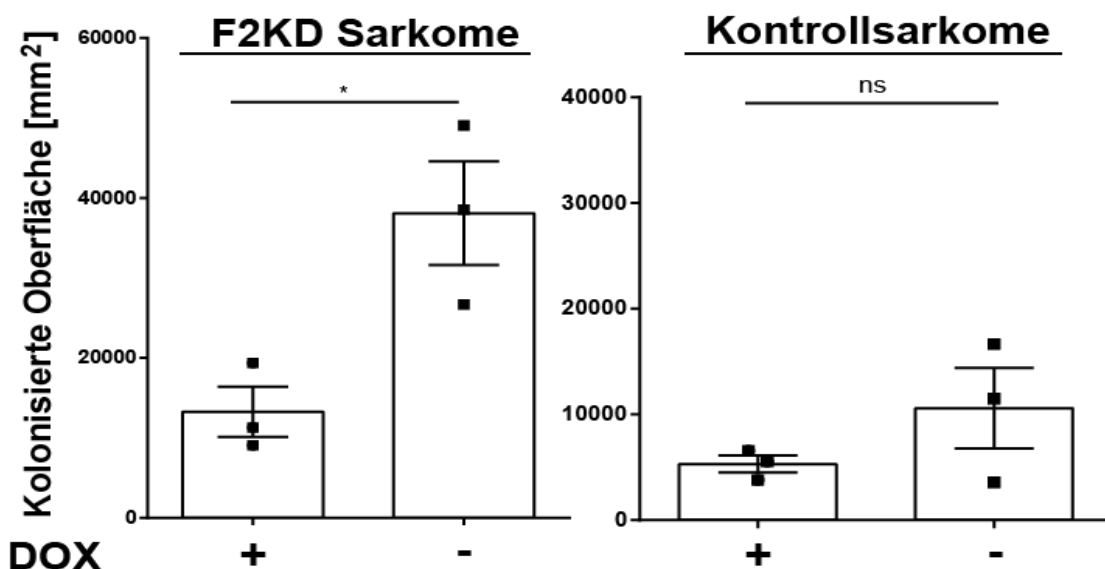


Abbildung 20: Einfluss von FII-Depletion auf Zellgröße und Zellkolonien im CFU-Assay
 500 Zellen wurden in 10µg/ml Doxycyclin ausgesät, um eine FII-Depletion zu erzeugen. Nach 14 Tagen Inkubation wurden die Zellkolonien angefärbt und ausgezählt. B6-Fibrosarkome dienen als Negativkontrolle. Ungepaarter zweiseitiger T-Test (*p<0,05; n=3 technische Replikate, einzelne Werte werden durch Punkte dargestellt).

3.8 Pharmakologische FII-Inhibition und Fibrosarkom-Wachstum

In einer Studiengruppe, die aufgrund eines venösen thromboembolischen Ereignisses mit Warfarin (Vitamin-K-Antagonist, ähnlich wie Phenprocoumon) behandelt wurde, traten im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Krebserkrankungen auf [136]. Zudem zeigten Schulze et al., dass eine Thrombininhibition mittels Argatroban in vitro zu einem verringerten Zellwachstum, Adhäsion und Migration von MDA-MB-468 humanen Brustkrebszellen führte [137].

Um solch eine pharmakologische Inhibition zu testen, wurden innerhalb dieser Versuchsreihe zwei im klinischen Alltag gebräuchliche Vertreter der Antikoagulanzen gewählt. Phenprocoumon als Vertreter der Cumarinderivate inhibiert Thrombin indirekt, indem es die Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung der Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X blockiert. Argatroban hingegen blockiert FIIa direkt. Hier sollte untersucht werden, welche Auswirkung die Substanzen auf das Wachstumsverhalten bzw. die FII-Expression der Fibrosarkome haben. Es wurden 50.000 D-Inspight- und B6-Fibrosarkomzellen ausgesät und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Argatroban oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Phenprocoumon behandelt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen ausgezählt und die FII-Expression indirekt mittels Firefly-Luciferase-Assay gemessen. Als Kontrollgruppen wurden die gleichen Zellansätze ohne Antikoagulanzen gewählt. Im FLUC-Assay dienten zusätzlich Wildtypsarkome als weitere Negativkontrolle.

Die absolute Zellzahl ist in Abbildung 21 dargestellt. Bei der Behandlung mit Argatroban zeigten sich gegenüber der Negativkontrolle keine signifikanten Unterschiede. Bei der Phenprocoumongruppe stellte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte ($p < 0.01$) Zellzahl dar.

In Abbildung 22 ist die indirekt im FLUC-Assay gemessene FII-Expression nach Behandlung mit Argatroban bzw. Phenprocoumon zu sehen. Hier wird deutlich, dass keine der beiden eingesetzten Substanzen eine signifikante Veränderung der Genexpression bewirkte. Zusammengefasst konnte beobachtet werden, dass eine indirekte FII-Inhibierung mit Phenprocoumon bei gleichbleibender FII-Expression zu einer reduzierten Fibrosarkomzellzahl führte, während Argatroban das Zellwachstum nicht beeinflusste.

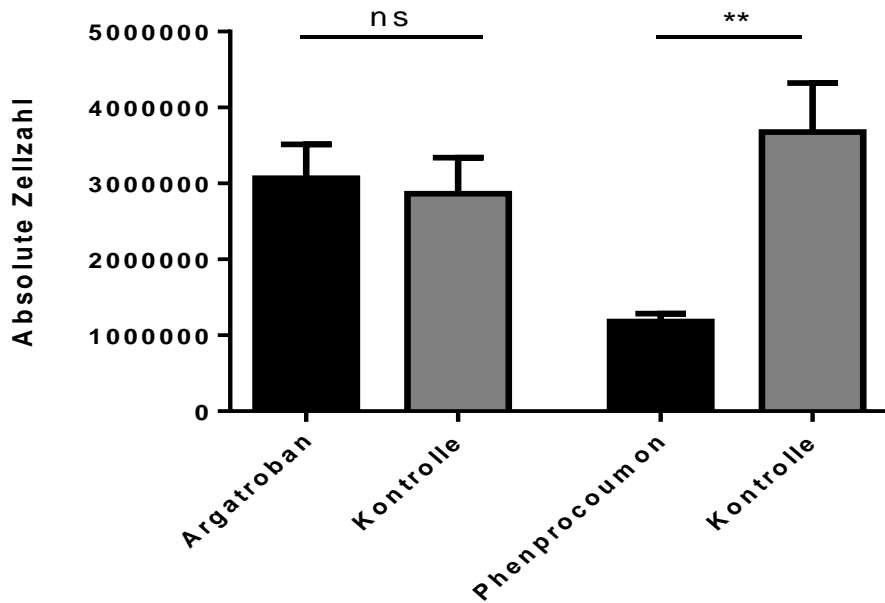


Abbildung 21: Pharmakologische indirekte FII-Inhibition führt zu einem verminderten Zellwachstum von Fibrosarkomen, direkte FIIa-Inhibition hat keinen Effekt
 Fibrosarkomzellen wurden entweder mit 1 µg/ml Argatroban oder 100 µg/ml Phenprocoumon behandelt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen ausgezählt. Ungepaarter zweiseitiger T-Test (**p<0,01; n=3 biologische Replikate).

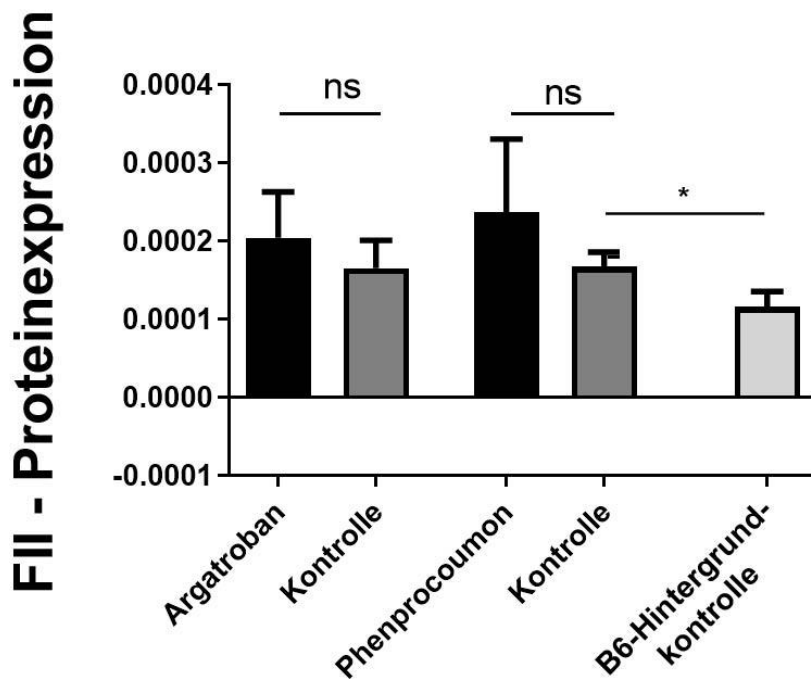


Abbildung 22: Pharmakologische direkte und indirekte FIIa-Inhibition führt zu keiner Veränderung der FII-Expression
 Fibrosarkomzellen wurden entweder mit 1 µg/ml Argatroban 100 µg/m oder Phenprocoumon in behandelt. Nach 3 Tagen wurden die FII-Expression indirekt im Firefly Luciferase Assay gemessen. B6-Fibrosarkome dienen als Hintergrundsignal-Kontrolle. Ungepaarter zweiseitiger T-Test (*p<0,05; n=3 biologische Replikate).

3.9 Epigenetische Regulation der FII-Expression

FII wird ubiquitär im embryonalen Organismus exprimiert, im adulten jedoch zum größten Teil in der Leber [116]. Eine derartige Veränderung der Expression ist häufig über epigenetische Prozesse zu erklären. Kürzlich wurde beobachtet, dass die Gene, welche für Gerinnungsfaktor VIII und vWF codieren, Ziel regulierender DNA-Methylierung sind [138, 139]. Durch den gemeinsamen Bezug zur Hämostase liegt somit nahe, dass auch an der Prothrombin-Genexpression DNA-Methylierung beteiligt sein könnte. Genauere Zusammenhänge sind jedoch bislang unbekannt.

In dieser Versuchsreihe sollten die gängigen Mechanismen der Epigenetik in Bezug auf die FII-Expression analysiert werden. Dabei wurden Substanzen, die die DNA-Methylierung, Histon-Acetylierung/-Methylierung sowie epigenetische Reader adressieren, gewählt. Die Screenings wurden mit Hepatozyten (welche physiologisch FII exprimieren), Fibrosarkomen (bei welchen durch die vorherigen Ergebnisse eine ektope FII-Expression angenommen wird) und Fibroblasten (Zellen, die keine FII-Expression aufweisen) durchgeführt. Es wurden kurzzeitige (10 Minuten bis 24 Stunden) und langzeitige (2 Tage bis 7 Tage) Inkubationen mit den Testsubstanzen durchgeführt. Negativkontrollen erfolgten mittels DMSO. Nach der Inkubation wurden die Zellen lysiert und Prothrombinexpression indirekt im FLUC-Assay gemessen. Bei der Inkubation mit Decitabine war ein zytotoxischer Effekt auf Fibrosarkome zu beobachten.

Eine kurzfristige Inkubation mit den epigenetischen Substanzen erbrachte bei keiner Zellart signifikante Ergebnisse. Herauszustellen sind die langzeitigen Inkubationen mit Decitabine. Es waren jedoch auch Effekte bei Inkubation mit Lomeguatrib und Zebularine zu beobachten. Die FII-Expression unter Einwirkung der letzten beiden Substanzen ist im Anhang dieser Promotionsarbeit graphisch dargestellt.

In diesem Kapitel soll sich zur besseren Übersicht auf die Wirkung von Decitabine als DNMT-Inhibitor beschränkt werden. Hierbei wurden alle drei eingesetzten Zellarten verglichen. Für eine Einzelansicht der jeweiligen Zellart ist ebenfalls auf den Anhang dieser Arbeit zu verweisen. Die FII-Expression unter Decitabine ist in Abbildung 23 dargestellt. Dabei handelt es sich um eine LOG2-Fold-Darstellung der FII-Proteinexpression über DMSO als Kontrollsubstanz. Zu sehen ist die Expression die jeweiligen Zellen 2-7 Tage nach Inkubationsbeginn.

Besonders auffällig ist dabei die FII-Expression der Fibrosarkome unter Decitabine. Diese ist fast durchgängig an allen Tagen signifikant ($p < 0,05$ und $p < 0,01$) erhöht gegenüber der der Hepatozyten. In der Einzelansicht im Anhang dieser Arbeit ist dargestellt, dass dieser Effekt der signifikant erhöhten FII-Expression in Hepatozyten ebenfalls vorhanden ist. Diese Tendenz fand sich selbst in den Fibroblasten, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant ($p = 0,0591$ und $p = 0,0557$).

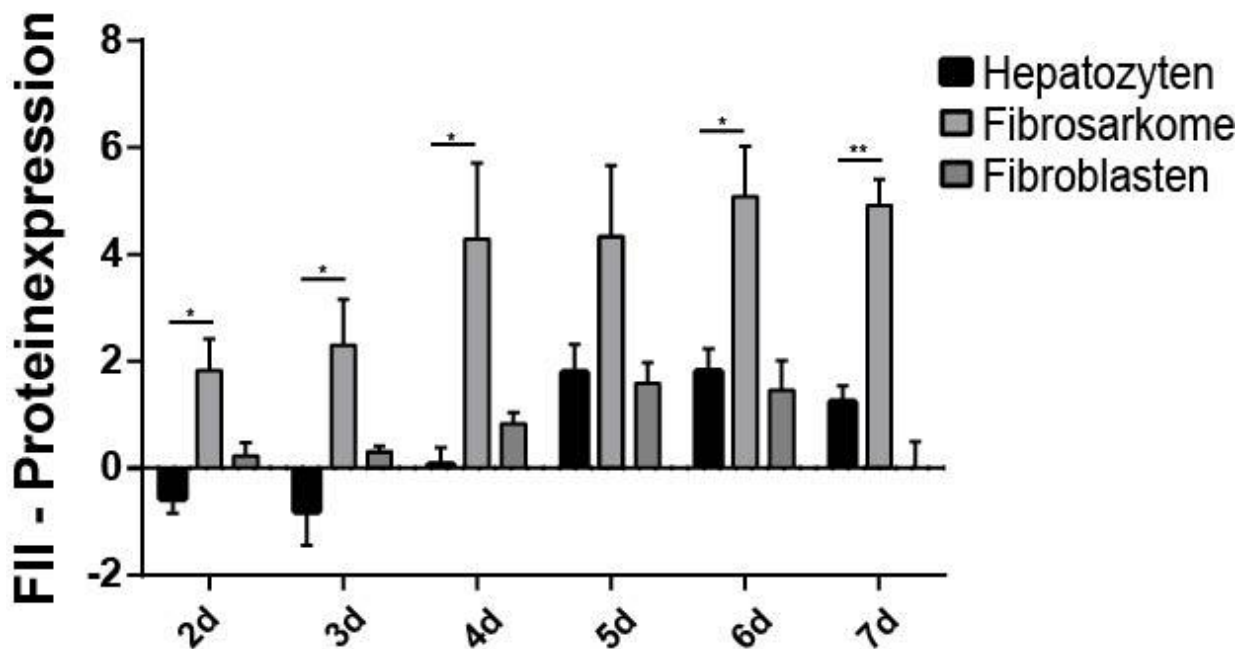


Abbildung 23: Eine Inhibition der DNA-Methyltransferase führt zu einer Hochregulation der FII-Expression in Hepatozyten und Fibrosarkomen

Hepatozyten, Fibrosarkome und Fibroblasten wurden mit $10 \mu\text{M}$ des DNMTi Decitabine behandelt. Über Messung der Firefly Luciferase Aktivität wurde indirekt die Proteinexpression von FII gemessen. LOG2-FOLD-Darstellung (über DMSO). Ungepaarter zweiseitiger T-Test ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $n = 3$ biologische Replikate)

Somit lässt sich schlussfolgern, dass eine Inhibition der DNA-Methyltransferase durch Decitabine und damit die DNA-Hypomethylierung sowie der leichtere Zugang des Transkriptionsapparates möglicherweise eine erhöhte FII-Expression in Hepatozyten und Fibrosarkomen bewirkt. Jedoch fand sich dieser Effekt nicht bei allen DNMT-Inhibitoren gleichermaßen, wie bspw. bei der Behandlung mit Zebularine, die zu einer signifikanten Herabregulation der FII-Expression führte.

4 Diskussion

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Forschungen haben auf der einen Seite gezeigt, dass eine FII-Proteinexpression explizit von den Fibrosarkomzellen selbst und nicht von umliegenden Blutgefäßen oder der weiteren Mikroumgebung des Tumorverbandes ausgeht. Auf der anderen Seite war eine F2-RNA-Expression in Fibrosarkomen in der qPCR nicht nachzuweisen.

Dieses Ergebnis steht im Einklang zu anderen Beobachtungen. In der AG Danckwardt wurden auch im Rahmen anderer Gewebeuntersuchungen Schwierigkeiten in der Detektion von F2 mittels qPCR festgestellt, obwohl laut Human Protein Atlas [140, 141] eine Expression vorhanden war. Dies resultierte schließlich in der Generierung der D-Insight-Maus, die eine Detektion von FII in Geweben erleichtern sollte. Ein technischer Grund der nicht nachweisbaren FII-Expression ist daher nicht auszuschließen. Gegebenenfalls ist eine weitere Validierung der Ergebnisse sinnvoll, z.B. mit Primerpaaren, die unterschiedliche F2-Genloci adressieren.

Neben technischen Ursachen könnten die Ergebnisse der qPCR auch biologisch begründbar sein. Das Dogma der Molekularbiologie, welches 1958 erstmals von Crick erwähnt wurde, beschreibt das Phänomen, dass Gene der DNA zur RNA transkribiert und anschließend zu Proteinen translatiert würden [142]. Verknüpft man diese Theorie mit den im Methodenteil genannten Analysemethoden, kann man mithilfe der qPCR-Methode die RNA eines Gens und mit dem Firefly-Luciferase-Assay das translatierte Protein nachweisen. Gerade bei komplexeren Organismen wie Eukaryoten lässt sich hieraus jedoch keine Korrelation ableiten, sodass zusätzliche, zwischengeschaltete Prozesse posttranskriptioneller Art die Menge des translatierten Proteins beeinflussen müssen [143]. So könnten Fibrosarkome im Gegensatz zu Hepatozyten eine andere Variante der posttranskriptionellen Modifikation aufweisen.

Mehr als 100 RNA-Modifikationen und daraus folgende biologische Konsequenzen wurden bereits beschrieben, die meisten sind nach wie vor noch nicht ausreichend entschlüsselt [144]. Im Hinblick auf die FII-Expression in Fibrosarkomen könnte man weiterführende Analysemethoden wie zum Beispiel die Sequenzierung der RNA oder die Massenspektrometrie zur Untersuchung des FII-Proteins aufgreifen.

Die „ektopen“ FII-Expression in den Fibrosarkomen scheint eine individuelle Komponente zu besitzen. So war festzustellen, dass es innerhalb unterschiedlicher Fibrosarkomklone eine unterschiedliche Ausprägung der Expression gibt. Weiter war zu beobachten, dass sich hieraus sogar eine Konsequenz auf das Verhalten der einzelnen Tumorklone ergibt. Die Resultate zeigten, dass höhere FII-Expressionen mit der Proliferation der Sarkomzellen korrelieren. Diese Ergebnisse stehen im Einklang zu *in-vivo*-Experimenten, in denen die FII-Expression mit zunehmender TumorgroÙe MCA-induzierter Fibrosarkome in Mäusen ebenfalls zunimmt [116].

Es ist bekannt, dass in Hepatozyten die Transkriptionsfaktoren HNF4-Alpha, HNF1-Alpha und HNF3-Beta (FOXA2) an die Prothrombin Enhancer-Region binden und dessen Expression stimulieren [83, 132]. Es war daher eine Beteiligung dieser Transkriptionsfaktoren an der ektopen FII-Expression in Fibrosarkomen zu vermuten. In der qPCR war eine Expression jedoch nicht nachweisbar. Wie bei der F2-qPCR, ist es auch hier möglich, dass die qPCR nicht das geeignete technische Instrument zu Untersuchung der Transkriptionsfaktoren darstellt und deswegen keine Expression detektiert wurde.

In der Literatur wurden die Transkriptionsfaktoren bereits bei anderen Malignomen untersucht. So wurden beispielsweise in Pankreaskarzinomzellen erniedrigte Konzentrationen von HNF1-Alpha gemessen und HNF1-Alpha eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben [145]. In humanen Lungenkarzinomzellen führte ein FOXA2-Knockdown sogar zu einer verstärkten Tumorinvasivität [146]. Denkbar wäre daher, dass auch in Fibrosarkomzellen eine verminderte Transkriptionsfaktorexpression im Sinne einer fehlenden Tumorsuppression vorherrscht und daraus eine verminderte FII-Expression resultiert. Eine Untersuchung mit anderen Detektionsmethoden, z.B. Generierung einer HNF1-Alpha/FOXA2-Reportermaus und Detektion mittels FLUC-Assay, wäre eine Möglichkeit, technische Ursachen auszuschließen.

Ein Effekt des Thrombins auf Tumorwachstum bzw. Invasivität wurde in unterschiedlichen Entitäten beobachtet, so zum Beispiel in Karzinomen von Brust [147], Lunge [148], Magen [149], Kolon [150], Prostata [151] und Gliomen des Gehirns [152]. In Osteosarkomen induzierte Thrombin das Tumorwachstum [153], in Rhabdomyosarkomen das metastatische Potenzial [154] und in Chondrosarkomen die Tumormigration [155]. Obwohl Sarkome untereinander ähnliche Eigenschaften

aufweisen, ist die Bedeutung von Thrombin in der Tumorbologie der Fibrosarkome weitgehend ungeklärt. Es wurde daher der Effekt einer FII-Depletion auf die Tumorprogression und das Wachstum der Fibrosarkome analysiert. In Versuchen mit humanen Zelllinien hatten hohe Doxycyclin-Konzentrationen (10 µg/ml) zytotoxische Effekte [156]. Auch im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde diese Konzentration eingesetzt. Um diesen Störfaktor auszuschließen, wurden daher Kontrollgruppen (Wildtypfibrosarkome) eingesetzt, hier zeigten sich zwischen Doxycyclin und der Kontrollsubstanz DMSO keine Unterschiede im Zellwachstum. Im CFU-Assay konnte gezeigt werden, dass eine FII-Depletion zur gleichen Kolonieanzahl wie bei der Kontrollgruppe führte, der durchschnittliche Koloniedurchmesser jedoch um einiges kleiner ausfiel. Im Matrigel-Invasion-Assay konnte gezeigt werden, dass FII einen aktiven Einfluss auf das invasive Wachstumsmuster des Tumors ausübt. Gesunde Zellen besitzen die Eigenschaft der Zellkontakthemmung, d.h. ab einer bestimmten Zelldichte veranlassen Zellzellkontakte dieser Zellen einen Wachstumsstopp [157]. Genauer gesagt unterscheidet man zwischen *contact inhibition of proliferation* (CIP) und *contact inhibition of locomotion* (CIL). In Tumorzellen hingegen ist ein Verlust von CIP und CIL zu beobachten, dies führt zum charakteristischen ungeordneten und invasiven Wachstumsmuster maligner Zellen [158]. Die zugrundeliegenden Mechanismen des CIP/CIL-Verlusts in Tumorzellen sind bisher weitgehend unerforscht. Es wurde beobachtet, dass die p38-MAP-Kinase, welche eine zentrale Rolle in der F2-Genregulation spielt, im physiologischen Zellverbund eine Zellkontakthemmung fördert. Eine Depletion von p38 sorgt hingegen für ein dichteres Zellwachstum, die Anzahl der neugebildeten Foci bleibt dabei unverändert [159]. Im CFU-Assay zeigte sich bei FII-Depletion ebenfalls kein Einfluss auf die Anzahl der Tumorfoci, jedoch auf die Koloniegröße, da die gebildeten Kolonien um einiges kleiner waren als die der Kontrollgruppe. Da beschrieben wurde, dass p38 unter Einfluss gewisser Stimuli die Expression von Prothrombin fördert [85], sind diese Beobachtungen zunächst überraschend.

Denkbar ist eine abweichende Rolle von p38 in Fibrosarkomzellen. Hinweise darauf ergeben sich aus Untersuchungen, in denen eine Inhibition von p38 in Kopf-Hals-Karzinomen ein verlangsamtes Tumorwachstum bewirkte [160]. Zur weiteren Abklärung könnte ein Colony-Forming-Unit-Assay mit weiteren Kontrollgruppen (z.B. Depletion von FII vs. p38 vs. FII+p38) durchgeführt werden und Aufschluss darüber

geben, welche Signalwege für Zellkontakthemmung in Fibrosarkomzellen entscheidend sind. Zusätzlich könnte in den Fibrosarkomklonen, deren Proliferation mit der FII-Expression korreliert, der p38-Genexpressionsstatus weiter untersucht werden.

Die Bedeutung von Thrombin und anderen Gerinnungsfaktoren bei Tumorerkrankungen wurden schon in klinischen Fragestellungen betrachtet. So verglichen Kakkar et al. 2004 in einer doppel-verblindeten Studie 385 an Krebs erkrankte Patient:innen. Diese wurden mit niedermolekularen Heparinen (NMH, hemmen FXa und mit geringerer Affinität FII) oder alternativ mit Placebo behandelt. Ein Effekt auf das Krebsleiden konnte nicht festgestellt werden, jedoch zeigten die mit NMH behandelten Patient:innen nach 17 Monaten eine deutlich verbesserte Überlebensrate im Vergleich zur Placebogruppe [161]. Auf der anderen Seite ist bekannt, dass ein limitierender Faktor bei der Therapie mit Zytostatika das Auftreten thromboembolischer Ereignisse ist. Thrombozyten, die mit Doxorubicin behandelt wurden, zeigten höhere Konzentrationen an Phosphatidylserin und intrazellulärem Calcium und synthetisierten mehr Thrombin als die Negativkontrollen [162]. Die Standard-Erstlinientherapie bei metastasiertem Fibrosarkom wird bisher mit Doxorubicin durchgeführt [115]. Es sollte daher überprüft werden, ob eine pharmakologische Inhibition von FII eine Auswirkung auf das Wachstum der Fibrosarkome hat. Diese Untersuchung wurde mit Argatroban und Phenprocoumon durchgeführt. Argatroban ist ein direkter Thrombin-Inhibitor, während Phenprocoumon die vitamin-k-abhängige Gammacarboxylierung von FII, FVII, FIX und FX hemmt und diese daher indirekt inhibiert.

Asanuma et al. zeigten 2013, dass eine Inhibition von Thrombin durch Argatroban *in vivo* zu weniger Metastasen in einem Brustkrebsmodell führten [135]. Schulze et al. verwendeten in einem *in-vitro*-Experiment mit MDA-MB-468 humanen Brustkrebszellen eine Argatroban-Konzentration von 25 µg/ml und beobachteten ein verringertes Zellwachstum [137]. Bei dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch der Inhibition zeigte sich, dass Phenprocoumon ein verlangsamtes Fibrosarkomwachstum bewirkt, 1µg/ml bzw. 1,96 µM Argatroban jedoch keine Auswirkung auf das Fibrosarkomwachstum hatte. Die Diskrepanz der Ergebnisse unter Argatrobaneinfluss könnte mehrere Ursachen haben. Zunächst seien hier die unterschiedlichen Versuchsaufbauten zu nennen. Asanuma et al. nutzten zwar *in vitro* geringe Argatrobanstoffmengenkonzentrationen von 0,1-1 µM und sahen dadurch ein

geringeres Zellwachstum, jedoch gaben sie zusätzlich rekombinantes Thrombin in den Versuchsansatz hinzu. Die Ergebnisse bezüglich der geringeren Metastasierung wurden von *in-vivo*-Versuchen abgeleitet und sind daher nicht mit dem hier gewählten *in-vitro*-Ansatz vergleichbar. Schulze et al. sahen ein geringeres Zellwachstum bei einer Argatroban-Konzentration von 25 µg/ml, daher lässt sich, unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse, keine abschließende Aussage zu einem Argatroban-Effekt auf Fibrosarkome treffen. Es gilt daher, den Versuch mit einer entsprechend höheren Konzentration zu wiederholen. Schulze et al. erklären ihre Ergebnisse mit einer Osteopontin-Interaktion von Thrombin. Osteopontin wurde auch in humanen Fibrosarkomlinien nachgewiesen [163], also ist denkbar, dass diese Beobachtungen sich auf murine Fibrosarkome übertragen lassen. Weitere Erkenntnisse in Bezug auf FIIa-Inhibition und Tumorwachstum könnte ein zusätzlicher Einsatz des direkten Thrombininhibitors Dabigatran liefern.

Signifikant war hingegen der Effekt des verringerten Wachstums der Zellen bei der Inkubation mit Phenprocoumon. Es ergibt sich die Frage, ob dieses verringerte Wachstum durch den Mangel an Thrombin verursacht wird oder ob die anderen inhibierten Faktoren VII, IX oder X die Reduktion verursachen. Kürzlich wurde gezeigt, dass in hepatozellulären Karzinomen FVII eine stimulierende Rolle in Bezug auf Migration und Invasion hat [164]. Dagegen zeigten andere Versuche, bei denen Pankreaskarzinomzellen mit NMH und Apixaban (ein FXa-Antagonist) behandelt wurden zum einen eine verringerte Zellviabilität und zum anderen eine verringerte Thrombingeneration im Tumorumfeld [165]. In einer weiteren Studie zeigte eine Hochdosis-*in-vitro*-Behandlung mit Apixaban eine reduzierte Proliferation in fünf unterschiedlichen Krebszelllinien [166]. Die pharmakologische Behandlung der Fibrosarkome sollte daher um isolierte Xa-, VIIa- und IXa-Inhibitoren erweitert werden. Sowohl die Inkubation mit Argatroban als auch die mit Phenprocoumon hatten keinen Effekt auf die FII-Expression der Fibrosarkomzellen. Hier gab es keinen Unterschied zur jeweiligen Kontrollgruppe. Vorausgesetzt, dass das verlangsamte Zellwachstum bei Phenprocoumon bedingt durch die FII-Inhibition ist, gibt es hierfür folgende Erklärung, die in Abbildung 23 grafisch dargestellt ist. Durch den Mangel an FIIa nach Phenprocoumon-Exposition fehlt den Tumorzellen der Stimulus zur Proliferation. Da Phenprocoumon jedoch keinen Einfluss auf die Transkriptionsvorgänge im Zellkern hat, ist die F2-Genexpression der Tumorzelle gleichbleibend.

Denkbar ist daher eine ähnliche Wirkung von Argatroban und Dabigatran, hier sollten weitere Untersuchungen durchgeführt bzw. mit höheren Konzentrationen wiederholt werden.

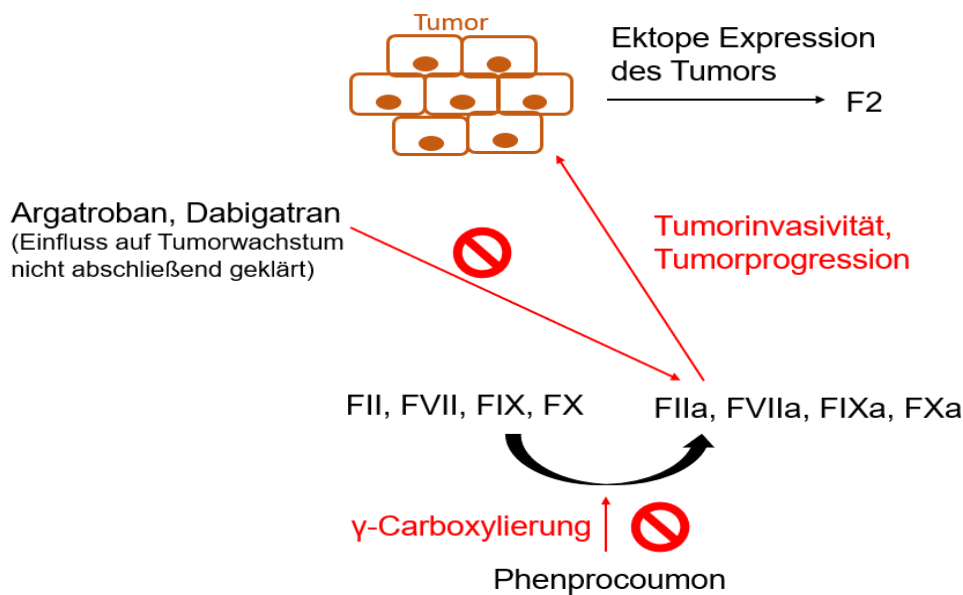


Abbildung 24: Potenzieller Mechanismus der antiproliferativen Wirkung von Antikoagulanzen auf Fibrosarkomzellen

Über Inhibition der γ -Carboxylierung kommt es zu einer ausbleibenden Aktivierung der Gerinnungsfaktoren FII, FVII, FIX und FX. Dem Tumor wird insbesondere durch FIIa-Entzug der Stimulus zur weiteren Progression und Invasivität genommen. Da Phenprocoumon jedoch keine Prozesse im Zellinneren reguliert, ist die ektopische F2-Genexpression der Fibrosarkomzelle unbeeinflusst. Denkbar ist eine ähnliche Wirkung auf die Fibrosarkome bei Behandlung mit Argatroban, Dabigatran. Hier sollten weitere Untersuchungen angestellt werden.

Insgesamt bergen diese Resultate Chancen im Hinblick auf eine therapeutische Implementierung antikoagulatorischer Substanzen in der Krebstherapie. 2016 startete die erste klinische Studie mit NOAKs als potenziell krebshemmende Wirkstoffe bei Brustkrebspatientinnen in den Stadien I-III. Hierbei soll mittels Rivaroxaban (Faktor Xa-Hemmer) der TF-FVIIa-FXa-Komplex inhibiert werden, dadurch die Aktivierung von PAR2, and die Umwandlung von FII zu FIIa. Bislang ist die Auswertung der Studie noch nicht abgeschlossen [167].

Da in Mausembryonen eine ubiquitäre FII-Expression beschrieben wurde und in adulten Mäusen die FII-Expression vorwiegend in der Leber stattfindet [116], galt es zu untersuchen, ob epigenetische Mechanismen an der Genexpression beteiligt sein könnten. Besonders relevant war diese Fragestellung auch in Bezug auf die Expression in Fibrosarkomen, da bei vielen Malignomen eine epigenetische Fehlregulation als mögliche Entstehungsursache diskutiert wird.

Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil an methylierten CpG-Inseln in gesundem Gewebe, die absolute Konzentration an 5-Methylcytosin nimmt jedoch ab [168, 169]. Eine Änderung im Methylierungsstatus ist auch in malignen Tumoren nachgewiesen worden, man spricht im Allgemeinen von fokalen Hypermethylierungen und globalen Hypomethylierungen des Tumorgewebes [170]. Im klinischen Alltag macht man sich diesen Zustand zunutze, indem man diese epigenetischen Veränderungen als Biomarker für diverse Tumorentitäten nutzt [171]. Therapeutisch nutzt man DNMT-Inhibitoren wie z.B. Decitabine, die Hypermethylierungs-induziertes Gen-Silencing z.B. in Tumorsuppressorgenen aufheben und so ein wichtiges Fundament in der Behandlung maligner Tumore bilden [172].

Bei der epigenetischen Substanzinkubation war festzustellen, dass die Inhibition der DNMT mittels Decitabine zu einer Hochregulation der FII-Expression führte. Obwohl auch in Hepatozyten vorhanden, ist dieser Effekt vor allem in Fibrosarkomen herauszustellen, da Decitabine unabhängig von seiner DNMT-inhibierenden Wirkung einen zytostatischen Effekt besitzt [173]. Somit liegt nahe, dass DNA-Methylierung ein Mechanismus der epigenetischen Regulation des Prothrombins sein könnte. Allerdings konnte diese Beobachtung nicht durch die anderen DNMT-Inhibitoren Azacitidine, RG108 und Zebularine bestätigt werden. Während die ersteren beiden keinerlei signifikanten Effekt auf die FII-Expression aufwiesen, führte Zebularine sogar zu einer verminderten Expression. In einer Studie von 2009 verglichen Flotho et al. Decitabine (50 nM), Azacitidine (500 nM) und Zebularine (10 µM), indem sie Kasumi-1-AML-Blasten damit behandelten. Diese *in-vitro*-Konzentrationen wurden entsprechend den therapeutischen *in-vivo*-Konzentrationen bei Akuter Myeloischer Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom gewählt. Obwohl die allgemeine Annahme ist, dass diese Substanzen ähnliche Effekte aufweisen und untereinander austauschbar sind, beobachteten Flotho et al. ebenfalls differentielle Effekte auf die Hypomethylierung [174]. Sie untersuchten unterschiedliche Gene und fanden dabei, dass Decitabine die meiste Hypomethylierung verursachte. Azacitidine hatte eine etwas schwächere Wirkung und Zebularine hatte keinen nennenswerten Effekt [174]. Diese Ergebnisse decken sich mit den im Rahmen dieser Arbeit angestellten Beobachtungen in Fibrosarkomen, obgleich die Konzentration der angewandten Substanzen sich unterscheidet. Ebenfalls ist zu erwähnen, dass Decitabine die Expression von DNMT1 und DNMT3a verringert, Azacitidine hingegen vor allem

DNMT1 [175]. Daraus abgeleitet scheint eine *De-Novo*-Methylierung (Hauptmechanismus der DNMT3a) in Fibrosarkomen von größerer Bedeutung zu sein als die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus während der Replikation (Hauptmechanismus der DNMT1). Weitere Untersuchungen, u.a. die Quantifizierung der Expression der unterschiedlichen DNMTs in den Fibrosarkomen im Vergleich zu Hepatozyten oder Fibroblasten könnten hier mehr Aufschluss geben. Zudem ist nicht sicher zu sagen, ob die DNMT-Inhibition direkt FII anzielt oder ob möglicherweise andere vorgeschaltete Schritte reguliert werden, denkbar wäre u.a. eine Hochregulation von p38. Um diese Frage weiter zu klären, könnte eine Bisulfit-Sequenzierung der (un-)behandelten Fibrosarkome bzw. Hepatozyten durchgeführt werden. Bei dieser Methode können entweder einzelne DNA-Abschnitte aber auch das ganze Genom analysiert und methylierte Basen ermittelt werden [176]. Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung gibt es möglicherweise Risiken. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Decitabine bestätigten zwar eine Reduktion des Fibrosarkomwachstums, zeigten jedoch eine erhöhte FII-Expression dieser Zellen. Daraus lässt sich ableiten, dass gerade in der Anfangsphase einer potenziellen zytostatischen Therapie mit Decitabine, wenn viele „targets“ im Sinne von Tumorzellen im Körper vorhanden sind, eine engmaschige Kontrolle der Gerinnungsparameter erfolgen sollte, um den Zustand einer Hyperkoagulabilität zu vermeiden. Weiter ist zu erwähnen, dass auch in Fibroblasten die Inhibition die Tendenz zu einer Hochregulation der FII-Expression vorhanden war, diese jedoch nicht signifikant ausfiel, der p-Wert war mit ($p=0,0591$ und $p=0,0557$) grenzwertig. Die Untersuchung wurde mit 4 biologischen Replikaten durchgeführt. Durch eine möglicherweise zu geringe Stichprobe könnte daher ein in Wirklichkeit bestehender Effekt nicht nachgewiesen werden. Zur weiteren Klärung sollte die Untersuchung mit einer größeren Stichprobe wiederholt werden.

Neben der DNA-Methylierung ist auch die Modifikation von Histonen ein wichtiger Mechanismus der Epigenetik. Liegen Histone acetyliert vor, sind sie weniger dicht gepackt und ihr zugehöriger DNA-Strang erlaubt mehr Zugriff und daher mehr Transkription. Folglich ist bei einer Inhibition von Histon-Deacetylasen ebenfalls mehr Transkription eines Zielgens zu erwarten. Die Untersuchung von Histonmodifikation und ihr Einfluss auf die FII-Expression in Hepatozyten und Fibrosarkomen lieferte keine signifikanten Ergebnisse. In der Literatur finden sich keine direkt übertragbaren

Experimente, jedoch zeigten Zhao et al. 2014 in einem *in-vivo*-Sepsismodell, dass SAHA-behandelte (ein Histon-Deacetylasen-Inhibitor) Mäuse stärkere Gerinnungs- und Plättchenfunktion und somit bessere Überlebensraten hatten [177].

Eine Wiederholung der zellbasierten Experimente mit ggf. Dosis- oder Expositionszeitanpassung ist daher sinnvoll, denkbar wäre auch eine *in-vivo*-Versuchsreihe, in der Mäusen mit MCA-induzierten Fibrosarkomen HDACi injiziert bzw. verfüttert und der Einfluss auf die Tumorprogression beobachtet wird. Kürzlich wurde beschrieben, dass Histone neben ihrer intrazellulären Funktion im Nukleosom zusätzlich extrazellulär agieren können und über verschiedene Signalwege zu erhöhter Inflammation und Koagulation führen können [178]. Interessant wäre es, im Zustand einer systemischen Tumorerkrankung (mit und ohne FII-Depletion) den Status an extrazellulären Histonen zu erfassen und daraus Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Histonen, Thrombin und Malignom zu ziehen.

4.1 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals, dass eine FII-Expression in Fibrosarkomen stattfindet und diese einen stimulierenden Einfluss auf den Tumorprogress dieser Krebsentität haben könnte. Da es sich bei den vorliegenden Experimenten um murine *in-vitro*-Untersuchungen handelt, bedarf es ergänzender Studien, die murine *in-vivo*- und humane *in-vitro*-Fibrosarkom-Experimente beinhalten. Sollten sich diese Beobachtungen in weiterführenden Studien bestätigen, so könnte der Zusammenhang zwischen FII-Expression und Tumorprogress Ausgangspunkt zielgerichteter onkologischer Therapien sein. Es könnten beispielsweise die gängigen Chemotherapieschemata regelhaft um ein Antikoagulans ergänzt werden, um die klinische Überlebensrate zu verbessern. Möglicherweise bewirkt eine DNMT-Inhibition eine erhöhte FII-Expression nicht nur in Fibrosarkomen, sondern auch in anderen Tumorentitäten. Bei Patienten, die mit solchen DNMTi zytostatisch therapiert werden, könnte es daher sinnvoll sein, ein engmaschigeres Monitoring der Gerinnung durchzuführen. Zusätzlich könnte auch diese Patientengruppe möglicherweise von Antikoagulanzen profitieren, indem somit thromboembolische Komplikationen vermieden werden.

5 Zusammenfassung

Obwohl seit dem letzten Jahrhundert ein Zusammenhang zwischen Krebs und Thromboseneigung bekannt ist, sind zugrundeliegende Mechanismen nur wenig erforscht. Ein wichtiges Element scheint der Gerinnungsfaktor Thrombin und seine Vorstufe Prothrombin zu sein. Neben seiner zentralen Rolle in der Gerinnungskaskade ist Thrombin vermehrt in pathologischen Zuständen wie Sepsis, Inflammation oder Tumoren nachgewiesen worden [131]. In Bezug auf Thrombin in der Tumorbiologie gibt es Hinweise darauf, dass Thrombin das Tumorwachstum stimuliert, aber auch, dass einige Krebsentitäten selbst Thrombin exprimieren bzw. sezernieren.

In dieser Arbeit konnte die extrahepatische FII-Expression in Fibrosarkomen nachgewiesen werden. Es wurden Faktoren analysiert, die eine mögliche Rolle in der Expression des extrahepatischen FII spielen könnten. In diesem Rahmen wurde die Prothrombinexpression von einer exemplarisch gewählten Tumorentität, dem Fibrosarkom, untersucht und mit der physiologischen Expression in Hepatozyten verglichen. Es wurden Methoden gewählt, die unterschiedliche Herangehensweisen der Analyse von Expression und Regulation erlaubten. Hierfür wurden Wildtyp-Mäuse sowie eine neu etablierte Mauslinie mit einem Knock-in-Allel im F2-Gen, welches u.a. 2 Lumineszenzreporter enthält, untersucht. In qPCR-Analysen und Firefly-Luciferase-Assays wurde die Expression des Gens untersucht. Behandlungen mit DNA-Methylierungs- oder Histonmodulatoren dienten zum Nachweis vorgeschalteter epigenetischer Modifikationen. In einem Matrigel-Invasion-Assay wurde der Einfluss einer FII-Depletion bei F2-Knockdown-Fibrosarkomen auf die Invasivität der Sarkomzellen beobachtet. Eine Behandlung mit Argatroban und Phenprocoumon galt der Frage einer möglichen therapeutischen Anwendung der FII-Inhibition bei Fibrosarkomen.

Es wurde gezeigt, dass eine ektope FII-Expression in Fibrosarkomen vorhanden ist und diese mit der Zellproliferation positiv korreliert. Weitere Untersuchungen im FII-Knockdown-Modell ergaben, dass eine Depletion des F2-Gens zu einem verlangsamten Tumorwachstum führt, auch die Tumorinvasivität fiel geringer aus. Außerdem konnte demonstriert werden, dass epigenetische Mechanismen an der FII-Expression beteiligt sind. Insbesondere die Inhibition der DNA-Methyltransferase bewirkte eine Hochregulation der FII-Expression, besonders in Fibrosarkomen aber

auch bei Hepatozyten. Schließlich wurde mittels pharmakologischer Inhibition nachgewiesen, dass eine indirekte FII-Inhibition mit Phenprocoumon ein vermindertes Zellwachstum bei gleichbleibender FII-Expression zur Folge hat.

Die Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass FII aktiv den Tumorprogress von Fibrosarkomen beeinflusst. Weiterführende Untersuchungen mit anderen Krebsentitäten sowie eine Durchführung von *in-vivo*-Experimenten könnten einen nächsten Schritt der Forschung darstellen. Bei ähnlichen Ergebnissen wäre dies ein erster Hinweis auf eine mögliche therapeutische Anwendung bei Malignomen.

6 Literaturverzeichnis

1. Gale, A.J., *Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis*. Toxicologic Pathology, 2011. **39**(1): p. 273-280.
2. Nesheim, M., *Thrombin and Fibrinolysis*. Chest, 2003. **124**(3, Supplement): p. 33S-39S.
3. *Praktische Labordiagnostik : Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie*, in *De Gruyter Studium*, H. Renz, Editor. 2018: Berlin/Boston.
4. Bizzozero, J., *Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung*. Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin, 1882. **90**(2): p. 261-332.
5. Chiang, T.M., A. Rinaldy, and A.H. Kang, *Cloning, characterization, and functional studies of a nonintegrin platelet receptor for type I collagen*. The Journal of clinical investigation, 1997. **100**(3): p. 514-521.
6. Chiang, T.M., F. Cole, and V. Woo-Rasberry, *Cloning, Characterization, and Functional Studies of a 47-kDa Platelet Receptor for Type III Collagen*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(38): p. 34896-34901.
7. Ju, L., et al., *Von Willebrand factor-A1 domain binds platelet glycoprotein Iba in multiple states with distinctive force-dependent dissociation kinetics*. Thrombosis Research, 2015. **136**(3): p. 606-612.
8. Varga-Szabo, D., I. Pleines, and B. Nieswandt, *Cell Adhesion Mechanisms in Platelets*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2008. **28**(3): p. 403-412.
9. Nieswandt, B. and S.P. Watson, *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood, 2003. **102**(2): p. 449.
10. Nieswandt, B., et al., *Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen*. The EMBO Journal, 2001. **20**(9): p. 2120-2130.
11. Clemetson, J.M., et al., *The Platelet Collagen Receptor Glycoprotein VI Is a Member of the Immunoglobulin Superfamily Closely Related to Fc α R and the Natural Killer Receptors*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(41): p. 29019-29024.
12. Offermanns, S., *Activation of Platelet Function Through G Protein-Coupled Receptors*. Circulation Research, 2006. **99**(12): p. 1293-1304.
13. Heemskerk, J.W.M., E.M. Bevers, and T. Lindhout, *Platelet Activation and Blood Coagulation*. Thromb Haemost, 2002. **88**(08): p. 186-193.
14. Ruggeri, Z.M., *Platelet interactions with vessel wall components during thrombogenesis*. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 2006. **36**(2): p. 145-147.
15. Ruggeri, Z.M. and G.L. Mendolicchio, *Adhesion Mechanisms in Platelet Function*. Circulation Research, 2007. **100**(12): p. 1673-1685.
16. Moroi, M. and S.M. Jung, *Platelet glycoprotein VI: its structure and function*. Thrombosis Research, 2004. **114**(4): p. 221-233.
17. Kahn, M.L., et al., *Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin*. The Journal of clinical investigation, 1999. **103**(6): p. 879-887.
18. Riddel, J.P., et al., *Theories of Blood Coagulation*. Journal of Pediatric Oncology Nursing, 2007. **24**(3): p. 123-131.
19. Davie, E.W. and O.D. Ratnoff, *Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting*. Science, 1964. **145**(3638): p. 1310.
20. Macfarlane, R.G., *An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier*. Nature, 1964. **202**(4931): p. 498-499.
21. Harmening, D., *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis*. 2009, Philadelphia, PA: F.A. Davis Co.
22. Spronk, H.M.H., J.W.P. Govers-Riemslog, and H. ten Cate, *The blood coagulation system as a molecular machine*. BioEssays, 2003. **25**(12): p. 1220-1228.
23. Nemerson, Y. and R. Bach, *Tissue factor revisited*. Prog Hemost Thromb, 1982. **6**: p. 237-61.

24. Drake, T.A., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis*. Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 1087-97.
25. Nemerson, Y., *The Reaction between Bovine Brain Tissue Factor and Factors VII and X**. Biochemistry, 1966. **5**(2): p. 601-608.
26. Osterud, B. and S.I. Rapaport, *Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(12): p. 5260-5264.
27. Margolis, J., *The interrelationship of coagulation of plasma and release of peptides*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1963. **104**(1): p. 133-145.
28. Kaplan, A.P., et al., *The Intrinsic Coagulation/Kinin-Forming Cascade: Assembly in Plasma and Cell Surfaces in Inflammation*, in *Advances in Immunology*, F.J. Dixon, Editor. 1997, Academic Press. p. 225-272.
29. Naito, K. and K. Fujikawa, *Activation of human blood coagulation factor XI independent of factor XII. Factor XI is activated by thrombin and factor XIa in the presence of negatively charged surfaces*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(12): p. 7353-7358.
30. Gailani, D. and G.J. Broze, *Factor XI activation in a revised model of blood coagulation*. Science, 1991. **253**(5022): p. 909.
31. Osterud, B., B.N. Bouma, and J.H. Griffin, *Human blood coagulation factor IX. Purification, properties, and mechanism of activation by activated factor XI*. Journal of Biological Chemistry, 1978. **253**(17): p. 5946-51.
32. Nemerson, Y. and R. Gentry, *An ordered addition, essential activation model of the tissue factor pathway of coagulation: evidence for a conformational cage*. Biochemistry, 1986. **25**(14): p. 4020-33.
33. Barton, P.G., C.M. Jackson, and D.J. Hanahan, *Relationship between Factor V and Activated Factor X in the Generation of Prothrombinase*. Nature, 1967. **214**(5091): p. 923-924.
34. Hemker, H.C., et al., *Formation of Prothrombin Converting Activity*. Nature, 1967. **215**(5098): p. 248-251.
35. Ferry, J.D., S. Shulman, and J.F. Foster, *The conversion of fibrinogen to fibrin. IX. Further flow birefringence studies on inhibited clotting systems*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1952. **39**(2): p. 387-394.
36. Doolittle, R.F., R. Chen, and F. Lau, *Hybrid fibrin: proof of the intermolecular nature of γ - γ crosslinking units*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1971. **44**(1): p. 94-100.
37. Hoffman, M., *Remodeling the Blood Coagulation Cascade*. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 2003. **16**(1): p. 17-20.
38. Nemerson, Y. and M.P. Esnouf, *Activation of a proteolytic system by a membrane lipoprotein: mechanism of action of tissue factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1973. **70**(2): p. 310-314.
39. Nemerson, Y., *The tissue factor pathway of blood coagulation*. Semin Hematol, 1992. **29**(3): p. 170-6.
40. Hoffman, M. and D.M. Monroe, *Coagulation 2006: a modern view of hemostasis*. Hematol Oncol Clin North Am, 2007. **21**(1): p. 1-11.
41. Adams, R.L.C. and R.J. Bird, *Review article: Coagulation cascade and therapeutics update: Relevance to nephrology. Part 1: Overview of coagulation, thrombophilias and history of anticoagulants*. Nephrology, 2009. **14**(5): p. 462-470.
42. Virchow, R., *Gesammelte abhandlungen zur wissenschaftlichen medicin*. 1862: Grote.
43. Bagot, C.N. and R. Arya, *Virchow and his triad: a question of attribution*. British Journal of Haematology, 2008. **143**(2): p. 180-190.
44. López, J.A., C. Kearon, and A.Y.Y. Lee, *Deep Venous Thrombosis*. Hematology, 2004. **2004**(1): p. 439-456.

45. Sidney, S., et al., *Venous thromboembolic disease in users of low-estrogen combined estrogen-progestin oral contraceptives*. *Contraception*, 2004. **70**(1): p. 3-10.
46. Lim, W., J.W. Eikelboom, and J.S. Ginsberg, *Inherited thrombophilia and pregnancy associated venous thromboembolism*. *BMJ (Clinical research ed.)*, 2007. **334**(7607): p. 1318-1321.
47. Heit, J.A., et al., *Risk Factors for Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: A Population-Based Case-Control Study*. *Archives of Internal Medicine*, 2000. **160**(6): p. 809-815.
48. Burrowes, C.E., F.M. Habal, and H.Z. Movat, *The inhibition of human plasma Kallikrein by antithrombin III*. *Thrombosis Research*, 1975. **7**(1): p. 175-183.
49. Damus, P.S., M. Hicks, and R.D. Rosenberg, *Anticoagulant action of heparin*. *Nature*, 1973. **246**(5432): p. 355-7.
50. Mammen, E.F., *Antithrombin: Its Physiological Importance and Role in DIC*. *Semin Thromb Hemost*, 1998. **24**(01): p. 19-25.
51. Offermanns, S., *Pharmaka, die in die Hämostase eingreifen*, in *Pharmakologie & Toxikologie: Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie*, M. Freissmuth, S. Offermanns, and S. Böhm, Editors. 2012, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 409-435.
52. Scaglione, F., *New Oral Anticoagulants: Comparative Pharmacology with Vitamin K Antagonists*. *Clinical Pharmacokinetics*, 2013. **52**(2): p. 69-82.
53. Mann, K.G., et al., *Prothrombin*. *Methods Enzymol*, 1981. **80 Pt C**: p. 286-302.
54. Degen, S.J.F. and E.W. Davie, *Nucleotide sequence of the gene for human prothrombin*. *Biochemistry*, 1987. **26**(19): p. 6165-6177.
55. Royle, N.J., et al., *Human genes encoding prothrombin and ceruloplasmin map to 11p11-q12 and 3q21-24, respectively*. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 1987. **13**(3): p. 285-292.
56. Degen, S.J.F., R.T.A. MacGillivray, and E.W. Davie, *Characterization of the complementary deoxyribonucleic acid and gene coding for human prothrombin*. *Biochemistry*, 1983. **22**(9): p. 2087-2097.
57. Di Scipio, R.G., et al., *A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S*. *Biochemistry*, 1977. **16**(4): p. 698-706.
58. Huang, M., et al., *Structural basis of membrane binding by Gla domains of vitamin K-dependent proteins*. *Nat Struct Biol*, 2003. **10**(9): p. 751-6.
59. Wu, W. and J.W. Suttie, *N-Glycosylation Contributes to the Intracellular Stability of Prothrombin Precursors in the Endoplasmic Reticulum*. *Thrombosis Research*, 1999. **96**(2): p. 91-98.
60. Esmon, C.T., J.W. Suttie, and C.M. Jackson, *The functional significance of vitamin K action. Difference in phospholipid binding between normal and abnormal prothrombin*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(11): p. 4095-9.
61. Davie, E.W. and J.D. Kulman, *An Overview of the Structure and Function of Thrombin*. *Semin Thromb Hemost*, 2006. **32**(S 1): p. 003-015.
62. Heuberger, D.M. and R.A. Schuepbach, *Correction to: protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases*. *Thrombosis Journal*, 2019. **17**(1): p. 22.
63. Nystedt, S., et al., *The Mouse Proteinase-activated Receptor-2 cDNA and Gene: Molecular cloning and functional expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(11): p. 5950-5955.
64. Ishihara, H., et al., *Antibodies to Protease-Activated Receptor 3 Inhibit Activation of Mouse Platelets by Thrombin*. *Blood*, 1998. **91**(11): p. 4152-4157.
65. Offermanns, S., et al., *G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994. **91**(2): p. 504-508.
66. Voss, B., et al., *PAR1, but Not PAR4, Activates Human Platelets through a G β 13/Phosphoinositide-3 Kinase Signaling Axis*. *Molecular Pharmacology*, 2007. **71**(5): p. 1399.

67. Hirano, K., *The Roles of Proteinase-Activated Receptors in the Vascular Physiology and Pathophysiology*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2007. **27**(1): p. 27-36.
68. Martorell, L., et al., *Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2008. **99**(2): p. 305-15.
69. Imokawa, Y. and J.P. Brockes, *Selective activation of thrombin is a critical determinant for vertebrate lens regeneration*. Curr Biol, 2003. **13**(10): p. 877-81.
70. Maden, M., *Regeneration: every clot has a thrombin lining*. Curr Biol, 2003. **13**(13): p. R517-8.
71. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 776-87.
72. Borissoff, J.I., et al., *Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze?* Cardiovasc Res, 2009. **82**(3): p. 392-403.
73. Turgeon, V.L. and L.J. Houenou, *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): p. 85-95.
74. Nierodzik, M.L. and S. Karpatkin, *Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype*. Cancer Cell, 2006. **10**(5): p. 355-62.
75. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-52.
76. Coughlin, S.R., *Thrombin signalling and protease-activated receptors*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 258-64.
77. Huber-Lang, M., et al., *Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway*. Nat Med, 2006. **12**(6): p. 682-7.
78. Sun, W.Y., et al., *Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(13): p. 7597-7602.
79. Dihanich, M., et al., *Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system*. Neuron, 1991. **6**(4): p. 575-581.
80. Zoubine, M.N., et al., *A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle*. Dev Biol, 1996. **179**(2): p. 447-57.
81. Chow, B.K., et al., *Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18927-33.
82. Bancroft, J.D., S.A. McDowell, and S.J. Degen, *The human prothrombin gene: transcriptional regulation in HepG2 cells*. Biochemistry, 1992. **31**(49): p. 12469-76.
83. Ceelie, H., et al., *Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2003. **1**(8): p. 1688-1698.
84. Danckwardt, S., et al., *Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals*. The EMBO Journal, 2007. **26**(11): p. 2658-2669.
85. Danckwardt, S., et al., *p38 MAPK Controls Prothrombin Expression by Regulated RNA 3' End Processing*. Molecular Cell, 2011. **41**(3): p. 298-310.
86. Sandberg, R., et al., *Proliferating Cells Express mRNAs with Shortened 3' Untranslated Regions and Fewer MicroRNA Target Sites*. Science, 2008. **320**(5883): p. 1643.
87. Takagaki, Y., et al., *The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation*. Cell, 1996. **87**(5): p. 941-952.
88. Mayr, C. and D.P. Bartel, *Widespread shortening of 3' UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells*. Cell, 2009. **138**(4): p. 673-684.

89. Prins, M. and H. Otten, *Thrombosis and cancer: a short history of Trousseau's syndrome*. *Thrombosis and Cancer*, 2004: p. 1-10.
90. Snyder, K.M. and C.M. Kessler, *The pivotal role of thrombin in cancer biology and tumorigenesis*. *Semin Thromb Hemost*, 2008. **34**(8): p. 734-41.
91. Otten, H.-M.M.B. and M.H. Prins, *Venous Thromboembolism and Occult Malignancy*. *Thrombosis Research*, 2001. **102**(6): p. V187-V194.
92. Abu Saadeh, F., et al., *Procoagulant activity in gynaecological cancer patients; the effect of surgery and chemotherapy*. *Thromb Res*, 2016. **139**: p. 135-41.
93. Ferroni, P., et al., *An activated protein C-dependent thrombin generation assay predicts chemotherapy-associated venous thromboembolism in cancer patients*. *Thromb Haemost*, 2011. **105**(5): p. 931-2.
94. Beleva, E., V. Popov, and J. Grudeva-Popova, *Hemostatic System in Malignancy: Providing the "Soil" in Metastatic Niche Formation*. 2016.
95. RUF, W., et al., *Tissue factor and cell signalling in cancer progression and thrombosis*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2011. **9**(s1): p. 306-315.
96. Rickles, F.R., S. Patierno, and P.M. Fernandez, *Tissue Factor, Thrombin, and Cancer*. *Chest*, 2003. **124**(3, Supplement): p. 58S-68S.
97. Reddel, C.J., C.W. Tan, and V.M. Chen, *Thrombin Generation and Cancer: Contributors and Consequences*. *Cancers*, 2019. **11**(1): p. 100.
98. Liu, H., et al., *The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015. **141**(2): p. 189-201.
99. Ozdemir, T., et al., *Fibrin serves as a divalent ligand that regulates neutrophil-mediated melanoma cells adhesion to endothelium under shear conditions*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **302**(8): p. C1189-201.
100. Wojtukiewicz, M.Z., et al., *Thrombin—unique coagulation system protein with multifaceted impacts on cancer and metastasis*. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2016. **35**(2): p. 213-233.
101. Pereira, L., et al., *Implications of epithelial-mesenchymal plasticity for heterogeneity in colorectal cancer*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 13.
102. Lavergne, M., et al., *Platelet Integrins in Tumor Metastasis: Do They Represent a Therapeutic Target?* *Cancers*, 2017. **9**(10): p. 133.
103. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 883-99.
104. Raingeaud, J., 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): p. 7420-6.
105. Wagener, C.-. *Molekulare Onkologie Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen*. 3., komplett aktualisierte und erweiterte Auflage ed, ed. O. Müller. 2010: THIEME.
106. Haddad, T.C. and E.W. Greeno, *Chemotherapy-induced thrombosis*. *Thrombosis Research*, 2006. **118**(5): p. 555-568.
107. Ashrani, A.A. and S.V. Rajkumar, *Chemotherapy-associated thrombosis*. *Coagulation in Cancer*, 2009: p. 181-206.
108. Jo, V.Y. and C.D. Fletcher, *WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition*. *Pathology*, 2014. **46**(2): p. 95-104.
109. Folpe, A.L., *Fibrosarcoma: a review and update*. *Histopathology*, 2014. **64**(1): p. 12-25.
110. Augsburger, D., et al., *Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma - perspectives for future therapeutic targets and strategies*. *Oncotarget*, 2017. **8**(61): p. 104638-104653.
111. Bahrami, A. and A.L. Folpe, *Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(10): p. 1504-13.

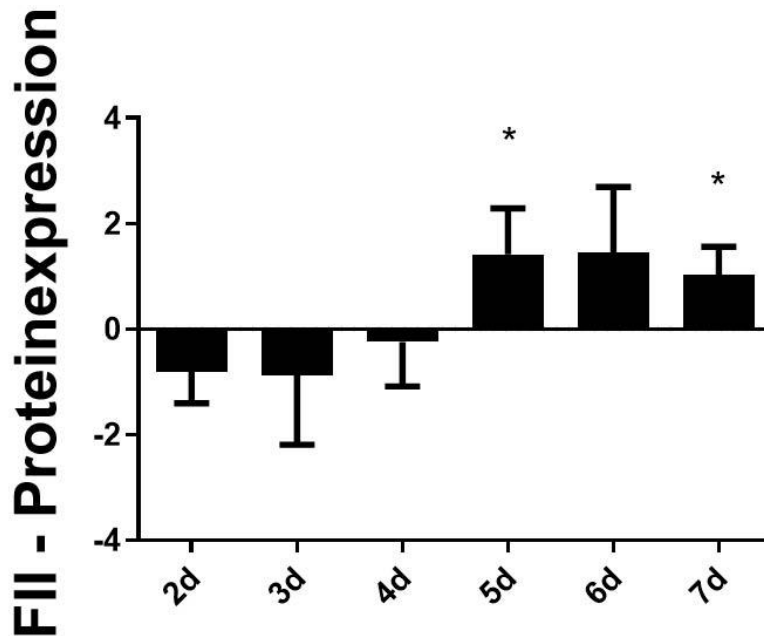
112. Meister, H.P., *Tumoren und tumorförmige Veränderungen des Weichgewebes*, in *Spezielle pathologische Anatomie*, W.e.a. Doerr, Editor. 1984, Springer Verlag: Berlin. p. 1296.
113. Russell, W.O., et al., *A clinical and pathological staging system for soft tissue sarcomas*. *Cancer*, 1977. **40**(4): p. 1562-1570.
114. Dadia, S. and R. Grimer, *Characteristics, diagnosis and treatment of bone and soft tissue sarcomas*. *Br J Hosp Med (Lond)*, 2007. **68**(11): p. 589-93.
115. Rosenberg, S.A., et al., *The treatment of soft-tissue sarcomas of the extremities: prospective randomized evaluations of (1) limb-sparing surgery plus radiation therapy compared with amputation and (2) the role of adjuvant chemotherapy*. *Ann Surg*, 1982. **196**(3): p. 305-15.
116. Nourse, J., et al., *Non-invasive imaging of gene expression and protein secretion dynamics in living mice*. *bioRxiv*, 2021: p. 2021.07.08.451623.
117. Bloushtain-Qimron, N., et al., *Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(6): p. 809-17.
118. de Lamarck, J.-B.d.M., *Philosophie zoologique*. Vol. 1. 1873: F. Savy.
119. Waddington, C.H., *Towards a theoretical biology*. *Nature*, 1968. **218**(5141): p. 525-527.
120. Arrowsmith, C.H., et al., *Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(5): p. 384-400.
121. Wu, C. and J.R. Morris, *Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence*. *Science*, 2001. **293**(5532): p. 1103-5.
122. Dupont, C., D.R. Armant, and C.A. Brenner, *Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective*. *Seminars in reproductive medicine*, 2009. **27**(5): p. 351-357.
123. Cheng, X. and R.M. Blumenthal, *Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective*. *Structure*, 2008. **16**(3): p. 341-50.
124. Laird, P.W., *Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis*. *Nature Reviews Genetics*, 2010. **11**(3): p. 191-203.
125. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. *N Engl J Med*, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
126. Baylin, S.B. and P.A. Jones, *A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications*. *Nature Reviews Cancer*, 2011. **11**(10): p. 726-734.
127. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The Epigenomics of Cancer*. *Cell*, 2007. **128**(4): p. 683-692.
128. Xie, S., et al., *Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family*. *Gene*, 1999. **236**(1): p. 87-95.
129. Martin, C. and Y. Zhang, *The diverse functions of histone lysine methylation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6**(11): p. 838-49.
130. Collection, A.T.C. *Animal Cell Culture Guide*. 2022 March 29, 2022]; Available from: <https://www.atcc.org/-/media/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide.pdf?rev=6bfbd586be1426ab9b0c4e8a54197d5>.
131. Danckwardt, S., M.W. Hentze, and A.E. Kulozik, *Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond*. *Journal of Molecular Medicine*, 2013. **91**(11): p. 1257-1271.
132. Walesky, C. and U. Apte, *Role of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in cell proliferation and cancer*. *Gene expression*, 2015. **16**(3): p. 101-108.
133. Wang, B., et al., *FOXA2 promotes the proliferation, migration and invasion, and epithelial mesenchymal transition in colon cancer*. *Exp Ther Med*, 2018. **16**(1): p. 133-140.
134. Turpin, B., et al., *Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer*. *Cancer Res*, 2014. **74**(11): p. 3020-3030.
135. Asanuma, K., et al., *The thrombin inhibitor, argatroban, inhibits breast cancer metastasis to bone*. *Breast Cancer*, 2013. **20**(3): p. 241-6.

136. Schulman, S. and P. Lindmarker, *Incidence of Cancer after Prophylaxis with Warfarin against Recurrent Venous Thromboembolism*. New England Journal of Medicine, 2000. **342**(26): p. 1953-1958.
137. Schulze, E.B., et al., *The thrombin inhibitor Argatroban reduces breast cancer malignancy and metastasis via osteopontin-dependent and osteopontin-independent mechanisms*. Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(2): p. 243-54.
138. Peng, Y. and N. Jahroudi, *The NFY transcription factor inhibits von Willebrand factor promoter activation in non-endothelial cells through recruitment of histone deacetylases*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8385-94.
139. El-Maarri, O., et al., *Gender specific differences in levels of DNA methylation at selected loci from human total blood: a tendency toward higher methylation levels in males*. Human Genetics, 2007. **122**(5): p. 505-514.
140. Sjöstedt, E., et al., *An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain*. Science, 2020. **367**(6482): p. eaay5947.
141. *Human Protein Atlas*. 26.05.2022]; Available from: proteatlas.org.
142. Crick, F., *Central Dogma of Molecular Biology*. Nature, 1970. **227**(5258): p. 561-563.
143. McManus, J., Z. Cheng, and C. Vogel, *Next-generation analysis of gene expression regulation – comparing the roles of synthesis and degradation*. Molecular BioSystems, 2015. **11**(10): p. 2680-2689.
144. Lewis, C.J.T., T. Pan, and A. Kalsotra, *RNA modifications and structures cooperate to guide RNA–protein interactions*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2017. **18**(3): p. 202-210.
145. Luo, Z., et al., *Hepatocyte nuclear factor 1A (HNF1A) as a possible tumor suppressor in pancreatic cancer*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121082.
146. Tang, Y., et al., *FOXA2 functions as a suppressor of tumor metastasis by inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition in human lung cancers*. Cell Research, 2011. **21**(2): p. 316-326.
147. Even-Ram, S., et al., *Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes*. Nat Med, 1998. **4**(8): p. 909-14.
148. Jin, E., et al., *Protease-activated receptor (PAR)-1 and PAR-2 participate in the cell growth of alveolar capillary endothelium in primary lung adenocarcinomas*. Cancer, 2003. **97**(3): p. 703-13.
149. Fujimoto, D., et al., *The activation of Proteinase-Activated Receptor-1 (PAR1) mediates gastric cancer cell proliferation and invasion*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 443.
150. Darmoul, D., et al., *Activation of proteinase-activated receptor 1 promotes human colon cancer cell proliferation through epidermal growth factor receptor transactivation*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(9): p. 514-22.
151. Hu, L., et al., *Thrombin induces tumor cell cycle activation and spontaneous growth by down-regulation of p27Kip1, in association with the up-regulation of Skp2 and MiR-222*. Cancer Res, 2009. **69**(8): p. 3374-81.
152. Hua, Y., et al., *The role of thrombin in gliomas*. J Thromb Haemost, 2005. **3**(9): p. 1917-23.
153. Ichikawa, J., et al., *Thrombin induces osteosarcoma growth, a function inhibited by low molecular weight heparin in vitro and in vivo: procoagulant nature of osteosarcoma*. Cancer, 2012. **118**(9): p. 2494-506.
154. Wysoczynski, M., et al., *Thrombin regulates the metastatic potential of human rhabdomyosarcoma cells: distinct role of PAR1 and PAR3 signaling*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(5): p. 677-90.
155. Chen, H.T., et al., *Thrombin enhanced migration and MMPs expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway*. J Cell Physiol, 2010. **223**(3): p. 737-45.
156. Ahler, E., et al., *Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines*. PloS one, 2013. **8**(5): p. e64561-e64561.

157. Levine, E.M., et al., *Contact inhibition, macromolecular synthesis, and polyribosomes in cultured human diploid fibroblasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1965. **53**(2): p. 350-356.
158. Ribatti, D., *A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy*. Experimental Cell Research, 2017. **359**(1): p. 17-19.
159. Swat, A., et al., *Cell Density-Dependent Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling by p38 α Mitogen-Activated Protein Kinase via Sprouty2 Downregulation*. Molecular and Cellular Biology, 2009. **29**(12): p. 3332-3343.
160. Leelahavanichkul, K., et al., *A role for p38 MAPK in head and neck cancer cell growth and tumor-induced angiogenesis and lymphangiogenesis*. Molecular Oncology, 2014. **8**(1): p. 105-118.
161. Kakkar, A.K., et al., *Low molecular weight heparin, therapy with dalteparin, and survival in advanced cancer: the fragmin advanced malignancy outcome study (FAMOUS)*. J Clin Oncol, 2004. **22**(10): p. 1944-8.
162. Kim, S.H., et al., *Doxorubicin-induced platelet procoagulant activities: an important clue for chemotherapy-associated thrombosis*. Toxicol Sci, 2011. **124**(1): p. 215-24.
163. Said, H.M., et al., *Response of the plasma hypoxia marker osteopontin to in vitro hypoxia in human tumor cells*. Radiotherapy and Oncology, 2005. **76**(2): p. 200-205.
164. Tsai, M.C., et al., *Factor VII promotes hepatocellular carcinoma progression through ERK-TSC signaling*. Cell Death Discovery, 2015. **1**(1): p. 15051.
165. Tran, H.C.M., et al., *Impact of LMWH and Specific Factor Xa Inhibitors, Apixaban and Fondaparinux, on Cancer Cell Biology and Procoagulant Properties of Cancer Microenvironment*. Blood, 2021. **138**: p. 2136.
166. Guasti, L., et al., *In vitro effects of Apixaban on 5 different cancer cell lines*. PloS one, 2017. **12**(10): p. e0185035-e0185035.
167. Kirwan, C.C., et al., *PO-36 - Thrombin Inhibition Preoperatively (TIP) in early breast cancer, the first clinical trial of NOACs as an anti-cancer agent: trial methodology*. Thromb Res, 2016. **140 Suppl 1**: p. S189-90.
168. Ahuja, N., et al., *Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5489-94.
169. Hoal-van Helden, E.G. and P.D. van Helden, *Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs*. Mutat Res, 1989. **219**(5-6): p. 263-6.
170. Ross, J.P., K.N. Rand, and P.L. Molloy, *Hypomethylation of repeated DNA sequences in cancer*. Epigenomics, 2010. **2**(2): p. 245-69.
171. Locke, W.J., et al., *DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic*. Frontiers in genetics, 2019. **10**: p. 1150-1150.
172. Esteller, M., *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. Nature Reviews Genetics, 2007. **8**(4): p. 286-298.
173. Šorm, F., et al., *5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic*. Experientia, 1964. **20**(4): p. 202-203.
174. Flotho, C., et al., *The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells*. Leukemia, 2009. **23**(6): p. 1019-1028.
175. Hu, C., et al., *DNA methyltransferase inhibitors combination therapy for the treatment of solid tumor: mechanism and clinical application*. Clinical Epigenetics, 2021. **13**(1): p. 166.
176. Wreczycka, K., et al., *Strategies for analyzing bisulfite sequencing data*. Journal of Biotechnology, 2017. **261**: p. 105-115.
177. Zhao, T., et al., *Histone deacetylase inhibitor treatment attenuates coagulation imbalance in a lethal murine model of sepsis*. Surgery, 2014. **156**(2): p. 214-220.
178. Alhamdi, Y. and C.-H. Toh, *The role of extracellular histones in haematological disorders*. British Journal of Haematology, 2016. **173**(5): p. 805-811.

7 Anhang

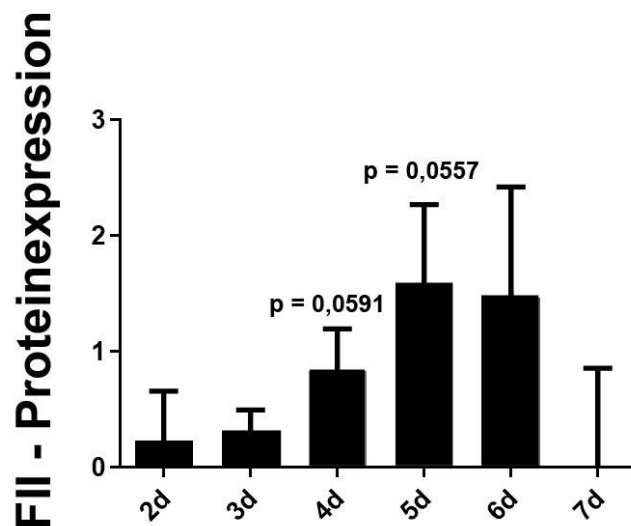
7.1 DNMT-Inhibition mit Decitabine im Langzeitscreening



Anhang 1: DNMT-Inhibition durch Decitabine in Hepatozyten erhöht FII-Expression

100.000 Hepatozyten wurden mit 10 μ M Decitabine in inkubiert. Nach 2 (3;4;5;6;7) Tagen wurde die FII-Expression indirekt im Firefly Luciferase Assay gemessen.

Einstichproben-T-Test mit hypothetischem Wert $H_0: \mu = \mu_0$ (* $p < 0,05$; $n=4$ biologische Replikate).

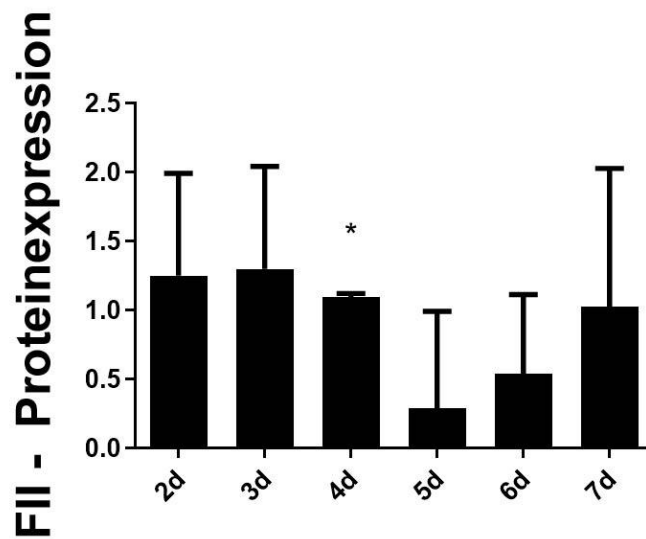


Anhang 2: DNMT-Inhibition durch Decitabine in Fibroblasten

100.000 Fibroblasten wurden mit 10 μ M Decitabine inkubiert. Nach 2 (3;4;5;6;7) Tagen wurde die FII-Expression indirekt im Firefly Luciferase Assay gemessen.

Einstichproben-T-Test mit hypothetischem Wert $H_0: \mu = \mu_0$ (* $p < 0,05$; $n=4$ biologische Replikate).

7.2 O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferasen-Inhibition mit Lomeguatrib im Langzeitscreening

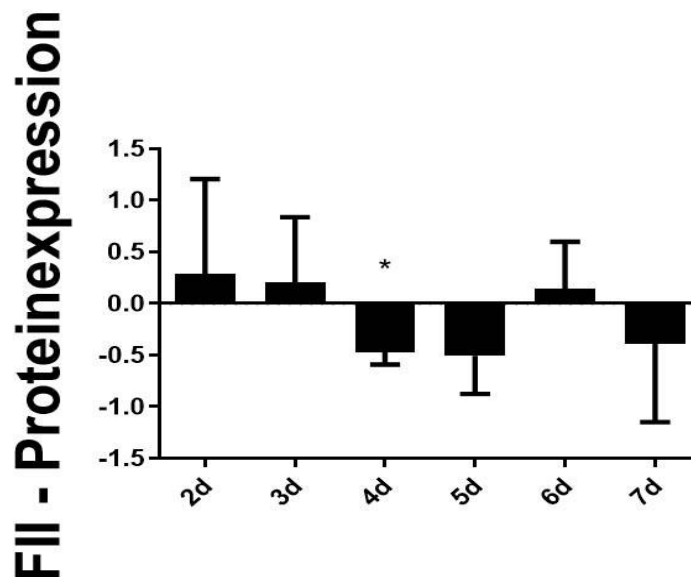


Anhang 3: O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferasen-Inhibition durch Lomeguatrib in Hepatozyten erhöht FII-Expression

100.000 Hepatozyten wurden mit 10 μ M Lomeguatrib inkubiert. Nach 2 (3;4;5;6;7) Tagen wurde die FII-Expression indirekt im Firefly Luciferase Assay gemessen.

Einstichproben-T-Test mit hypothetischem Wert $H_0: \mu = \mu_0$ (* $p < 0,05$; $n=3$ biologische Replikate).

7.3 DNMT-Inhibition mit Zebularine im Langzeitscreening



Anhang 4: DNA-Methyltransferasen-Inhibition durch Zebularine in Hepatozyten vermindert FII-Expression

100.000 Hepatozyten wurden mit 10 μ M Zebularine inkubiert. Nach 2 (3;4;5;6;7) Tagen wurde die FII-Expression indirekt im Firefly Luciferase Assay gemessen.

Einstichproben-T-Test mit hypothetischem Wert $H_0: \mu = \mu_0$ (* $p < 0,05$; $n=3$ biologische Replikate).

