

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

Identifikation der Prothrombin (F2) bildenden Zellen in der Lunge

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

Vorgelegt von

Ann-Celine Mathmann  
aus Lörrach

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild  
Tag der Promotion: 06. September 2024

## **1 Erklärung zur Dissertation**

Hiermit erkläre ich, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unautorisierte Hilfe durch Dritte verfasst wurde. Alle Publikationen, gedruckte oder ungedruckte Dokumente oder weitere Materialien, welche ich direkt oder indirekt zitiert habe, sind als solche markiert und mit den notwendigen bibliographischen Informationen gekennzeichnet. Die Dissertation wurde nicht an andere Fakultäten oder Institute weitergeleitet.

## **2 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater [...] für die Ermöglichung der Forschung und die kompetente Betreuung und Unterstützung im Rahmen meiner Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des [...] -Labors für ein angenehmes und konstruktives Arbeitsumfeld. Besonders [...] möchte ich für die vielfältigen Diskussionen und Gespräche sowie für die Organisation der Mauseaufzucht danken.

Des Weiteren bin ich dankbar für die Unterstützung durch die AG [...] für die Bereitstellung der CD11c cre Mäuse und die Möglichkeit das FACSymphony-Gerät zu nutzen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die vielfältige Unterstützung in allen Phasen der Promotion bedanken.

### 3 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	aktiviertes Protein C, aktiviertem Protein C
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AT	Antithrombin
B6	Wildtyp
BAL	Bronchialveolar Lavage
BSA	Bovin Serum Albumin
C3b	Komplement 3b
CD11b	Cluster of Differentiation 11b
CD11c	Cluster of Differentiation 11c
CD18	Cluster of Differentiation 18
CD200	Cluster of Differentiation 200
CD200R	Cell surface transmembrane glycoprotein CD200 receptor 1
CD206	Cluster of Differentiation 206 / Mannose Rezeptor
CNP	Carbon Nanopartikel
CNS	zentrale Nervensystem
Ctrl	Kontrolle
DC	dendritischen Zellen
DI	D-Insight
DIC	disseminierte intravaskuläre Koagulation
Dox	Doxycyclin
DTR	Diphtherie-Toxin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase 1 und 2
ETS	E26 transformation-specific
F1	Fibrinogen
F2KD	F2-Knockdown
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FBP2	Fuse-binding protein 2
FBP3	Fuse-binding protein 3
FI	Fibrinogen
Fla	Fibrin
FIX	Christmas Faktor
FIXa	aktivierter Christmas Faktor
Flag	Flag-Tag
FLuc2CP	Firefly-Luciferase
FV	Proaccelerin
FVII	Proconvertin
FVIII	antihämophiles Globin A
FVIIIa	aktiviertes antihämophiles Globin A
FXI	Faktor XI
FXIa	aktivierter Faktor XI
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen stimulierende Faktor
GPIb $\alpha$	Glykoprotein Ib $\alpha$
GTP	Guanosintriphosphat
H1-tetO	tet-Promotor

HLA-DR	Human Leukozyte Antigen Rezeptoren
Hsp25	Heat Shock Protein 25
IFNGR	Interferon Gamma Rezeptor 1
IL-10R	Interleukin-10 Rezeptor
IL-1R	Interleukin Rezeptor 1
IRAK	IL-1R-assoziierten Kinase
iRFP	Infrarot-Fluoreszenz-Reporter
itetR	Repressor
IVIS	In vivo Imaging System
JAB1	JUN-activation domain binding Protein
JAK1	Janus Kinase 1
kDa	Kilodalton
LDL	low density- lipoprotein
MACS	Magnetic Cell Separation
MIF	Macrophage Migration Inhibiting Faktor
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NFkB	kappa light chain enhancer der B-Zellen
p38 MAPK	p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase
p53	Tumorsuppressor Protein p53
PAI	Plasmingen Aktivator Inhibitor
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline
PGE2	Prostaglandin E2
pHSP27	Phosphorylated Heat Shock Protein 27
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinyliden
qSOFA	quickSOFA
RLuc8.6	Renilla-Luciferase
RNAi	induzierbare RNA Interferenz
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFTPA	Surfactant Protein A
SFTPD	Surfactant Protein D
shRNA	short-hairpin-RNA
SIGLEC-F	sialic acid-binding immunoglobulin-like lektin F
SiO <sub>2</sub>	Siliciumdioxid
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOFA	Sequential-Organ-Failure-Assesment
TAFI	Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse Inhibitor
TAFIa	aktivierter Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TFPI	Tissue Faktor Protease Inhibitor
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor
TLR4	Toll-like-Rezeptor-4
TNFR	Tumor Necrosis Factor Receptor
TNFR1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor alpha

tPA	tissue Plasminogen Aktivator
TREM	Trigger-Rezeptoren auf myeloiden Zellen
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$
TxA2	Thromboxan A2, Thromboxan A2
uPA	Urokinase Plasminogen Aktivator
UPFT1	Urinary Prothrombin Fragment 1
USE	upstream sequence element
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VTE	venöse Thromboembolie

## 4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten .....	15
Abbildung 2: Die Prozesse der sekundären Hämostase verlaufen synchron. ..	17
Abbildung 3: Visualisierung der Prothrombin-Expression über einen Lumineszenz-Reporter sowie einen Fluoreszenz-Reporter in einem transgenen D-Insight Reporter-Mausmodell.....	40
Abbildung 4: Doxycyclin führt zum Abbau der mRNA von Prothrombin im F2KD Mausmodell. ....	41
Abbildung 5: Die cre-Rekombinase ermöglicht einen Prothrombin-Knockout in CD11c exprimierenden Zellen.....	42
Abbildung 6: Zyklen des vollautomatisierten Verfahrens zur Quantifizierung genomischer DNA. ....	53
Abbildung 7: Die Lungen und Rippen verfügen über eine extrahepatische F2- Expression.....	57
Abbildung 8: Myeloische Zellen in der Lunge von Mäusen verfügen über unterschiedliche Oberflächenmarker.....	58
Abbildung 9: Alveolarmakrophagen haben den größten prozentualen Anteil an der BAL. ....	59
Abbildung 10: Firefly-Luciferase-gekoppelten Prothrombin (F2)-Expressionen in BAL und Siglec f+ Zellen. ....	60
Abbildung 11: BAL-Lysate enthalten Prothrombin. ....	61
Abbildung 12: Ein F2-Knockout in Alveolarmakrophagen hat keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben im Sepsis Modell. ....	64
Abbildung 13: MIF reguliert verschiedene Signalwege in Alveolarmakrophagen. .....	66
Abbildung 14: Prothrombin erhöht MIF-Sekretion in Alveolarmakrophagen. ....	67
Abbildung 15: Prothrombin-Depletion inhibiert TNF $\alpha$ -Sekretion. ....	68
Abbildung 16: Surfactant Protein D und MIF steigern die Prothrombin- Expression.....	70
Abbildung 17: Reduktion der TLR4-Expression im Prothrombin-Knockdown. ..	73
Abbildung 18: Kolonisation der Lunge durch Makrophagen. ....	76

Abbildung 19: Potenzielles pro-inflammatorisches Signal durch die F2-  
Expression in den Alveolarmakrophagen mit autoregulatorischer Schleife.

.....90

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>8</b>
<b>5</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>13</b>
5.1	Hämostase und Blutgerinnung .....	13
5.1.1	Primäre Hämostase .....	14
5.1.2	Sekundäre Hämostase .....	16
5.2	Fibrinolyse .....	18
5.3	Thrombin und sein Vorläufer Prothrombin .....	19
5.3.1	Prothrombin Aktivierung.....	19
5.3.2	Regulation der Genexpression von Thrombin .....	20
5.3.3	Molekulare Mechanismen des Thrombinsignalweges.....	21
5.3.4	Thrombinfunktion .....	24
5.3.5	Extrahepatische Prothrombinexpression und seine Bedeutung .....	28
5.4	Ziel des Projekts.....	31
<b>6</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
6.1	Puffer und Lösungen .....	32
6.2	Primer .....	33
6.3	Antikörper .....	33
6.4	Weitere Materialien .....	34
6.4.1	Chirurgische Materialien .....	34
6.4.2	Assays.....	34
6.4.3	Zellkultur.....	35
6.4.4	MACS-Sortierung.....	36

6.4.5	FACS.....	36
6.4.6	Western Blot.....	37
6.4.7	Genomische PCR .....	38
6.4.8	Verbrauchsmaterialien .....	38
6.4.9	Geräte .....	39
6.5	Tiermodelle .....	40
6.5.1	D-Insight Mausmodell .....	40
6.5.2	F2-Knockdown (F2-KD) Mausmodell .....	41
6.5.3	CD11c-CRE Mausmodell.....	42
6.6	Bronchioalveolarlavage Extraktion .....	43
6.7	Zellzählungen.....	44
6.8	Sortiermethoden.....	45
6.8.1	Magnetic Cell Separation (MACS)-Sortierung.....	45
6.8.2	Flow Zytometrie/ Fluorescence-activated cell sorting (FACS) .....	46
6.9	Zellkultur .....	47
6.9.1	Gelatine-Pre-Coating .....	47
6.9.2	Zellkultur für Luciferase-Assays .....	47
6.9.3	Zellkultur für MIF-Assays .....	47
6.9.4	Zellkultur für TNF $\alpha$ -Assays.....	48
6.9.5	Zellkultur-Stimulation .....	49
6.10	Luciferase-Assay.....	50
6.11	ELISA.....	51
6.11.1	Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF) Assay .....	51
6.11.2	Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) Assay .....	52
6.12	Molekulare Methoden .....	53
6.12.1	Genomic PCR.....	53
6.12.2	Protein Isolierung.....	54
6.12.3	Bradford-Assay .....	54
6.12.4	Western Blot.....	54
<b>7</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>57</b>

7.1	Identifikation des zellulären Ursprungs der F2-Expression in der Lunge bzw. im Thorax .....	57
7.2	Potenzielle funktionale Rolle der extrahepatischen Prothrombin (F2) - Expression in den Alveolarmakrophagen .....	63
7.2.1	Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf das Gesamtüberleben im Sepsis Modell .....	63
7.2.2	Einfluss der F2-Expression auf Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF) als inflammatorisches Treiber-Zytokin in der Lunge .....	65
7.2.3	Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf die Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )-Produktion und -Freisetzung .....	68
7.2.4	Einfluss von Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF) und anderen Stimulatoren auf die F2-Expression in Alveolarmakrophagen .....	69
7.2.5	Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf die Toll-like-Receptor 4 (TLR4)-Expression .....	72
<b>8</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
8.1	Alveolarmakrophagen .....	75
8.1.1	Kolonisation der Lunge durch Makrophagen .....	75
8.1.2	Oberflächenmarker der Alveolarmakrophagen und Klassifikation .....	76
8.1.3	Alveolarmakrophagen Aktivierung und Signalleitung .....	79
8.2	Sepsis .....	83
8.2.1	Definition und Abgrenzung der Begrifflichkeiten .....	83
8.2.2	Pathophysiologie der Sepsis .....	85
8.3	Interpretation der Ergebnisse .....	86
8.4	Limitationen der Arbeit .....	93
8.5	Empfehlungen für zukünftige Forschung .....	94
<b>9</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>10</b>	<b>Referenzen .....</b>	<b>96</b>

## **5 Einleitung**

### **5.1 Hämostase und Blutgerinnung**

Die Hämostase ist ein evolutionär konservierter Mechanismus zur Stillung einer Blutung mit Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität. Dieser umfasst verschiedene Prozesse, die ein Gleichgewicht zwischen regelrechtem Blutfluss, Koagulation und Umbau bzw. Abbau des entstandenen Blutkoagels nach Reparatur der Verletzungsstelle ermöglichen (Versteeg, Heemskerk, Levi, & Reitsma, 2013). Eine Verletzung des Gefäßes mit Verlust des physiologischen Gefäßzusammenhalts ist häufig unproblematisch, da das Hämostasesystem einen kritischen Blutverlust verhindert (Broos, Feys, De Meyer, Vanhoorelbeke, & Deckmyn, 2011). Das System, welches die Waage zwischen Blutverlust und Überreaktion mit Thrombosegefahr hält, ist in drei abgrenzbare Phasen unterteilt. Die primäre Hämostase mit Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßabschnitts, Rekrutierung von Thrombozyten, Thrombozytenadhäsion sowie Thrombozytenaggregation beginnt zuerst nach endothelialer Verletzung. Dann folgt die sekundäre Hämostase, als eigentliche Blutgerinnung, welche im Wesentlichen das Blutkoagel stabilisiert. Im Anschluss folgt die Fibrinolyse, welche nach Wiederherstellung der Gefäßstrukturen alle angebrachten Schutzmechanismen wieder entfernt. Das reparierte Gefäß ist dann wieder voll funktionsfähig. Die Hämostase ist abgeschlossen (Sinégre, Teissandier, Milenkovic, Morand, & Lebreton, 2019).

### 5.1.1 Primäre Hämostase

Durch eine endotheliale Verletzung kommt es zur Freilegung der normalerweise verdeckten extrazellulären Matrix. Bei intakter Gefäßwand ist kein Kontakt der Thrombozyten zur extrazellulären Matrix möglich. Durch die Verletzung ändert sich das Adhärenzverhalten der Thrombozyten abrupt und es kommt zur direkten Anlagerung der Thrombozyten an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Die Adhäsion selbst erfolgt nicht ungezielt, sondern wird über verschiedene Rezeptoren geregelt, die das Anhaften der Thrombozyten möglich machen (Broos et al., 2011).

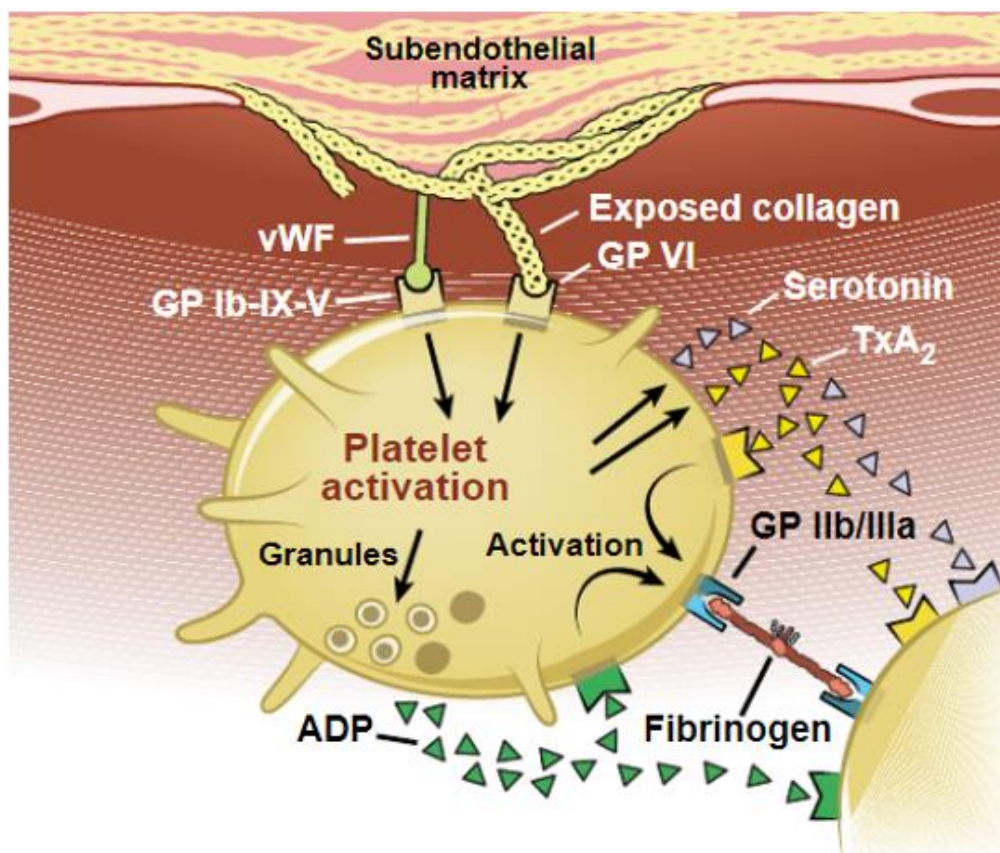
Dabei dient der von Willebrand Faktor (vWF) als verbindendes Element zwischen Gefäß und Thrombozyt. vWF bindet sowohl Kollagene der extrazellulären Matrix als auch Glykoprotein Iba (GPIb $\alpha$ ) auf der Oberfläche der noch nicht-aktivierten Thrombozyten. Diese Verbindung über vWF vermittelt die Thrombozytenadhäsion (Lankhof et al., 1996).

Obwohl die Verbindung von vWF und GPIb $\alpha$  zu Beginn sinnvoll und effektiv ist, um die Hämostase einzuleiten, ist dies allein dauerhaft nicht ausreichend und würde sich nach einiger Zeit wieder lösen. Um die Verbindung der Thrombozyten mit der extrazellulären Matrix zu festigen sind weitere Prozesse notwendig (Broos et al., 2011). Dafür erfolgt im Anschluss an die Thrombozytenadhäsion die Thrombozytenaktivierung vermittelt durch Glykoproteinrezeptor VI (GPVI). Die Aktivierung ist gekennzeichnet durch die Freisetzung der Inhaltsstoffe der Thrombozytengranula. Wichtige Bestandteile der Thrombozytengranula sind zum Beispiel Adenosintriphosphat (ADP), Kalziumionen und Thromboxan A<sub>2</sub>. Die verschiedenen Inhaltsstoffe tragen zum weiteren Ablauf der primären Hämostase bei und bewirken unter anderem eine positive Rückkopplung und somit die weitere Aktivierung anderer Thrombozyten (Versteeg et al., 2013).

Durch die Thrombozytenaktivierung werden mehrere parallel ablaufende Mechanismen ausgelöst. Die Aktivierung führt zur Vergrößerung der Thrombozytenoberfläche durch einen sogenannten „shape change“ der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien und zugleich wird Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Dies ermöglicht nachfolgend die Bindung von Fibrinogen (FI) an die

Thrombozyten. Dieser Prozess wird als Thrombozytenaggregation bezeichnet (Brinkhous & Mason, 1972; Niewiarowski & Thomas, 1966).

Die zahlreichen Fibrinogen-Brücken zwischen den Thrombozyten führen zur Bildung eines dichten Thrombozyten-Netzwerks. Das Thrombozyten-Netzwerk ist zunächst nur einfach verknüpft und wird als sogenannter weißer Plättchenthrombus bezeichnet. Dieser kann nicht dauerhaft den Scherkräften im Gefäß standhalten, sodass zur Reparatur des Gefäßes die weiteren Mechanismen der sekundären Hämostase notwendig sind (Born, 1970; Detser, Stampfl, & Wetzstein, 1965). Der Übergang der primären Hämostase in die sekundäre Hämostase wird durch die Expression von Phospholipiden auf der Oberfläche der Thrombozyten als Cofaktoren der Gerinnung vermittelt (Rouser, 1958).



**Abbildung 1: Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten**

Ausgelöst durch eine Verletzung des Endothels mit Freilegung der subendothelialen Matrix kommt es zur Adhäsion der Thrombozyten an Kollagene vermittelt durch vWF. Die nachfolgende Thrombozytenaktivierung erfolgt über GPVI mit Freisetzung von ADP, Serotonin und Thromboxan A2 (TxA<sub>2</sub>) der Thrombozytengranula. Durch Vergrößerung der Thrombozytenoberfläche und Vernetzung über Fibrinogen mit Hilfe des GPIIb/IIIa erfolgt die Ausbildung eines Thrombozyten-Netzwerks (Halkar & Lincoff, 2016).

### 5.1.2 Sekundäre Hämostase

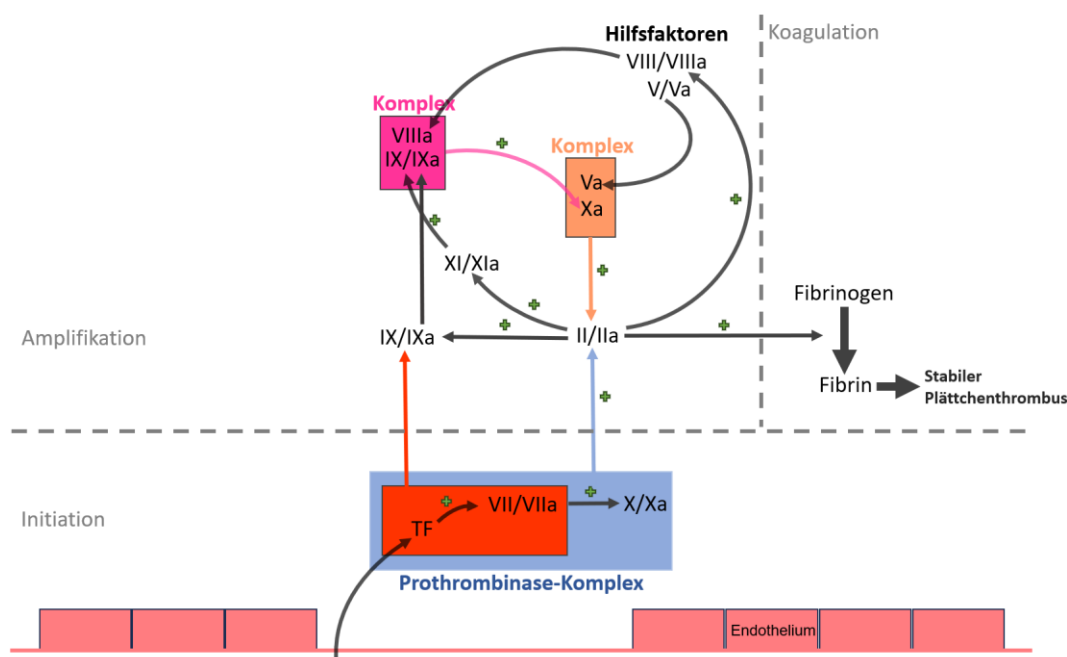
Ziel der sekundären Hämostase ist, die bisher bei der primären Hämostase entstandene Thrombozytenformation zu festigen. Dies umfasst vor allem die Transformation des verbindenden Fibrinogens (FI) zu Fibrin (FIa) (Davie & Ratnoff, 1964). Während man initial von einem Kaskadensystem ausging, welches zwei strikt getrennte Startpunkte hat und über zwei verschiedene Wege in einem gemeinsamen Endweg mündet, geht man heute davon aus, dass es sich um überlappende Prozesse, die nicht zeitlich nacheinander, sondern vielmehr synchron ablaufen, handelt (Monroe & Hoffman, 2006; Versteeg et al., 2013).

Im Fall einer Verletzung der Endothelzellschicht mit Verlust der Integrität zwischen den Endothelzellen werden darunter liegende Schichten aus glatter Muskulatur und Fibroblasten freigelegt und dem Blutfluss präsentiert. Dabei wird aus dem betroffenen Gewebe viel *Tissue Factor (TF)* freigesetzt, welcher dann die sekundäre Hämostase startet. Dafür bindet TF an Proconvertin (FVII). Dies führt zur Aktivierung von FVII zu FVIIa. Durch die Verbindung von TF und FVIIa entsteht ein Komplex, welcher im Weiteren unter anderem FX zu FXa spaltet. FXa ergänzt den bisherigen Komplex, sodass der sogenannte Prothrombinasekomplex entsteht. Die Verknüpfung von TF und VIIa führt auch zu Aktivierung kleinerer Mengen des Christmas-Faktors (FIX). Im Anschluss beginnt die Amplifikation. Das durch den Prothrombinasekomplex gebildete Thrombin führt zur Festigung des Thrombozyten-Netzwerks durch die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin. Thrombin aktiviert jedoch auch zusätzlich weitere Thrombozyten und führt zur Rekrutierung der Hilfsfaktoren wie Proaccelerin (FV) und antihämophiles Globin A (FVIII). Dies führt zu einem sich selbst verstärkenden Mechanismus, da die Kombination von aktiviertem antihämophilem Globin A (FVIIIa) und aktiviertem Christmas-Faktor (FIXa) über Aktivierung von FX zur Bildung von mehr Thrombin führt. Zusätzlich führt Thrombin auch zur Spaltung und Aktivierung von Faktor XI (FXI) zu aktiviertem Faktor XI (FXIa). Die folgende Ausbreitungsphase der sekundären Hämostase benötigt als Ausgangsbasis die negative Oberfläche der Thrombozyten und ist unabhängig von TF. Der zuvor aktivierte FXIa konvertiert jetzt mehr FIX zu FIXa. In Komplexform mit FVIIIa entsteht so die Möglichkeit wieder mehr

Thrombin zu produzieren, welches in der Folge dann weiter Fibrinogen zu Fibrin spaltet (Versteeg et al., 2013).

Die zahlreichen Prozesse, die sich gegenseitig aktivieren, müssen einem Kontrollsystem unterliegen, da sonst die Gefahr der Überreaktion mit Thrombusbildung und Verschluss des Gefäßes mit Ischämie des nachfolgenden Gewebeabschnittes besteht. Die beiden effektivsten Inhibitoren sind Protein C und Protein S. Ihre Aktivierung erfolgt frühzeitig durch Endothelzellen. Durch anschließende Bindung von Thrombomodulin und Thrombin wird Protein C aktiviert. Dieser Mechanismus hat zwei Vorteile für die Inhibition der sekundären Hämostase. Zum einen ermöglicht die Aktivierung von Protein C die Spaltung der assistierenden Faktoren FVa und FVIIIa. Dies verhindert die weitere Vervielfachung der Thrombinproduktion und zum anderen wird das die Gerinnung fördernde Thrombin durch diesen Mechanismus dem System entzogen (Zhao et al., 2019).

Weitere wichtige Inhibitoren sind vor allem Substanzen wie Antithrombin. Der Effekt des Antithrombins kann therapeutisch genutzt und hundertfach durch den Einsatz von Heparin verstärkt werden. Auch TF kann spezifisch durch *Tissue Factor Protease Inhibitor (TFPI)* gehemmt werden (Versteeg et al., 2013).



**Abbildung 2: Die Prozesse der sekundären Hämostase verlaufen synchron.**

Durch *Tissue Factor* aus dem verletzten Gewebe wird über die Aktivierung von FVIIa und FXa der Prothrombinase-Komplex gebildet. Der Prothrombinase-Komplex führt zur Bildung von Thrombin welches den Plättchenthrombus durch die Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin stabilisiert. Thrombin aktiviert zusätzlich weitere Faktoren wie FIX, FXI und die die Hilfsfaktoren FV und FVIII und ermöglicht somit eine Autoamplifikation (verändert, Versteeg et al., 2013).

## 5.2 Fibrinolyse

Nach vollständiger Rekonstruktion der verletzten Gefäßwand, muss das Blutkoagel abgebaut werden (Astrup, 1956; Fearnley & Lackner, 1955; R. G. Macfarlane & Biggs, 1948). Die sogenannte Fibrinolyse wird durch Gewebs-Plasminogen-Aktivator (tPA) initiiert und führt dazu, dass Plasminogen zu Plasmin gespalten wird (Longstaff, 2018). Neben tPA gibt es weitere Substanzen, die ebenfalls zur Spaltung von Plasminogen führen. Zu diesen Substanzen zählen unter anderem Urokinase Plasminogen Aktivator (uPA) und Streptokinase. Letzteres ist hauptsächlich in Bakterien zu finden (Bugge et al., 1996; Cook, Skora, Gillen, Walker, & McArthur, 2012). Das gebildete Plasmin interagiert mit Fibrin. Fibrin wird dadurch in lösliche Spaltprodukte, sogenannte D-Dimere, getrennt. Hierdurch wird das stabilisierende Fibrinnetz zwischen den Thrombozyten aufgelöst. Ebenso wie die primäre und sekundäre Hämostase benötigt das Fibrinolysesystem einen Regulationsmechanismus, um eine Überreaktion zu verhindern. Die wichtigsten Inhibitoren für dieses System sind Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) und  $\alpha$ 2-Antiplasmin. Ein weiterer Inhibitor ist Thrombin-aktivierbarer Fibrinolyse-Inhibitor (TAFIa). Dieser wird durch den Thrombomodulin-Thrombin-Komplex aktiviert und zusätzlich auch durch Plasmin (Longstaff, 2018).

## **5.3 Thrombin und sein Vorläufer Prothrombin**

### **5.3.1 Prothrombin Aktivierung**

Thrombin ist eine der wichtigsten Serinproteasen im Gerinnungssystem und wird von seinem Vorläufer Prothrombin gebildet. Prothrombin selbst ist das inaktive Zymogen von Thrombin und wird als Prepro-Prothrombin überwiegend von Hepatozyten freigesetzt (Davie & Kulman, 2006). Prepro-Prothrombin besteht aus unterschiedlichen Einheiten, die abgespalten bzw. posttranslational modifiziert werden müssen bis funktionsfähiges Thrombin entsteht. Prepro-Prothrombin besteht aus einer kurzen Signaleinheit gefolgt von einer Gla-Domäne, zwei Kringle Domänen (Kringle-1 und Kringle-2) sowie der entscheidenden terminal-carboxylierten Protease-Domäne, die nach vollständiger Prozessierung das Thrombin Molekül darstellt (Z. Chen, Pelc, & Di Cera, 2010).

#### **5.3.1.1 Vitamin K-abhängige Carboxylierung**

Nach Entfernung der Signaleinheit wird Pro-Prothrombin zur weiteren Verarbeitung zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert (Nelsestuen, Zytovicz, & Howard, 1974). Im endoplasmatischen Retikulum wird eine Gamma-Carboxylierung vorgenommen. Zur Gamma-Carboxylierung wird der Vitamin-K-Zyklus benötigt. Der gamma-carboxylierte Anteil macht es dem Prothrombin möglich, mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen zu interagieren. Über die gebundenen  $\text{Ca}^{2+}$  kann eine Verbindung zur negativen Oberfläche der Thrombozyten mit entsprechender Aktivierung eingegangen werden (Suttie, 1985; Ulrich, Furie, Jacobs, Vermeer, & Furie, 1988). Für die Katalyse ist die Gamma-Carboxylase verantwortlich und benötigt reduziertes Vitamin K als Cofaktor. Während der Reaktion wird Vitamin K zu Vitamin-K-2,3-Epoxid oxidiert. Obwohl Vitamin K auch in gewissen Mengen durch die Nahrung aufgenommen wird, ist dieser Anteil nicht ausreichend, um den Prozess aufrecht zu erhalten. Deswegen gibt es zusätzlich alternative Wege im Körper, um reduziertes Vitamin K zu gewinnen. Der genutzte Anteil an Vitamin K wird in einem Kreislauf recycelt und wiederverwendet. Die dafür notwendige Vitamin-K-Epoxid-Reduktase katalysiert oxidiertes Vitamin K zu Vitamin K. Dieses wird

im Folgeschritt durch die Vitamin-K-Reduktase erneut reduziert, sodass als Endprodukt reduziertes Vitamin K entsteht (Tie & Stafford, 2016).

Nach der Carboxylierung der Gla-Domäne und vor der eigentlichen Aktivierung durch die Prothrombinase während der Gerinnung muss das Propeptid noch abgespalten werden. Als Endresultat wird der NH<sub>2</sub>-Terminus von Prothrombin sichtbar. Das fertige Prothrombin wird in das Blut freigesetzt (Davie & Kulman, 2006).

### **5.3.1.2 Bildung von Thrombin während der Koagulation**

Das freigesetzte Prothrombin besteht noch aus einem NH<sub>2</sub>-Terminus, der Gla-Domäne, Kringel-1- und Kringel-2-Domäne, der eigentlichen Protease und dem COOH-Terminus. Zur Aktivierung benötigt das Prothrombin den Prothrombinase-Komplex, welcher während der Koagulation durch FXa, FVa, Kalziumionen und Phospholipiden gebildet wird. Der entstandene Komplex spaltet das Prothrombin an zwei definierten Stellen. Die erste Stelle befindet sich bei R320. Durch die Spaltung an dieser Stelle entsteht Meizothrombin. Meizothrombin enthält die beiden Bruchstücke, welche noch über eine Disulfidbrücke verknüpft sind. Die zweite Schnittstelle befindet sich bei R271, welche im Meizothrombin hinter der Kringel-2-Domäne zu finden ist. Durch die Spaltung dieser Stelle entsteht zum einen das sogenannte Fragment 1+2, welches alle Domänen vom NH<sub>2</sub>-Terminus bis zur Kringel-2-Domäne enthält. Dieses Fragment wird zu einem späteren Zeitpunkt zwischen den beiden Kringel-Domänen gespalten. Zum anderen entsteht Thrombin. Dieses besteht aus den verbliebenen beiden Domänen, die bei der ersten Spaltung mit einer Disulfidbrücke verbunden wurden. Das entstandene Thrombin ist direkt funktionsfähig (Davie & Kulman, 2006; Leem, Jeong, Won, Shin, & Kim, 2016).

### **5.3.2 Regulation der Genexpression von Thrombin**

Obwohl Thrombin durch das Gerinnungssystem kontrolliert wird, muss die Produktion und Freisetzung des Prothrombin streng reguliert werden, um das Gleichgewicht zu halten (Danckwardt, Hentze, & Kulozik, 2013).

Es gibt verschiedene Zelltypen, die fähig sind, Thrombin zu produzieren.

Dennoch wird die Hauptproduktion von den Hepatozyten der Leber

übernommen (Davie, Fujikawa, & Kisiel, 1991). Einen weiteren größeren Anteil an der Produktion haben Neuralzell-Linien (Dihanich, Kaser, Reinhard, Cunningham, & Monard, 1991) und Epithelialzell-Linien (Motta et al., 2019). Zusätzlich kommt dem Thrombin während der Entwicklung eine besondere Rolle zu, da eine Vielzahl von Zellen während der embryonalen Entwicklung auch in der Lage ist, Prothrombin zu bilden (W. Y. Sun et al., 1998). Lange ist der Mechanismus der posttranskriptionalen F2 messenger RNA (mRNA) Regulierung unbekannt gewesen und die Hochregulierung der Expression des F2-Gens durch externe Anregung wurde erst kürzlich entdeckt. Im Fall von Zellstress oder Entzündungsprozessen wird p38 Mitogen aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) aktiviert. Diese Kinase nimmt entscheidenden Einfluss auf die mRNA-Expression. Der gesamte Mechanismus basiert auf 3'End-Prozessierung der mRNA. Entscheidend ist dabei ein sogenanntes *upstream sequence element (USE)*. Die p38 MAPK phosphoryliert *Inhibitorproteine Fuse-binding protein 2 (FBP2)* und *Fuse-binding protein 3 (FBP3)* des USE. Diese verlassen daraufhin das USE und ermöglichen somit das Andocken anderer Proteine, die die 3'End-Prozessierung fördern. Mit dem Abschluss der 3'End-Prozessierung kommt es zur Hochregulation der F2-Gen-Expression, wenn bestimmte Einflüsse wie Stress oder Entzündung auf die F2 produzierenden Zellen einwirken (Danckwardt et al., 2011).

### **5.3.3 Molekulare Mechanismen des Thrombinsignalweges**

Neben der wichtigen Funktion in der Gerinnung, kann Thrombin auch Zellabläufe regulieren, indem ein zelluläres bzw. biochemisches Signal erzeugt wird. Dies wird durch Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) ermöglicht. Diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren benötigen Thrombin als Aktivator. Die PARs sind besondere Rezeptoren, da sie ihren passenden Liganden permanent gebunden haben. Dieser ist jedoch maskiert und wird erst durch die Abspaltung einer Schutzgruppe durch Thrombin freigelegt. Die von Thrombin genutzte Spaltstelle befindet sich zwischen der N-terminalen- und C-terminalen-Exodomäne des Rezeptors (Coughlin, 2000). Durch den Spaltprozess am Rezeptor wird ein neuer N-Terminus freigelegt, der dann als voll funktionsfähiger Ligand an den zugehörigen Rezeptor bindet (Vu, Hung,

Wheaton, & Coughlin, 1991). Es können auch zusätzlich weitere externe Agonisten an den Rezeptor binden und eine zelluläre Reaktion auslösen. Dieser Mechanismus ist aber weniger effektiv (J. Chen, Ishii, Wang, Ishii, & Coughlin, 1994; P. J. O'Brien et al., 2000). Im Anschluss an die Entfernung der Schutzgruppe durch Thrombin wird der Rezeptor phosphoryliert, durch Lysosomen prozessiert und abgebaut. Der abgebaute PAR-Rezeptor an der Zelloberfläche wird dann aus einem intrazellulären PAR-Rezeptor-Pool ersetzt, sodass wieder schnell eine erneute Signalübermittlung ermöglicht wird. Allerdings gibt es auch Zelllinien, die nicht über einen solchen intrazellulären Pool verfügen und Ersatz nur über den längeren Weg der Proteinsynthese ermöglichen können (Coughlin, 2000).

Dabei gibt es nicht nur einen PAR-Rezeptor, sondern mehrere. Bis jetzt wurden vier PARs im Menschen und in der Maus entdeckt. Nur PAR1, PAR3 und PAR4 können durch Thrombin gespalten und aktiviert werden (Ishihara et al., 1997; Kahn et al., 1998; Rasmussen et al., 1991; W. F. Xu et al., 1998). PAR2 hingegen wird durch andere Substrate wie Trypsin, VIIa oder Xa aus dem Gerinnungssystem gespalten (Camerer, Huang, & Coughlin, 2000; Molino et al., 1997). Die PAR-Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten im Menschen und in der Maus ist nicht identisch. Während menschliche Thrombozyten PAR1 und PAR4 auf ihrer Oberfläche exprimieren, ist die Oberfläche der Maus-Thrombozyten mit PAR3 und PAR4 ausgestattet (Kahn et al., 1998). PAR1 kann als G-Protein mit G12/13, Gq und Gi interagieren und dadurch das Signal in die Zelle weiterleiten (Barr, Brass, & Manning, 1997; Hung, Wong, Vu, & Coughlin, 1992; Offermanns, Laugwitz, Spicher, & Schultz, 1994). Durch die Rezeptoraktivierung wird Guanosintriphosphat (GTP) in Guanosindiphosphat (GDP) umgebaut. Dies wiederum führt zum Phosphorylierungsprozess der intrazellulären  $\alpha$ -Subuntereinheit. Durch die Aktivierung der  $\alpha$ -Subuntereinheit trennt sich diese in weitere Subuntereinheiten auf (Gieseler, Ungefroren, Settmacher, Hollenberg, & Kaufmann, 2013). Diese  $\alpha$ -Untereinheiten wiederum führen zum Beispiel zu Konformationsänderung der Thrombozyten (Klages, Brandt, Simon, Schultz, & Offermanns, 1999; Offermanns, Mancino, Revel, & Simon, 1997; Vouret-Craviari, Boquet, Pouyssegur, & Van Obberghen-Schilling, 1998) sowie

Sekretion und Aktivierung der Thrombozyten (Offermanns, Toombs, Hu, & Simon, 1997; S. J. Taylor, Chae, Rhee, & Exton, 1991).

PAR1, PAR3 und PAR4 sind alle ähnlich in ihrer Funktion und können Sekretion und Aktivierung der Thrombozyten auslösen, allerdings weisen sie wesentliche Unterschiede bezüglich der Substrataffinität auf. Während PAR1 (im Menschen) und ähnlich dazu PAR3 (in der Maus) eine hohe Affinität zu Thrombin hat und bereits bei nur geringen Thrombinkonzentrationen aktiviert werden kann, hat PAR4 (im Menschen und in der Maus) eine vergleichsweise geringe Affinität und kann nur im Fall von besonders hohen Thrombinkonzentrationen aktiviert werden (Ossovskaya & Bunnett, 2004). Im Falle eines Verlustes der PAR1 Funktion kann PAR4 auch eine Thrombozytenaktivierung auslösen, wenn die Thrombinkonzentration hoch genug ist. Im Gegensatz dazu ist PAR3 nicht fähig, ein Signal in die Zelle zu leiten. Dieser Rezeptor kann lediglich PAR4 in Mäusen aktivieren, wenn die Thrombinkonzentration gering ist und PAR4 noch nicht selbständig arbeiten kann (Coughlin, 2000).

PAR-Signalweiterleitung und entsprechende Thrombinkonzentrationen können auch Einfluss auf die Integrität der Endothelzellbarriere oder auf die Apoptose nehmen. Ist die Thrombinkonzentration niedrig, so kann über PAR-Rezeptoren ein protektiver Effekt auf die Endothelzellbarriere und Zellen im Allgemeinen ausgelöst werden. Mit steigenden Thrombinkonzentrationen verkehrt sich der Effekt durch Kommunikation über PAR-Rezeptoren ins Gegenteil und es kommt zu einer zunehmenden Leckage der Endothelzellbarriere und vermehrt zu Apoptose (Bae, Kim, Park, & Rezaie, 2009; Donovan, Pike, Cotman, & Cunningham, 1997). Zudem kann PAR-Signalübertragung zur höheren Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Endothelzellen führen und die Produktion von weiteren Signalmolekülen erhöhen. Diese können dann Neutrophile und Monozyten mobilisieren. Am Ende können sich Thrombozyten und Leukozyten anheften und zur weiteren Thrombinproduktion beitragen (Palabrica et al., 1992).

Mit steigender Thrombinkonzentration kommt es dann zur Degranulation von Mastzellen und zur Entwicklung eines inflammatorischen Milieus (Cirino et al., 1996).

Zusammenfassend haben PAR-Rezeptoren eine bedeutende Rolle für die Signalübertragung durch Thrombin. Sie ermöglichen viele verschiedene Funktionen. Hauptsächlich regulieren sie Thrombozytenanheftung, -degranulation und -aggregation, aber sie spielen auch eine wichtige Rolle in Prozessen, die Zellbiologie, Endothelzellentwicklung, Endothelzellzusammenhalt und Entzündung regulieren.

#### **5.3.4 Thrombinfunktion**

Thrombin ist ein Schlüsselmolekül der Gerinnung, hat aber darüber hinaus pleiotrope Effekte in vielen anderen Bereichen. Beispiele für die vielfältige Funktion finden sich zum Beispiel in der embryonalen Entwicklung (W. Y. Sun et al., 1998; Xue et al., 1998), Tumorgenese (Falanga, Marchetti, Vignoli, & Balducci, 2003; Palumbo, 2008; Wojtukiewicz, Hempel, Sierko, Tucker, & Honn, 2016) und in entzündlichen Prozessen (D. Chen & Dorling, 2009). Dies erklärt sich durch die Expression von PAR auf nahezu allen Körperzellen (Lanuza et al., 2003; S. R. Macfarlane, Seatter, Kanke, Hunter, & Plevin, 2001; Martorell et al., 2008; Ossovskaya & Bunnett, 2004).

##### **5.3.4.1 Koagulation**

Wie zuvor ausgeführt, hat Thrombin eine wichtige Funktion im Gerinnungsprozess und kann paradoxerweise zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes sowohl zu einem prothrombotischen als auch zu einem antithrombotischen Zustand führen (Griffin, 1995). Die Hauptaufgabe beruht in der Aktivierung von Fibrinogen (FI) zu Fibrin (FIa), um das noch instabile Blutkoagel zu sichern. Zur Optimierung und Unterstützung des Prozesses aktiviert Thrombin FXIII, welcher dann die Fibrinmonomere verbindet und zur weiteren Stabilisierung führt (Fear, Miloszewski, & Losowsky, 1984). Thrombin aktiviert außerdem FXI und die Hilfsfaktoren FV und FVIII zur Amplifikation und weiteren Aktivierung von Prothrombin (Versteeg et al., 2013). Die Hemmung der Fibrinolyse durch Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor (TAFIa) hat Einfluss auf den prothrombotischen Ablauf (Longstaff, 2018).

Im Gegensatz dazu kann Thrombin aber auch durch die Aktivierung von Protein C zu einem antithrombotischen Status beitragen. Protein C inaktiviert in der

Folge FVa und FVIIIa und verhindert damit das weitere Voranschreiten der Gerinnung (F. B. Taylor, Jr., Peer, Lockhart, Ferrell, & Esmon, 2001).

Interessanterweise ist der pro- oder antithrombotische Effekt von Thrombin auch abhängig von der Konzentration und der Freisetzungsrate des Thrombins. Eine langsame Freisetzungsrage führt zu einem antithrombotischen Status mit gesteigerter Blutung, sofern die Endothelzellbarriere intakt ist (Lee, 1962; Quick, Hussey, Harris, & Peters, 1959; Siller-Matula et al., 2010).

#### **5.3.4.2 Angiogenese, Metastasierung und Tumorgenese**

Thrombin wird auch in Verbindung mit Tumoren gebracht. Zwischen den beiden gibt es eine wechselseitige Beeinflussung. Während der Tumor das Risiko für eine venöse Thromboembolie (VTE) steigert (Key et al., 2016; Khalil et al., 2015; Wun & White, 2009), können Thrombin und auch andere Gerinnungsfaktoren das Voranschreiten eines Tumors durch Unterstützung des Tumorwachstums, der Angiogenese und der Metastasierung beschleunigen (Adams et al., 2015; Falanga et al., 2003; Steinbrecher et al., 2010).

Tumorzellen triggern die Gerinnung, indem sie Polyphosphate und Entzündungsmediatoren freisetzen. Diese führen zur Freisetzung von *Tissue Factor (TF)* (Key et al., 2016; Palumbo, 2008; N. Zhang et al., 2016). TF wiederum führt zur Hochregulation der Thrombinbildung. Thrombin selbst ist in den Prozess der Tumormetastasierung involviert. In der experimentellen Hemmung von Thrombin konnte eine signifikante Reduktion der Metastasierung gezeigt werden (Palumbo, 2008; Wojtukiewicz et al., 2016).

Der maligne Einfluss des Thrombins auf Tumore ist neben weiteren Tumorentitäten am besten im Kolorektalkarzinom untersucht. Thrombin beeinflusst beim Kolorektalkarzinom vor allem Tumorgenese, -wachstum und -metastasierung. Allgemein wird das Gerinnungssystem in Zusammenhang mit der Tumorgenese gebracht, da Zustände, die Einfluss auf das Gerinnungssystem haben, wie zum Beispiel Faktor-V-Leiden, das Risiko für ein Kolorektalkarzinom bis zu 6-fach erhöhen (Adams et al., 2015; Steinbrecher et al., 2010; Turpin et al., 2014; Vossen, Hoffmeister, Chang-Claude, Rosendaal, & Brenner, 2011). Dies korreliert mit Befunden auf Zellebene, welche zeigen, dass PAR1 als wichtigster Thrombinrezeptor in bestimmten malignen Tumoren

signifikant höher exprimiert wird (Garcia-Lopez, Gutierrez-Rodriguez, & Herranz, 2010).

#### **5.3.4.3 Entzündung**

Neben dem Einfluss auf Zellproliferation und Tumormalignität hat Thrombin auch einen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen. Dieses wird durch die Gerinnung gestartet. Aktivierte Thrombozyten setzen verschiedene proinflammatorische Mediatoren frei (Chung, Park, Lee, Eo, & Kim, 2010; Gleissner, von Hundelshausen, & Ley, 2008; Koenen et al., 2009; Sachais et al., 2007; Vendrov et al., 2010).

Der Start der Entzündung kann aber nicht nur in den Thrombozyten initiiert werden, vielmehr kann Thrombin auch direkt mit dendritischen Zellen (DC) interagieren. Durch ein über PAR1 übertragenes Signal werden diese durch Thrombin stimuliert ebenfalls Zytokine zu produzieren. Dieses Thrombinsignal führt dann auch zu einer Veränderung der Oberflächenrezeptoren der dendritischen Zellen. Unter anderem werden *Human-Leukozyte-Antigen-Rezeptoren (HLA)-DR* und CD86 auf der Oberfläche hochreguliert. Durch die Aktivierung der dendritischen Zellen werden auch allojenische T-Zellen aktiviert (Kissel et al., 2006; Osugi, Vuckovic, & Hart, 2002; Yanagita, Kobayashi, Kashiwagi, Shimabukuro, & Murakami, 2007).

Darüber hinaus werden weitere Immunzellen wie Leukozyten, Monozyten, natürliche Killer-Zellen und Mastzellen aktiviert, die den entzündlichen Prozess unterstützen und verstärken (Schmaier, 2008). Die zunehmende proinflammatorische Umgebung nimmt Einfluss auf das Gefäßsystem. Durch den Effekt auf die Endothelzellen kann Thrombin die Permeabilität des Gefäßsystems erhöhen und führt somit zur Leckage. Thrombin erhöht ebenfalls *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)* und seinen zugehörigen zellulären Rezeptor. VEGF selbst erhöht die Endothelzellproliferation. Im Endeffekt führt Thrombin durch Stimulation von VEGF zur Amplifikation des Permeabilitätsproblem und gleichzeitig zu einer proangiogenetischen Umgebung (P. Kumar et al., 2009; Petaja, 2011; Rickles, Patierno, & Fernandez, 2003; Rukoyatkina et al., 2009; Tsopanoglou & Maragoudakis, 2004; P. Zhang, Ozdemir, Chung, Robertson, & Dong, 2011). Das Endothel

kann auch den Entzündungsprozess regulieren. Es kann sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte unterstützen (Bombeli, Mueller, & Haeberli, 1997). Im Fall einer intakten Endothelzellschicht überwiegen antiinflammatorische Effekte. Durch das Endothel wird die Thrombinaktivierung reduziert und eine massive Durchwanderung des Endothels durch Leukozyten wird verhindert. Sobald das Endothel beschädigt wird, ändert sich die Situation und es kommt durch die Endothelzellen neben der Produktion von Mediatoren wie Chemokinen (Bevilacqua, Nelson, Mannori, & Cecconi, 1994; Springer, 1990), zur Aktivierung von Prothrombin. Dieses neu generierte Thrombin führt dann zur Aggravation der Entzündung (D. Stern, Nawroth, Handley, & Kisiel, 1985; D. M. Stern, Carpenter, & Nawroth, 1986).

Fast alle proinflammatorischen Effekte des Thrombins werden über PAR1 übermittelt. Es gibt aber auch einige wenige, die über PAR 3 (in der Maus) oder über PAR4 (in der Maus und im Menschen) weitergeleitet werden. Der Signalweg, der über PAR3 übermittelt wird, führt zur vermehrten Herstellung von Interleukin-8 (IL-8) (Garcia, Gulati, & Levy, 2010). Interleukin-8 hat chemotaktische Wirkung über Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen. Zusätzlich werden durch IL-8 auch Monozyten und ihre Adhäsion am Endothel beeinflusst (Gerszten et al., 1999). Verglichen mit anderen Interleukinen, bleibt die IL-8-Konzentration stabil über den Zeitverlauf der Entzündung (Remick, 2005). Thrombin kann ebenfalls Einfluss auf die Bildung von Interleukin-6 (IL-6) in Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen nehmen. IL-6 kann die Entzündung ebenfalls auslösen und steigern. Der Einfluss des Thrombins auf den Entzündungsprozess ist vielfältig, dieser sollte jedoch mit Bedacht betrachtet werden, da einige der genannten Thrombineffekte bisher nur in Zellkulturen untersucht wurden. Die Zellkulturumgebung ist nur bedingt vergleichbar mit der Situation in vivo, da häufig das Zusammenspiel der Thrombininhibitoren nicht berücksichtigt werden kann und nur ein Teil eines komplexen Zusammenspiels abgebildet wird und somit die Realität in vivo ggf. nur bedingt wiedergespiegelt wird (Popovic et al., 2012).

#### **5.3.4.4 Atherosklerose**

Ein weiterer Aspekt von Thrombin auf den Entzündungsprozess betrifft die Atherosklerose. Atherosklerose ist eine Gefäßerkrankung, die durch Gefäßveränderungen durch chronische Entzündungsprozesse entsteht. Die Erkrankung ist hauptsächlich durch Umwelteinflüsse und genetische Risikofaktoren bestimmt (ten Cate, 2012). Allerdings kann Thrombin eine Schlüsselrolle zukommen und den Entwicklungsprozess der Atherosklerose durch Steigerung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren beschleunigen. Die Freisetzung der Entzündungsmediatoren wie Zytokine und Chemokine sowie die Aktivierung verschiedener Zelltypen wie Monozyten, Endothelzellen und vaskuläre glatte Muskelzellen führt insgesamt zur Destabilisierung der Gefäßwand (Borissoff, Spronk, Heeneman, & ten Cate, 2009; Chung et al., 2010; Martorell et al., 2008; Vergnolle, Derian, D'Andrea, Steinhoff, & Andrade-Gordon, 2002). Vor allem die Aktivierung der Monozyten führt zur entscheidenden Auslösung der gefährlichen Plaquebildung (Aukrust et al., 2008; Gerszten et al., 1999). Die Situation wird zusätzlich verschlimmert, da Thrombin auch das für die Atherosklerose pathogenetische Anheften des *Low-Density-Lipoproteins (LDL)* an die glatten Muskelzellen der Gefäßwand fördert und so ebenfalls zur Plaquebildung beiträgt (Ivey & Little, 2008). Es kommt zur ausgeprägten klinisch relevanten Atherosklerose mit Gefahr der Ruptur des Plaques und massiver Thrombozytenaktivierung mit entsprechenden klinischen Konsequenzen (Iwaki, Sandoval-Cooper, Brechmann, Ploplis, & Castellino, 2006).

#### **5.3.5 Extrahepatische Prothrombinexpression und seine Bedeutung**

Neben den großen Mengen an Prothrombin, welche in den Hepatozyten der Leber exprimiert werden, gibt es auch andere Gewebe, die ebenfalls Prothrombin in unterschiedlichen Mengen exprimieren können. Beispiele für solche Gewebe sind vor allem das zentrale Nervensystem (CNS), lymphatisches Gewebe, Nieren, Herz, gastrointestinale Schleimhaut und die Lunge (Dihanich et al., 1991; Ito et al., 2013; Motta et al., 2019; Stapleton, Timme, & Ryall, 1998).

### **5.3.5.1 Zentrales Nervensystem**

Die Bildung von Prothrombin im zentralen Nervensystem spielt eine wichtige Rolle während der embryonalen Entwicklung. Besonders der Cortex und das Cerebellum zeigen extrahepatische F2-Expression. Auch andere Zelllinien des zentralen Nervensystems produzieren Prothrombin. Wahrscheinlich trägt das gebildete Prothrombin zu neuronalen Regulationsprozessen bei, sodass eine protektive Rolle für die Neuronen vermutet werden kann (Dihanich et al., 1991).

### **5.3.5.2 Lymphatisches Gewebe**

Diverse lymphatische Gewebe wie Thymus, Milz, Knochenmark und Lymphknoten zeigen signifikant hohe extrahepatische Prothrombinexpressionen. Die zugrundeliegende Funktion konnte noch nicht eindeutig bestimmt werden (Danckwardt Lab, nicht publiziert).

### **5.3.5.3 Niere**

Prothrombin steht auch in Zusammenhang mit Nierensteinerkrankungen durch Calciumoxalatsteine. Die Steine bilden sich im Harntrakt und führen zu Obstruktionen. Bestimmte Menschen sind dafür anfälliger als andere. Ein Fragment von Prothrombin, welches die Bezeichnung *Urinary Prothrombin Fragment 1 (UPFT1)* trägt, konnte durch die Immunhistochemie in luminalen Zellen des distalen Tubulus dargestellt werden. Dieses Fragment inhibiert die Steinbildung. Neben einer möglichen UPFT1-Quelle durch Prothrombin Fragmente über den durch die Niere verlaufenden Blutstrom, wird in den Nieren selbst Prothrombin hergestellt, welches der Steinbildung entgegenwirkt (Stapleton et al., 1998).

### **5.3.5.4 Herz**

Thrombin als Teil des Gerinnungssystems hat zudem eine wichtige Rolle bei verschiedenen Herzerkrankungen. Zum Beispiel ist bekannt, dass Thrombin Vorhofflattern triggern kann. Neben dem normalen Thrombinanteil, der über den Blutstrom an das Herz geliefert wird, konnte durch Immunhistochemie gezeigt werden, dass es im Herz selbst eine eigene Prothrombin-Expression

durch verschiedene Gewebe gibt. Prothrombin wird im Herzen nicht in allen Anteilen in vergleichbarer Menge produziert. Es wird zwar im Myo-, Endo- und Subendokard des linken Atriums und des linken Ventrikels gebildet, allerdings ist die Menge linken Atrium signifikant höher als im linken Ventrikel (Ito et al., 2013).

#### **5.3.5.5 Darmschleimhaut**

Das Epithel des Kolons setzt bei Zellstress und Entzündung verschiedene Proteasen frei. Aktives Thrombin ist unter diesen Proteasen zu finden und trägt zum Schutz der epithelialen Oberfläche bei. Dabei wird die Prothrombin-Expression durch die Darmflora des Verdauungstraktes reguliert (Motta et al., 2019).

#### **5.3.5.6 Lunge**

Verglichen mit der Niere, dem Herzen, dem Cerebrum und dem Cerebellum ist in der Lunge eine noch höhere F2-Expression zu finden (Danckwardt Labor, nicht publiziert). Die Identifikation der F2 exprimierenden Zellen und die Funktion der spezifischen F2-Freisetzung in der Lunge ist noch nicht eindeutig erforscht und Hauptziel dieser Arbeit.

#### 5.4 Ziel des Projekts

Jenseits der essenziellen Rolle im Gerinnungssystem hat Thrombin einen Einfluss auf entzündliche Prozesse. Über die PAR1- Signalweiterleitung kann Thrombin zur Freisetzung verschiedener Zytokine führen und entscheidend zu einem proinflammatorischen Milieu beitragen (Kissel et al., 2006; Osugi et al., 2002; Yanagita et al., 2007).

Eine solche proinflammatorische Umgebung ist zum Teil auch im Verlauf einer Sepsis gegeben. Sepsis, als weltweites Gesundheitsproblem, führt zu Lungenerkrankung, welche im *Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)* enden kann (Mehaffey et al., 2018). Die Untersuchung einer Prothrombin-Expression in der Lunge kann wesentliche Einblicke in potenzielle therapeutische Strategien während der Sepsis liefern und ggf. in Zukunft eine Veränderung des klinischen Verlaufs herbeiführen. Während die extrahepatische Prothrombin-Expression in der Lunge bereits entdeckt wurde (Danckwardt Labor, nicht publiziert), zielt dieses Projekt darauf ab, den genauen zellulären Ursprung der Prothrombin-Expression im Thorax bzw. in der Lunge zu identifizieren und weitere Erkenntnisse über die möglichen Funktionen einer solchen Prothrombin Expression im Allgemeinen und in Hinblick auf eine Sepsis zu erforschen.

## 6 Material und Methoden

### 6.1 Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
10x TGS	TRIS 0,25M Glycin 1,92M SDS 1% pH 8,6	Western-Blot
10x TBS	Tris 0,2M NaCl 1,5M pH 7,6	Western-Blot
1x TBS-T	10x TBS 10% Tween 20 0,1% pH 7,6	Western-Blot
1x Blotting Puffer	TRIS 48mM Glycin 30mM Methanol 20%Prepro- Prothrombin SDS 0,037%	Western-Blot
Ponceau S	Ponceau S 0,1% TCA 7%	Western-Blot
BAL-Waschpuffer	PBS FBS 2% EDTA 0,5M 0,004%	BAL-Extraktion
IMDEM-AM-Medium	IMDM high glucose ITS 1% OVA (10mg/ml) 2,5% Murine GM-CSF 0,2% Penicillin + Streptomycin 1% (Doxycyclin (10 ug/ml) 0,1%)	AM-Zellkultur
MACS-Puffer	PBS (1x) FBS 0,5% EDTA 2mM	MACS-Sortierung

FACS-Puffer	PBS (1x) FBS 0,5%	FACS-Analyse
RIPA Lysis-Puffer	sodium chlorid 150 mM NP-40 1% sodium deoxycholate 0,5% SDS 1% Tris, 50 mM pH 8.0 1x Protease Inhibitor Water	Protein-Isolierung

## 6.2 Primer

Primer	Sequenz
mAtp2a2-F2	GACAGATGTTGGTGCAATACAAG
mAtp2a2-R2	CAAACATGCGCTGTGAGAAG

## 6.3 Antikörper

Antikörper	Konjugation	Hersteller	Art.-Nr.	Verwendung
Siglec-f-Antibody	Anti-mouse, PE	Miltenyi Biotec Inc.	130-112- 332	MACS- Sortierung
Thrombin-AK	-	Santa-Cruiz Biotechnology	sc-271449	Western-Blot
TLR4-Antikörper (25)	-	Santa-Cruiz Biotechnology	sc-293072	Western-Blot
Anti-Maus-IgG (Gesamtmolekül)- Peroxidase	Peroxidase	SIGMA	A9044- 2ML	Western-Blot

## 6.4 Weitere Materialien

### 6.4.1 Chirurgische Materialien

Material	Hersteller	Art.-Nr
Isofluran	piramal critical care Deutschland GmbH	9714675
Dox Food: M-Z low phyt. +1.000 mg/kg Doxycycline RED [1150 ppm DOX hyclate] 10 mm, sterilis. 25 kGy	Ssniff Spezialitäten GmbH	A115D71004
Nanoabsorbable Braided Silk Suture Size 0	FST	18020-60
Reusable Feeding Needle Gauge 20	FST	18060-20

### 6.4.2 Assays

Material	Hersteller	Art.-Nr
LEGEND MAX Mouse MIF ELISA Kit	biolegend	444107
mouse TNF alpha uncoated ELISA Kit	invitrogen	88-7324-88
Luciferase Assay System	Promega	E1501

### 6.4.3 Zellkultur

Material	Hersteller	Art.-Nr
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	SIGMA	P8139
Lipopolysaccharides from Echericha coli O111:B4	SIGMA	L2630
murine GM-CSF	preprotech	315-03-20UG
Fetal bovine serum (FBS)	gibco	10270-106
ITS supplement	SIGMA	I3146
Albumin from chicken egg white (OVA)	SIGMA	A5503-1G
Penicillin/Streptomycin	gibco	15140-122
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (1x) [-]CaCL2 [-]MgCl2	gibco	14190-094
IMDM high glucose	ATCC	30-2005
EDTA Disodium Salt Solution, 0.5 Molar in Water for Molecular Biology	SIGMA	E7889-100ML
Gelatine	SIGMA	G1393-100ML
Trypanblau-Lösung	SIGMA	T8154
Cell culture Lysis 5x reagent	Promega	E153A
NucBlue Live Cell Stain ReadyProbes reagent	Invitrogen	R37605
SiO2 dust particles		
Carbon nanopowder	SIGMA	633100-25G
Calf Thymus DNA Solution 10 mg 5x 1ml	invitrogen	15633-019
Recombinant Mouse SP_D Protein, CF	R&D Systems	6839-SP-050

#### 6.4.4 MACS-Sortierung

Material	Hersteller	Art.-Nr
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (1x) [-]CaCL2 [-]MgCl2	gibco	14190-094
Fetal bovine serum (FBS)	gibco	10270-106
Anti-PE MicroBeads Ultra Pure 2ml	Miltenyi Biotec Inc.	130-105-639
MidiMACS Seperator	Miltenyi	-
LS Columns	Miltenyi	130-042-401
Pre-Seperation Filters (30um)	Miltenyi	130-041-407

#### 6.4.5 FACS

Material	Hersteller	Art.-Nr
Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS) (1x) [-]CaCL2 [-]MgCl2	gibco	14190-094
Fetal bovine serum (FBS)	gibco	10270-106
Fixable Viability Dye eFluor™ 780	Invitrogen	65-0865-14
FcR Blocking Reagent, mouse	Miltenyi	130-092-575
BV421 anti-mouse CD11c	biolegend	117329
CD11c Monoclonal Antibody (M1/70), PE	Invitrogen	12-0112-82
BV480 Rat Anti-Mouse Siglec-F	BDbioscience	746668
CD64 Monoclonal Antibody PerCP-Fluor 710	Invitrogen	46-0641-82

#### 6.4.6 Western Blot

Material	Hersteller	Art.-Nr
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	biorad	500-0006
Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA	A7030
2-Mercaptoethanol	ROTH	4227.1
TEMED	biorad	161-001
4x Laemmli Sample Buffer	biorad	1610747
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa	ThermoFisher Scientific	26616
TRIS	ROTH	4855.3
Tween 20	ROTH	9127.2
NaCl	ROTH	3957.2
HCL 37	SIGMA	258148-500ML
NaOH 40 %	ROTH	4347.1
Glycin	ROTH	3908.3
cOmplete Protease Inhibitor, Ultra tablets, EDTA free	Roche	6538282001
Milchpulver	ROTH	T145.2
SDS Solution 20%	biorad	161-0418
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	ROTH	3029.1
Methanol >99%	ROTH	8388.1
Sodium desoxycholate	SIGMA	30970-25G
Triton X 100	ROTH	3051.2
Ethanol vergällt >99,8%	ROTH	K928.3
Essigsäure ROTIPURAN 100%, p.a.	ROTH	3738.5
Ponceau S	SIGMA	P3504-10G
Amersham Hybond P 0,045 PVDF Blotting membrane	Amersham	1060029
ECL-Select Western Blotting detection Reagent	Amersham	RPN2235

#### 6.4.7 Genomische PCR

Material	Hersteller	Art.-Nr
miScript SYBR Green PCR Kit	Qiagen	218073
96 PCR Plate Halbrand Flach	Sarstedt	721979102
Heatsealing Film	Eppendorf	30127838

#### 6.4.8 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Art.-Nr
Inject F 1ml	Braun	0166017V
CryoTube Vials	ThermoScientific	377267
Reagiergefäß 1,5ml Safe Seal	Sarstedt	72706400
Multiply-Pro Gefäß 0,2, PP	Sarstedt	72737002
50 cellstar tubes 15ml	greiner-bio-one	188-261-N
Falcon 50ml Polypropylene Conial Tube	Falcon	252070
Cell Strainer 40 um Nylon	Falcon	352340
25 ml serological pipette cellstar	greiner-bio-one	760 180/25ml
10 ml serological pipette cellstar	greiner-bio-one	607 180/10ml
5 ml serological pipette cellstar	greiner-bio-one	606 180/5ml
combitips advanced 5ml	Eppendorf	30089456
VWR Disposable prestle 1,5ml	VWR international	431-0094
Cellculture Micro Plate 96 well, F-Bottom	greiner-bio-one	655182
Cellculture 48-Well, PS, Transparent	greiner-bio-one	677102
Microplate, PS, 96 well, F-Bottom, white	greiner-bio-one	655075
Nunc MaxiSorp™ Flacher Boden	Invitrogen	44-2404-21
96-PCR Platte Halbrand, transparent, high profile	Sarstedt	72.1979.102

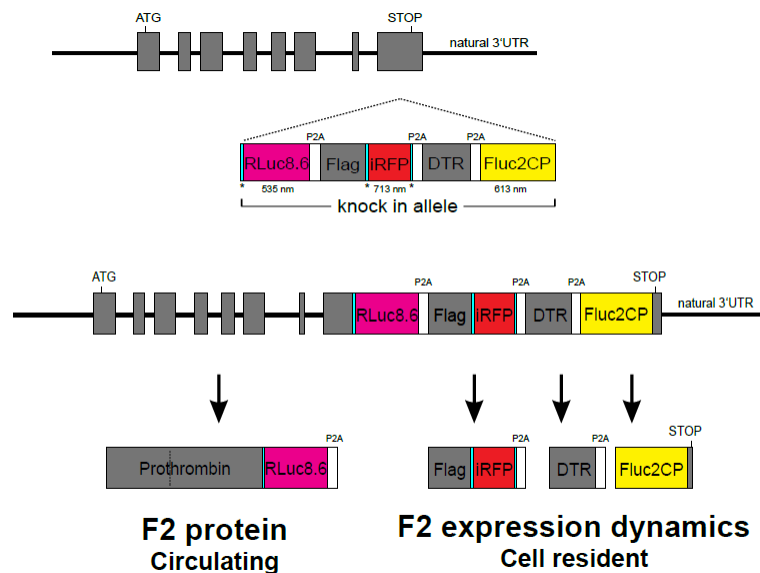
#### 6.4.9 Geräte

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Centrifuge 5424R	Eppendorf
Centrifuge Rotina 420R	Hettich
CS-15R Centrifuge (Plattenzentrifuge)	Beckmann
Mikroskop DMIL	Leica
Sterilwerkbank	HERAsafe Kendro Laboratory Products
Brutschrank	Binder
SW23 Wasserbad	Julabo
ChemiDoc™MP Imaging System	biorad
Standard Power Pack P25	Biometra
Fastblot	Biometra
Multigel	Biometra
GloMax Discover Microplate Reader	Promega
CFX Connect Real Time System	biorad
Flexcycler	Analytik Jena AG
FACSymphony A5	bdbiosciences
ELISA reader azure bisosystems	Biozym

## 6.5 Tiermodelle

### 6.5.1 D-Insight Mausmodell

Das D-Insight (DI) Mausmodell ist durch das Danckwardt-Labor entwickelt (nicht publiziert) und enthält ein knock-in Allel. Dieses dient zur Visualisierung der Prothrombin-Expression über eine Luciferase, welche in den Prothrombin-Locus integriert wird. Das knock-in Allel enthält nicht nur einen Lumineszenz-Reporter, sondern ebenfalls einen weiteren Lumineszenz-Reporter und zusätzlich ein Fluoreszenz-Reporter zur F2-Expressions-Darstellung und -Dynamik durch nicht-invasive Bildgebung. Neben der Renilla-Luciferase (Abbildung 3, RLuc8.6, Pink), Firefly-Luciferase (Abbildung 3, FLuc2CP Gelb) als Lumineszenz-Reporter und iRFP (Abbildung 3, Rot) als Infrarot-Fluoreszenz-Reporter gibt es zusätzlich auch einen *Flag-Tag* (Abbildung 3, Flag) und ein Diphtherie-Toxin (Abbildung 3, DTR) im knock-in Allel für weitere Untersuchungen (Danckwardt Labor, nicht publiziert).

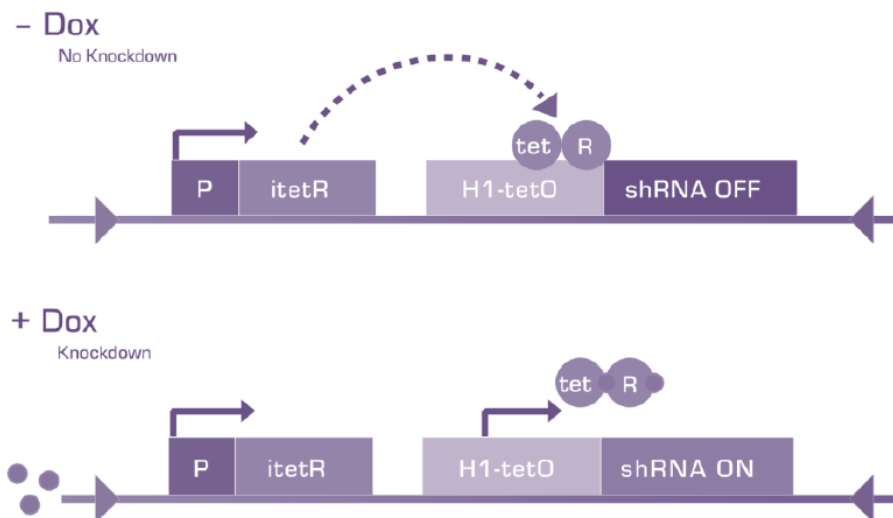


**Abbildung 3: Visualisierung der Prothrombin-Expression über einen Lumineszenz-Reporter sowie einen Fluoreszenz-Reporter in einem transgenen D-Insight Reporter-Mausmodell.**

Das Mausmodell enthält ein Knock-In Allel mit zwei Lumineszenz-Reportern (RLuc8.6 und FLuc2CP) sowie einen Fluoreszenz-Reporter (iRFP) zur Detektion der Prothrombin-Expression und der Sekretionsdynamik (Danckwardt Labor, nicht publiziert).

### 6.5.2 F2-Knockdown (F2-KD) Mausmodell

Das F2-Knockdown (F2KD) Mausmodell beruht auf dem Prinzip induzierbarer RNA-Interferenz (RNAi), durch welche bestimmte Gene gezielt ausgeschaltet werden können. Die mRNA von Prothrombin (F2) kann durch eine *short-hairpin-RNA* (*shRNA*) gezielt abgebaut werden. Die shRNA wird durch den tet-Promotor (H1-tetO) reguliert. Unter normalen Bedingungen wird H1-tetO durch einen Repressor (itetR) gehemmt. In der Konsequenz wird die shRNA nicht gebildet und die Prothrombin-mRNA entsprechend nicht abgebaut. Der Repressor selbst kann aber unter bestimmten Bedingungen durch die Gabe von Doxycyclin (Dox) als Futterzusatz inhibiert werden. Durch das Binden des Doxycyclins an den tet-Repressor kommt es zu dessen Dissoziation vom tet-Promotor (H1-tetO). Durch diesen Mechanismus kann die shRNA gebildet werden, sodass es zum spezifischen Knock-down des Prothrombins (F2) kommt (Danckwardt Labor, nicht publiziert).

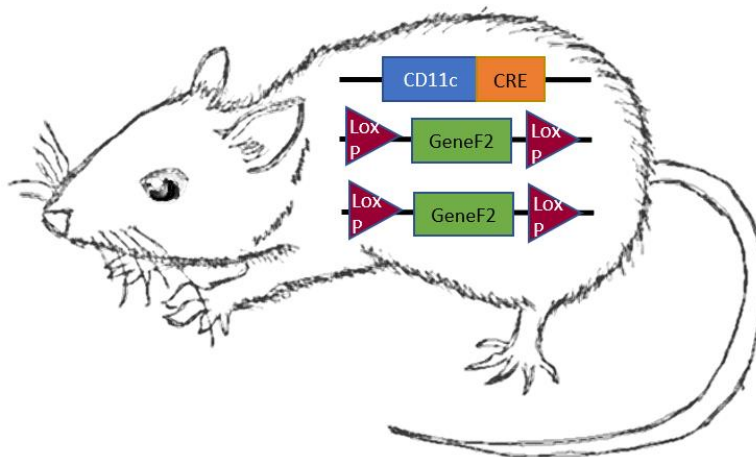


**Abbildung 4: Doxycyclin führt zum Abbau der mRNA von Prothrombin im F2KD Mausmodell.**

Der F2-Knockdown ist abhängig von der Doxycyclin-Gabe als Futterzusatz. Doxycyclin inhibiert den zuerst gebildeten Repressor (itetR), welcher dann nicht mehr an den Promotor (H1-tetO) der *short-hairpin-RNA* (*shRNA*) binden kann. Durch das Aufheben der Inhibition kann die shRNA gebildet werden. Diese bindet gezielt an die mRNA von Prothrombin und führt zu deren Abbau (Danckwardt Labor, nicht publiziert).

### 6.5.3 CD11c-CRE Mausmodell

Das CD11c cre Mausmodell ist ein spezifisches Knock-out Mausmodell, in welchem speziell Prothrombin (F2) in Zellen mit dem Oberflächenmarker CD11c ausgeschnitten wird. Die cre-Rekombinase ist eine Genschere. Sie kann F2 als Zielgen entfernen, wenn dieses durch Rekombinase-Stellen am Anfang bzw. am Ende gekennzeichnet ist. Als Rekombinase-Stellen dienen sogenannte LoxP Stellen. Damit die cre-Rekombinase F2 nicht ubiquitär ausschneidet, ist ihre Expression an die Expression des Oberflächenmarkers CD11c gekoppelt. Da Alveolarmakrophagen CD11c besitzen und nur wenige andere Zellen CD11c positiv sind, bietet dieses Modell einen Prothrombin knock-out, der fast nur die Lungen betrifft.



**Abbildung 5: Die cre-Rekombinase ermöglicht einen Prothrombin-Knockout in CD11c exprimierenden Zellen.**

Für den spezifischen F2 knock-out in der Lunge ist die cre-Rekombinase an die Expression des Alveolarmakrophagen Oberflächenmarker CD11c gebunden. LoxP Seiten werden als Rekombinase-Stellen zum Herausschneiden von F2 durch die cre Rekombinase benötigt (Probst- und Danckwardt-Labor, nicht publiziert).

## 6.6 Bronchioalveolarlavage Extraktion

Zur Gewinnung von Bronchioalveolarlavage (BAL-Fluid) werden die Mäuse mit Isofluran euthanasiert. Der notwendige zweite Schritt erfolgt durch Ausbluten nach Leberschnitt.

Aufgrund der geringen Zellgewinnung wird das BAL-Fluid gepoolt. Abhängig vom nachfolgenden Versuch variiert die Anzahl der gepoolten Mäuse. Zur Gewinnung von ca. einer Millionen Zellen für Zellkulturexperimente werden sieben Mäuse pro Versuchsgruppe gepoolt. Für die Proteinextraktionen mit nachfolgendem Western-Blot-Verfahren werden pro Versuchsgruppe jeweils drei Mäuse benötigt.

Nach dem Erlöschen der Schnappatmung werden die Reflexe überprüft. Sobald diese ausbleiben, wird die Thorax- und Abdomenregion freigelegt.

Nach Entfernung der ventral liegenden Speicheldrüsen wird die Trachea mit Hilfe von leicht gebogenen Pinzetten befreit und mit einem Faden umschlungen. Ein Knoten zur späteren Abdichtung wird vorgelegt. Nach stabiler Fixierung der Trachea, wird diese mit einem Einschnitt, der ca. ein Drittel des Durchmessers der Trachea umfasst, eröffnet. Es folgt die Einführung der Schlundsonde in die eröffnete Trachea. Zur Abdichtung wird der vorgelegte Knoten über der Sonde vorsichtig zugezogen.

Es folgt der Anschluss einer 1ml-Injektions-Spritze mit 0,9 ml BAL-Waschpuffer mit nachfolgender Injektion der Flüssigkeit in die Lunge. Zur Verteilung und Durchmischung der Flüssigkeit in der Lunge wird der Thorax vorsichtig mit dem stumpfen Ende einer Pinzette ca. zehn Mal komprimiert. Die Flüssigkeit wird wieder in die Spritze zurückgezogen und in einem 50 ml Reagiergefäß auf Eis gesammelt. Bei Aspiration der Flüssigkeit kommt es zu einem geringen Flüssigkeitsverlust. Statt der injizierten 0,9 ml werden durchschnittlich 0,7 ml zurückgewonnen. Pro Maus erfolgen sechs Waschvorgänge. Zur späteren Kontrolle der Maus-Linie wird von jeder Maus ein Teil der Leber mit entfernt und bei -80°C eingefroren.

Nach Abschluss der Waschvorgänge wird das gepoolte BAL-Fluid für 15 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Die Zellen werden in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und ausgezählt.

## 6.7 Zellzählungen

Die Zellen werden in der Neubauer-Zählkammer untersucht. Zur Vorbereitung werden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt. 10 µl dieser Mischung werden dann in die mit einem Deckglas fixierte Neubauer-Kammer appliziert. Die im Mikroskop sichtbaren 4 Quadrate mit einem Volumen von  $10^{-4}$  ml werden ausgezählt. Zur Berechnung wird folgende Formel verwendet:

$$\text{Zellzahl} = \frac{x}{\text{Quadratanzahl}} * \text{Verdünnung Trypanblau} * \text{Kammerfaktor} * \text{Endvolumen}$$

Diese ist bei Einsetzen der im Versuch verwendeten Bedingungen äquivalent zu folgender Formel:

$$\text{Zellzahl} = \frac{x}{4} * 2 * 10000 * 1$$

## 6.8 Sortiermethoden

### 6.8.1 Magnetic Cell Separation (MACS)-Sortierung

Zur Gewinnung der Siglec f+ Alveolarmakrophagen wird das *Magnetic Cell Separation (MACS)*-Sortierungssystem von Miltenyi verwendet.

Nach BAL-Extraktion wird die BAL-Suspension für 15 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Die Zellen werden mit MACS-Waschpuffer resuspendiert. Es erfolgt die Auszählung der Zellen. Für eine optimale MACS-Sortierung werden ca.  $10^6$  Zellen benötigt. Zur Entfernung von Aggregaten und größeren Partikeln werden die Zellen durch ein *Pre-Separation Nylonnetz* gegeben. Die gefilterte Suspension wird erneut für 10 min 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Die Zellen werden in 45 µl MACS-Puffer resuspendiert. Im Anschluss werden 5 µl Anti-siglec-f-PE Antikörper hinzugegeben. Nach gründlicher Durchmischung wird die Suspension zur Inkubation für 10 min bei 2-8°C in den Kühlschrank gestellt. Nach Ablauf der Zeit werden 1-2 ml MACS-Puffer hinzugegeben. Es wird erneut für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 80 µl MACS-Puffer resuspendiert und es werden 20 µl *Anti-PE Microbeads Ultra Pure* hinzugefügt. Die Suspension wird erneut bei 2-8°C im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgt die Hinzugabe von 1-2 ml MACS-Puffer und Zentrifugation bei 300 x g. Der Überstand wird aspiriert und das Pellet in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die LS-Säulen werden im MACS-Separator befestigt und mit 500 µl MACS-Puffer vorgespült. Sobald die Flüssigkeit durchgelaufen ist, wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben und der Durchfluss mit unmarkierten Zellen wird in einem 50 ml Reagiergefäß aufgefangen. Die Säule wird insgesamt drei Mal mit MACS-Puffer gewaschen. Danach wird die Säule aus dem magnetischen Separator getrennt und auf ein 15 ml Reagiergefäß gestellt. Die Säule wird nun mit 1 ml MACS-Puffer ausgewaschen zur Ablösung der gelabelten Zellen. Diese werden im Anschluss mit der Neubauer-Kammer ausgezählt.

### 6.8.2 Flow Zytometrie/ Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Nach Gewinnung des BAL-Fluids aus den Mäusen wird die Suspension drei Mal mit FACS-Puffer gewaschen und jeweils für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wird im Anschluss für die Flow Zytometrie vorbereitet. Die folgende Tabelle enthält das Staining in *Phosphate Buffered Saline (PBS)* für ein Volumen von 2500 µl.

<b>Marker/Antikörper</b>	<b>Fluoreszenz-Kanal</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verwendetes Volumen</b>
APC-Cy7 (Fixable Viability Dye eFluor™ 780)	-	1:1000	2,5 µl
FcR Blocking Reagent, mouse	-	1:100	25 µl
CD11c	BV421 (Violet)	1:500	5 µl
Siglec f	BV480 (Violet)	1:500	5 µl
CD64	BB710 (Blau)	1:500	5 µl
CD11b	PE (Gelbgrün)	1:500	5 µl

Nach intensiver Durchmischung wird die Suspension für 60 min inkubiert. Im Anschluss wird erneut drei Mal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Messung erfolgt am FACSymphony A5.

## **6.9 Zellkultur**

Die Zellkultur wurde vorrangig für Stimulations-Tests für Luciferase-Assays, MIF-Assays und TNF $\alpha$ -Assays durchgeführt.

Nach BAL-Extraktion und Zellzählung in der Neubauerkammer wurden abhängig vom nachfolgenden Assay unterschiedliche Anzahlen von Zellen ausgesät.

### **6.9.1 Gelatine-Pre-Coating**

Unabhängig davon werden alle Zellkulturplatten (Cellculture Micro Plate 96 well, F-Bottom) aufgrund der geringeren Adhärenz von Alveolarmakrophagen mit einer Gelatine Beschichtung vorbehandelt. Hierfür wird die Gelatine 1:10 mit dem verwendeten Zellkulturmedium verdünnt. Pro Well werden 150  $\mu$ l der Gelatine-Verdünnung appliziert. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C kann die Gelatine-Suspension abgesaugt werden. Die Zellkulturplatte ist dann gebrauchsfertig.

### **6.9.2 Zellkultur für Luciferase-Assays**

Für Luciferase-Assays werden D-Insight Gesamt-BAL-Zellen und MACS-sortierte D-Insight Siglec f+ Zellen, sowie jeweils auch Wildtyp (B6)-Zellen, mit einer Zellzahl von 20000/Well in 96er-Zellkulturplatten ausgesät. Der Versuch wird pro Versuchsgruppe in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen werden für 24h bei 37°C inkubiert. Der Zellkulturüberstand wird abgesaugt. Die Zellen werden mit Hilfe des *Cell culture Lysis 5x Reagent* lysiert. Pro Well werden dabei 125  $\mu$ l 1x Lysereagenz appliziert. Es folgt eine Inkubation von 5 min. Im Anschluss werden die Zellen zusätzlich mit Ultraschall (2x 10 Zyklen) auf Eis behandelt. Das Lysat wird in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und für 15 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Lysate werden direkt für Luciferase-Assays verwendet oder können bei -80°C eingefroren werden.

### **6.9.3 Zellkultur für MIF-Assays**

Die Wildtyp Gesamt-BAL-Zellen und die CD11c cre BAL-Gesamt-Zellen werden nach Extraktion mit einer Zellzahl von 20000/Well in einer 96er-Zellkulturplatte

mit 200 µl Zellkulturmedium ausgesät. Der Versuch wird pro Versuchsgruppe und Behandlung in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen werden für 24h bei 37°C inkubiert. Es folgt eine Stimulation der Zellen für 24h mit LPS, wobei die Hälfte der Wells pro Versuchsgruppe als Kontrolle dienen und mit PBS behandelt werden. Es werden 100 µl LPS (100 ng/ml) bzw. 100 µl PBS pro Well appliziert. Zusätzlich werden pro Well jeweils 100 µl Medium hinzugegeben. Nach Ablauf der Stimulationszeit wird der Überstand in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Die in der Zellkulturplatte verbliebenen Zellen werden pro Well mit 50 µl NucBlue Reagenz behandelt. Nach einer Inkubation von 20 min wird das Fluoreszenzsignal gemessen und zur späteren Normalisierung der Ergebnisse verwendet.

#### **6.9.4 Zellkultur für TNF $\alpha$ -Assays**

Die Wildtyp Gesamt-BAL-Zellen und F2KD-Gesamt-BAL-Zellen werden aufgrund der Sensitivität des Assays nach Extraktion mit einer Zellzahl von 150000/Well in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Extraktion erfolgt in diesem Fall nach in vivo Behandlung der Tiere mit Doxycyclin-Futter für 14 Tage. Der Versuch wird pro Versuchsgruppe und Behandlung in Triplikaten durchgeführt. Die Zellen werden für 24h bei 37°C mit 260 µl Zellkulturmedium mit Doxycyclin inkubiert. Es folgt eine Stimulation der Zellen für 24h je zu einem Drittel bezogen auf die Anzahl der Wells mit LPS, Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)+LPS oder PBS.

Es werden 130 µl LPS (100 ng/ml), 130 µl PMA+LPS (100 ng/ml) oder 130 µl PBS pro Well appliziert. Zusätzlich werden pro Well jeweils 130 µl Zellkulturmedium mit Doxycyclin hinzugegeben. Nach Ablauf der Stimulationszeit wird der Überstand in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und bei -80°C eingefroren. Die in der Zellkulturplatte verbliebenen Zellen werden pro Well mit 50 µl NucBlue Reagenz behandelt. Nach einer Inkubation von 20 min wird das Fluoreszenzsignal gemessen und zur späteren Normalisierung der Ergebnisse verwendet.

### 6.9.5 Zellkultur-Stimulation

D-Insight und Wildtyp Gesamt-BAL-Zellen werden mit einer Zellzahl von 100000/Well in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät und für 24h bei 37°C inkubiert. Der Versuch wird pro Versuchsgruppe und Stimulation in Triplikaten durchgeführt. Das Medium wird abgesaugt und je 130 µl der einzelnen Stimulatoren bzw. 130 µl PBS als Kontrolle appliziert. Zusätzlich werden 130 µl Zellkulturmedium hinzugegeben.

<b>Stimulation</b>	<b>Konzentration</b>
MIF	5 µg/ml
Siliciumdioxid (SiO <sub>2</sub> )	10 µg/ml
Carbon Nanopartikel (CNP)	0,4 µg/ml
DNA	1 µg/ml
RNA	1 µg/ml
Surfactant Protein D (SFTPD)	5 µg/ml

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 24h wird der Zellkulturüberstand abgesaugt. Die Wells werden mit PBS gespült. Die Zellen werden mit Hilfe des *Cell culture Lysis 5x reagent* lysiert. Pro Well werden dabei 125 µl 1x Lysereagenz appliziert. Es folgt eine Inkubation von 5 min. Im Anschluss werden die Zellen zusätzlich mit Ultraschall (2x 10 Zyklen) auf Eis behandelt. Das Lysat wird in 1,5 ml Reagiergefäße überführt und für 15 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Lysate werden direkt für Luciferase-Assays verwendet oder können bei -80°C eingefroren werden.

## 6.10 Luciferase-Assay

Zelllysate von D-Insight und Wildtyp-Gesamt-BAL-Zellen und Siglec-f-BAL-Zellen werden verwendet. Zusätzlich wird zur Kontrolle der Methode pro Messreihe eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10000 eines Leberlysats mit 0,7 g Leber/ml Lysatreagenz mitgeführt. Der Versuch wird pro Versuchsgruppe und Messpunkt mit Triplikaten ausgeführt. Es wird das Luciferase Assay System (Promega) benutzt. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben. Die Messung der Luciferase wird in einer weißen 96-Well Platte (Microplate, PS, 96 well, F-Bottom, white) durchgeführt. Pro Well werden 20 µl Lysat appliziert. Die Messung erfolgt im *GloMax Microplate Reader (Promega)*, dabei werden pro Well 100 µl des Luciferase Assay System Reagenz über den integrierten Injektor appliziert. Dies ermöglicht eine direkte Messung und Erfassung des schnell abfallenden Luciferase-Signals nach Kontakt mit dem Reagenz. Die Integrationszeit beträgt 10 s.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird der Anteil genomischer DNA in den Lysaten der Bronchioalveolarlavage und der Leber über eine genomische PCR mit Hilfe von miScript SYBR Green (Quiagen) bestimmt. Das Luciferasesignal der Proben wird ins Verhältnis zum Anteil der genomischen DNA gesetzt. Die Durchführung des miScript SYBR Green Verfahrens ist in Abschnitt 6.12.1 erläutert.

## 6.11 ELISA

### 6.11.1 Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF) Assay

Die *Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF)*-Konzentrationen aus Zellkulturüberstand werden mit Hilfe des *LEGEND MAX Mouse MIF ELISA Kits* gemessen. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben. Pro Versuch werden Standardkonzentrationen und Proben in Duplikaten ausgeführt.

Das Kit enthält vorbehandelte Mikroplatten-Strips mit je 8 Wells. Abhängig von der verwendeten Anzahl der Proben plus Standard müssen entsprechende Strips im passenden Halter befestigt werden. Pro Well werden 50 µl Puffer B appliziert. Es folgen 50 µl Standard oder Probe. Die Wells werden mit einer Plastikfolie verschlossen. Die Platte inkubiert für 2 Stunden auf einem Plattenrotierer bei 200 rpm.

Im Anschluss wird der Inhalt der Wells verworfen und die Platte mindestens 4-mal mit ca. 300 µl/Well 1x Waschpuffer gewaschen. Die Platte wird zum Entfernen des Waschpuffers mehrfach auf Papier ausgeschlagen.

Pro Well werden im nächsten Schritt 100 µl *Mouse MIF Detection Antibody* hinzugefügt. Die Platte wird erneut verschlossen. Die Inkubation erfolgt eine Stunde unter ständiger Bewegung. Im Anschluss wird der Inhalt verworfen.

Es muss erneut 4-mal gewaschen werden. Nach dem Ausklopfen werden pro Well 100 µl Avidin-HRP Lösung pipettiert. Die Platte wird verschlossen und inkubiert für 30 min unter ständiger Bewegung. Der Inhalt wird erneut verworfen. Es wird 5-mal mit 300 µl/Well 1x Waschpuffer gewaschen.

Dann werden 100 µl *Substrat Solution F* pro Well hinzugefügt. Die Inkubationszeit beträgt 15 min. Entsprechend der enthaltenen Menge MIF färbt sich das Well in einer intensiveren oder weniger intensiven blauen Farbe. Um die Reaktion zu stoppen werden 100 µl *Stopp Solution* hinzugefügt. Die Absorption wird bei 450 nm innerhalb von 20 min mit Hilfe des *ELISA Readers* von Biozym gemessen. Die gemessenen Konzentrationen werden mit den Ergebnissen der NucBlue Messung aus der Zellkultur normalisiert.

### 6.11.2 Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ ) Assay

Die *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )*-Konzentrationen aus Zellkulturüberstand werden mit Hilfe des *mouse TNF alpha uncoated ELISA Kit* (Invitrogen) gemessen. Die Durchführung erfolgt gemäß Herstellerangaben. Zur Detektion von TNF $\alpha$  wird die 96-Well-ELISA Platte (Nunc MaxiSorp™ flacher Boden, Invitrogen) vorbehandelt. Pro Well werden 100  $\mu$ l *Capture Antibody* (1:250 in *Coating Puffer*) pipettiert. Die Platte wird mit Folie verschlossen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der Inhalt der Wells wird im Anschluss entfernt. Die Wells werden 4-mal mit 300  $\mu$ l/Well Waschpuffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wird die Platte zur Entfernung aller Flüssigkeitsreste auf Papier ausgeschlagen. Zum Blocken werden pro Well 200  $\mu$ l 1x *ELISA/ELISPOT Diluent* pipettiert.

Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde unter ständiger Bewegung bei Raumtemperatur. Es folgt ein Waschschrift. Die Verdünnung des Standards in *ELISA/ELISPOT Diluent* wird durchgeführt. Alle Standardverdünnungen und Proben werden in Duplikaten gemessen. Es werden je Standard oder Probe 100  $\mu$ l/ Well appliziert. Die Platte wird zur Maximierung der Sensitivität über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wird erneut vier Mal gewaschen. Es werden 100  $\mu$ l *Detection-Antibody* (1:250 in *ELISA/ELISPOT Diluent*) hinzugefügt. Die Platte wird für eine Stunde bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert. Es folgen erneut vier Waschschrift. Pro Well werden 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP (1:100 in *ELISA/ELISPOT Diluent*) pipettiert. Die Platte wird verschlossen und für 30 min unter ständiger Bewegung inkubiert. Der folgende Waschschrift wird 6-mal ausgeführt. Im Anschluss werden 100  $\mu$ l/Well 1x *TMB-Solution* hinzugefügt und für 15 min inkubiert. Zur Verhinderung weiterer Reaktionen werden 100  $\mu$ l/Well *Stopp Solution* dazugegeben. Das entstandene Farbspektrum wird bei 450 nm mit Hilfe des *ELISA Readers* (Biozym) ausgelesen. Die Ergebnisse werden mit den NucBlue Ergebnissen aus der Zellkultur normalisiert.

## 6.12 Molekulare Methoden

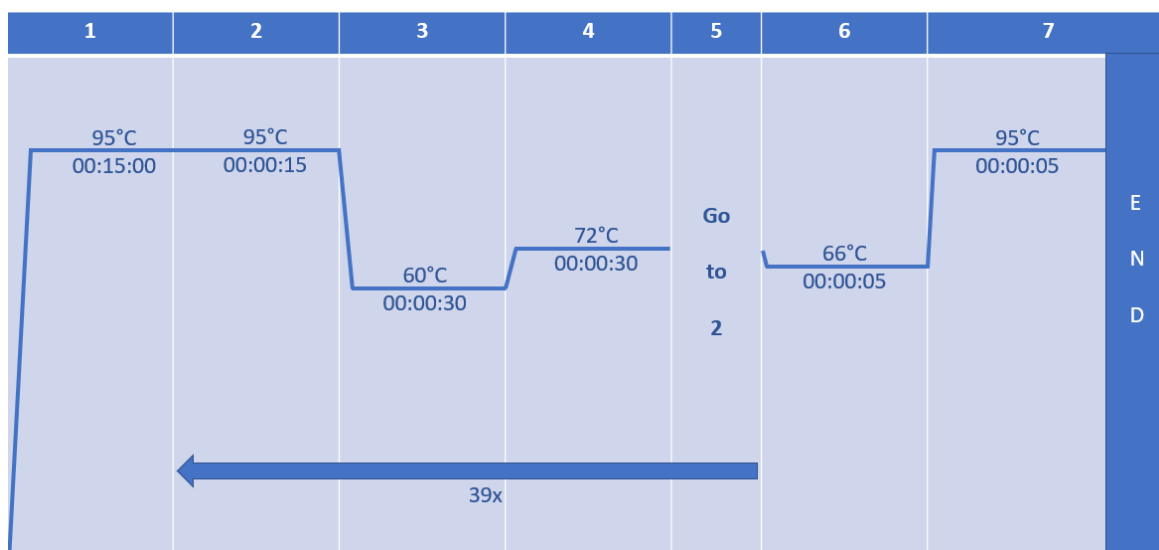
### 6.12.1 Genomic PCR

Für die Messung der genomischen DNA wird miScript SYBR Green (Qiagen) verwendet. In einer 96 Well Platte (96-PCR-Platte Halbrand, transparent, high profile) werden 15 µl Mastermix zu 5 µl Lysat pipettiert.

Mastermix (1x):

Reagenz	Volumen
miScript SYBR Green	10 µl
Primer forward (mAtp2a2-F2)	0,6 µl
Primer reverse (mAtp2a2-R2)	0,6 µl
Wasser	3,8 µl

Alle Proben werden in Duplikaten gemessen. Nach dem Pipettieren wird die Platte mit Folie thermisch verschlossen. Die Platte wird gemischt und anschließend für eine Minute mit einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Das fluoreszierende miScript SYBR Green wird bei Bindung an DNA durch *biroRad real time PCR* detektiert. Der Analysezyklus ist im Folgenden abgebildet.



**Abbildung 6: Zyklen des vollautomatisierten Verfahrens zur Quantifizierung genomischer DNA.**

Auswertung und Analyse erfolgt mit dem CFX Connect Manager.

### 6.12.2 Protein Isolierung

Die Zellen nach BAL-Extraktion werden mit eiskaltem PBS gewaschen und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 100 µl eiskaltem Ripa-Lyse-Puffer gelöst und für 30 min unter mehrmaligem Mischen auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird für 20 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Dadurch kommt es zur Auftrennung in drei Phasen. Die unterste Schicht enthält das Pellet aus Zellresten. Die oberste Schicht enthält Lipide. Zwischen beiden Schichten befinden sich die Proteine. Diese werden in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt und bei -80°C gelagert.

### 6.12.3 Bradford-Assay

Die Proteinkonzentration wird mit Hilfe des Bradford-Assays gemessen. Zur Herstellung einer Standardkurve wird mit *Bovin Serum Albumin (BSA)* 2 µg/µl eine Verdünnungsreihe mit Ripa-Lyse-Puffer (1:20) hergestellt. Die Proteinlysate werden ebenfalls 1:20 verdünnt. Alle Proben und Standards werden in Triplikaten gemessen. Es werden 10 µl Standard oder Probe in eine flache, transparente 96-Well-Platte pipettiert. Im Anschluss wird 200 µl/Well 1:5 verdünntes *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Biorad) hinzugefügt. Zur vollständigen Reaktion wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung inkubiert. Die Proteinkonzentration wird bei 595 nm mit Hilfe des *ELISA Reader* (Biozym) ermittelt.

### 6.12.4 Western Blot

Zur Darstellung der Proteine werden diese in einem ersten Schritt elektrophoretisch über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt. Dabei laufen die aufgetragenen Proteine (30 µg oder 50 µg, vorbereitet mit NuPAGE/Laemmli und β-Mercaptoethanol) zuerst durch ein Sammelgel und anschließend durch ein Trenngel.

Sammelgel (1x):

Reagenz	Volumen
MQ-Wasser	2395 $\mu$ l
30% acryl/bis (37.5:1)	560 $\mu$ l
1.5M Tris (pH 6.8)	1000 $\mu$ l
20% SDS	20 $\mu$ l
TEMED	5 $\mu$ l
10% APS	20 $\mu$ l

Trenngel (1x, 8ml, 8%):

Reagenz	Volumen
MQ-Wasser	3775 $\mu$ l
30% acryl/bis (37.5:1)	2135 $\mu$ l
1.5M Tris (pH 8.8)	2000 $\mu$ l
20% SDS	40 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l
10% APS	40 $\mu$ l

Das Gel wird in der Multigel-Kammer eingespannt und die Kammer wird mit 1x TGS-Lauf-Puffer gefüllt. Nach Entfernung aller vorhandenen Luftblasen und Befüllung der Wells mit dem Marker (*PageRuler Prestained Protein Ladder*, 10 bis 180 kDa) und den Proben wird die SDS-Page mit 25 mA/Gel für zwei Stunden gestartet. Nach Ablauf der Zeit bzw. Durchlauf der Proben wird das Gel mit den nun aufgetrennten Proteinen in das Blot-Transfer-Gerät überführt. Zum Transfer werden drei Filterpapiere, die Polyvinyliden (PVDF)-Membran (Amersham Hybond P 0,045 PVDF Blotting membrane), das Gel und erneut drei Filterpapiere aufeinandergestapelt. Die Membran wird zuvor für zwei Minuten in Methanol aktiviert und anschließend im 1x Blotting Puffer gespült. Die Filterpapiere werden ebenfalls zuvor im 1x Blotting Puffer getränkt. Das Blot-Transfer-Gerät wird verschlossen und zusätzlich beschwert. Der Transfer wird bei 0,5 mA/cm<sup>2</sup>, wobei 50 mA nicht überschritten werden sollten, für 1,5 Stunden gestartet. Nach Ablauf des Transferprozesses wird die Membran in

destilliertem Wasser gespült. *Ponceau S Staining* wird genutzt, um die gleichmäßige Proteinladung zu verifizieren. Nach Entfernung des Ponceau S mit *Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)* wird die Membran zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 30 min in 5% Milch in TBS-T inkubiert. Die Bindung des primären Antikörpers (AK) in 5% Milch in TBS-T erfolgt über Nacht. Die Membran wird drei Mal für fünf Minuten in TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem sekundären AK in 5% Milch in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die AK werden in folgenden Konzentrationen genutzt.

F2-Darstellung:

	<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Primärer AK</b>	Thrombin-AK	1:1000
<b>Sekundärer AK</b>	Anti-Mouse	1:5000

TLR4-Darstellung:

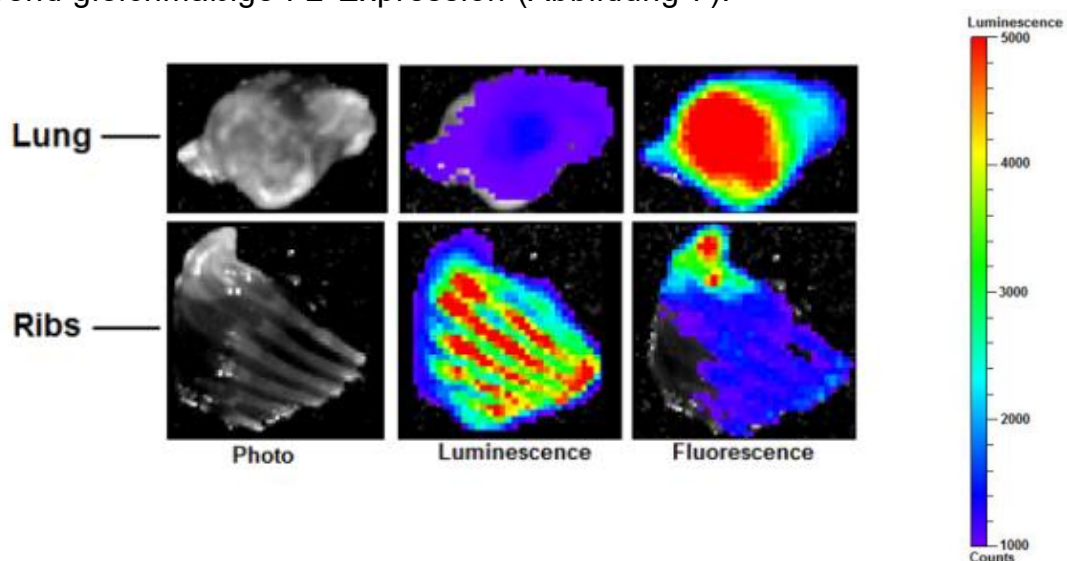
	<b>Antikörper</b>	<b>Konzentration</b>
<b>Primärer AK</b>	TLR4-Antikörper	1:1000
<b>Sekundärer AK</b>	Anti-Mouse	1:5000

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Membran erneut drei Mal gewaschen. Es erfolgt die Detektion des Proteinsignals über *ECL-Select Western Blotting detection Reagent* im ChemiDoc Imaging System.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 Identifikation des zellulären Ursprungs der F2-Expression in der Lunge bzw. im Thorax

Die Versuche zur Identifikation der F2 exprimierenden Zellen in der Lunge bzw. des Thorax basieren auf bestehenden Daten des Danckwardt-Labors. Bei der Suche nach extrahepatischer Thrombin-Expression wurde mit Hilfe des *IVIS Spektrum Imaging Systems* durch eine nicht-invasive in vivo Bildgebung in D-Insight-Mäusen die an Lumineszenz-Reporter gekoppelte Expression von F2 in verschiedenen Organen dargestellt. Die Ablichtung der Lunge und der Rippen ex vivo zeigt sowohl in Biolumineszenz als auch in Fluoreszenz eine annähernd gleichmäßige F2-Expression (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Die Lungen und Rippen verfügen über eine extrahepatische F2-Expression.**

Unter den möglichen Zellen, die Ursprung einer solchen Expression sein könnten, sind die Alveolarmakrophagen aufgrund bisheriger wissenschaftlicher Erkenntnisse die wahrscheinlichste Quelle. Sie sind vielfältig in ihrer Funktion und tragen entscheidend zu pro- und antiinflammatorischen Prozessen in der Lunge bei. Ihr Anteil am Bronchioalveolarlavage (BAL) ist nicht unerheblich und die genaue Zusammensetzung der BAL als Anteil des Lungenkompartments ist wichtig zum Verständnis der gewonnenen Ergebnisse. Zur Untersuchung der BAL werden Oberflächenmarker der Zellen genutzt (Abbildung 8).

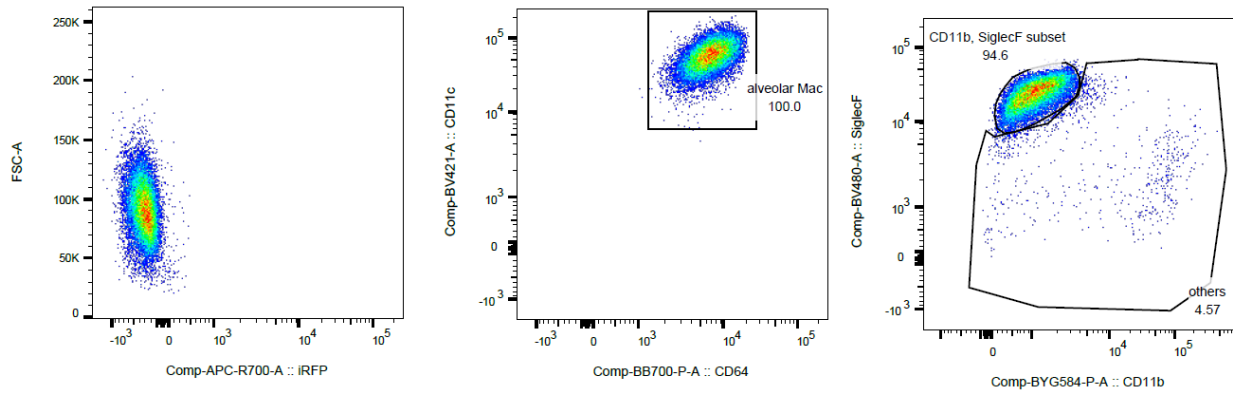
Alveolarmakrophagen sind vor allem durch den Oberflächenmarker Siglec f gekennzeichnet. Dieser ist jedoch nicht einzigartig für Alveolarmakrophagen. Neben Alveolarmakrophagen verfügen eosinophile Granulozyten ebenfalls über diesen Oberflächenmarker. Ihre Anzahl in der Bronchioalveolarlavage ist allerdings zu vernachlässigen. Der Anteil der Alveolarmakrophagen wird mit ca. 94% angegeben. Lungenschädigende Faktoren können den prozentualen Anteil aber deutlich vermindern (Blaschke, Eklund, Skog, & Danielsson, 1985). Eigene Analysen als Ausgangsvoraussetzung für alle folgenden Versuche zeigen einen prozentualen Anteil von 94,6% an der gesamten BAL (Abbildung 9).

**PHENOTYPES OF MYELOID CELLS IN THE NORMAL MOUSE LUNG**

Marker	Eosinophils	Neutrophils	Plasmacytoid DCs	CD103 <sup>+</sup> DCs	CD11b <sup>+</sup> DCs	AM	IM	Ly6C <sup>+</sup> Mo/MΦ	Ly6C <sup>-</sup> Mo/MΦ
1 CD45	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2 CD11b	+	+	-	-	+	-	+	+	+
3 CD11c	-	-	±	+	+	+	+	-	±
4 CD24	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5 CD64	-	-	-	-	-	+	+	±	±
6 Ly6C	-	±	+	-	±	-	-	+	-
7 MHC II	-	-	±	+	+	±	+	-	-
8 CD14	-	-	NT	-	±	±	+	-	-
9 CD36	-	-	NT	+	±	+	+	±	-
10 CD103	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11 CD206	-	-	-	-	±	+	±	-	-
12 Siglec F	+	-	-	-	-	+	-	-	-
13 Ly6G	-	+	-	-	-	-	-	-	-
14 F4/80	+	-	-	-	±	+	+	+	+
15 PDCA-1	-	-	+	-	-	-	-	-	-

**Abbildung 8: Myeloische Zellen in der Lunge von Mäusen verfügen über unterschiedliche Oberflächenmarker.**

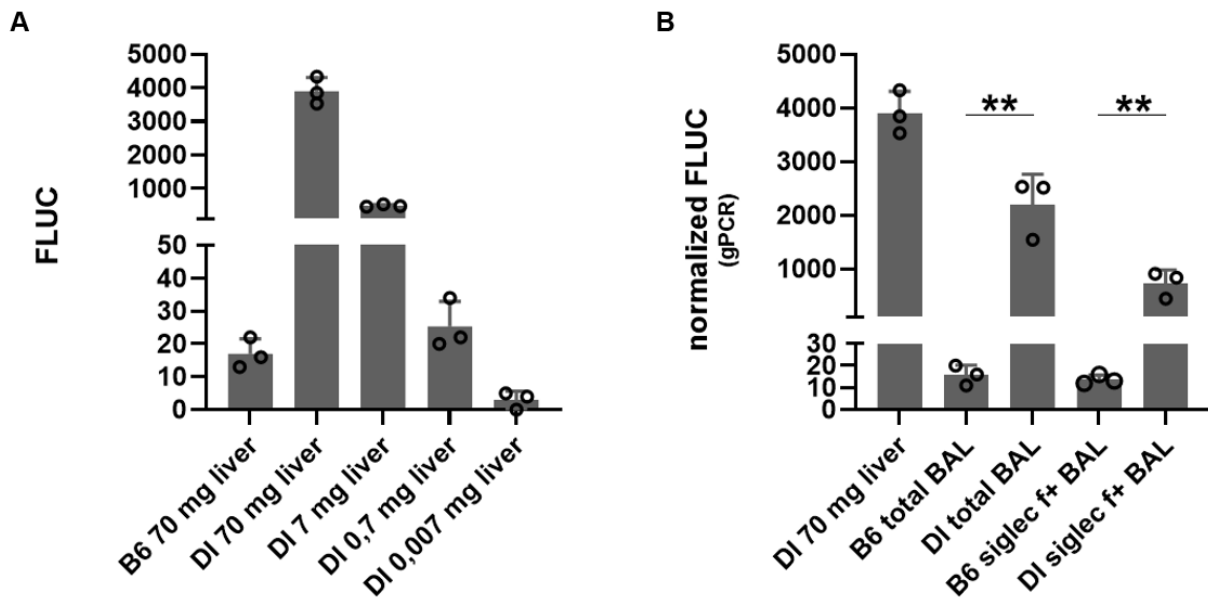
Alveolarmakrophagen (AM) sind positiv für Siglec f, CD11c und F4/80. Im Vergleich zu Interstitiellen Makrophagen (IM) besitzen sie keinen CD11b Marker (Misharin, Morales-Nebreda, Mutlu, Budinger, & Perlman, 2013).



### Abbildung 9: Alveolarmakrophagen haben den größten prozentualen Anteil an der BAL.

Markierte BAL-Zellen mit CD64 (Blau, BB700), CD11c (Violett, BV421), Siglec f (Violett, BV480) sowie CD11b (Gelbgrün, PE) wurden mit dem BD FACSymphony A5 (BD Bioscience) gemessen. Der Anteil der Alveolarmakrophagen (Siglec f + und CD11b -) an den Zellen der BAL beträgt 94.6%.

Ob und in welchem Umfang eine F2-Expression durch Alveolarmakrophagen in der Lunge stattfindet, wird durch Biolumineszenz-Bildgebung der Zellen des Bronchioalveolarlavage von D-Insight Mäusen untersucht. Die nachfolgenden Messungen in BAL-Zelllysaten (Abbildung 10) sind zur genomischen DNA normalisiert und pro Messung wurde jeweils eine Verdünnungsreihe aus Leberlysate zur Kontrolle der Methode mitgeführt. Die Messung erfolgte im ersten Schritt aus der gesamten Zellpopulation einer BAL mit Hilfe des *GloMax Discover Microplate Reader* (Promega). Im Anschluss erfolgte die Messung des Signals speziell aus den Alveolarmakrophagen der BAL. Hierzu wurden die Zellen mit Hilfe des für Alveolarmakrophagen typischen Oberflächenmarker Siglec f durch MACS-Sortierung aufgetrennt.



**Abbildung 10: Firefly-Luciferase-gekoppelten Prothrombin (F2)-Expressionen in BAL und Siglec f+ Zellen.**

**A.** Prothrombin (F2)-Expression in Leberlysaten. Prothrombin (F2) ist erhöht in der Leber. Zur Methodenkontrolle werden Leberlysat-Verdünnungen mitgeführt. **B.** Dargestellt sind Lysate von Zellen eines unsortierten BAL-Fluids (B6 total BAL und DI total BAL), sowie von MACS-Sortierten Siglec f+ Zellen (B6 siglec f+ BAL und DI siglec f+ BAL). Das Signal wird jeweils im Verhältnis zu einem Leberlysat mit 70 mg dargestellt. Die Ergebnisse sind zum genomischen Kontext normalisiert. Daten sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung. (Students T-Test,  $p=0,05$ ,  $*p\leq 0,01$ ,  $**p\leq 0,001$  und ns= nicht signifikant,  $n=3$ )

Es bestätigt sich eine erhöhte Prothrombin (F2)-Expression in den Leberzellen durch das gekoppelte Firefly-Luciferase (FLUC)-Signal im Vergleich zur Wildtyp (B6) Leber (Abbildung 10). Mit 70 mg Leberlysat wird ein Firefly-Luciferase Signal von 3901 als Mittelwert erfasst. Das Hintergrundsignal von B6 mit 70 mg Leberlysat liegt im Mittel bei 17. Durch die Ergebnisse der Verdünnungsreihe in dem Bereich von 70 mg bis 0,007 mg lässt sich eine annähernd lineare Erfassung des Signals als Methodengrundlage annehmen. Die vorbekannte extrahepatische F2-Expression in der Lunge, welche durch *In-vivo Imaging System (IVIS)*- Bildgebung entdeckt wurde (Abbildung 7), lässt sich in der BAL reproduzieren. Das FLUC-Signal der Gesamtpopulation der BAL (DI total BAL) mit einem Mittelwert von 2196 ist signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp (B6) mit einem Mittelwert von 16 ( $p=0,0026$ ). Obwohl die BAL-Zellpopulation zu ca. 94% aus Alveolarmakrophagen besteht, wird die Zellpopulation des BAL-Fluids mit Siglec f sortiert, um eine Bestätigung der Alveolarmakrophagen als Ursprung der in der Lunge gemessenen F2-

Produktion zu gewinnen. Das FLUC-Signal der Siglec f+ D-Insight Zellen liegt im Mittel bei 729 und ist mit einem p-Wert von 0,0077 signifikant erhöht zur Wildtypkontrolle (B6 siglec f+ BAL) mit einem FLUC-Mittelwert von 14. Die Darstellung in Abbildung 10B ist zur genomischen DNA normalisiert, sodass ein direkter Vergleich des Signals aus den BAL-Zellen bzw. den Alveolarmakrophagen mit dem Signal der Leber möglich ist. Bezogen auf jede einzelne Zelle ist das Signal von Alveolarmakrophagen hoch und entspricht 56,3% des FLUC-Signals der Leberzellen.

Zur Bestätigung der Prothrombin Expression auf Proteinebene der Lunge wird das Western-Blot Verfahren gewählt.

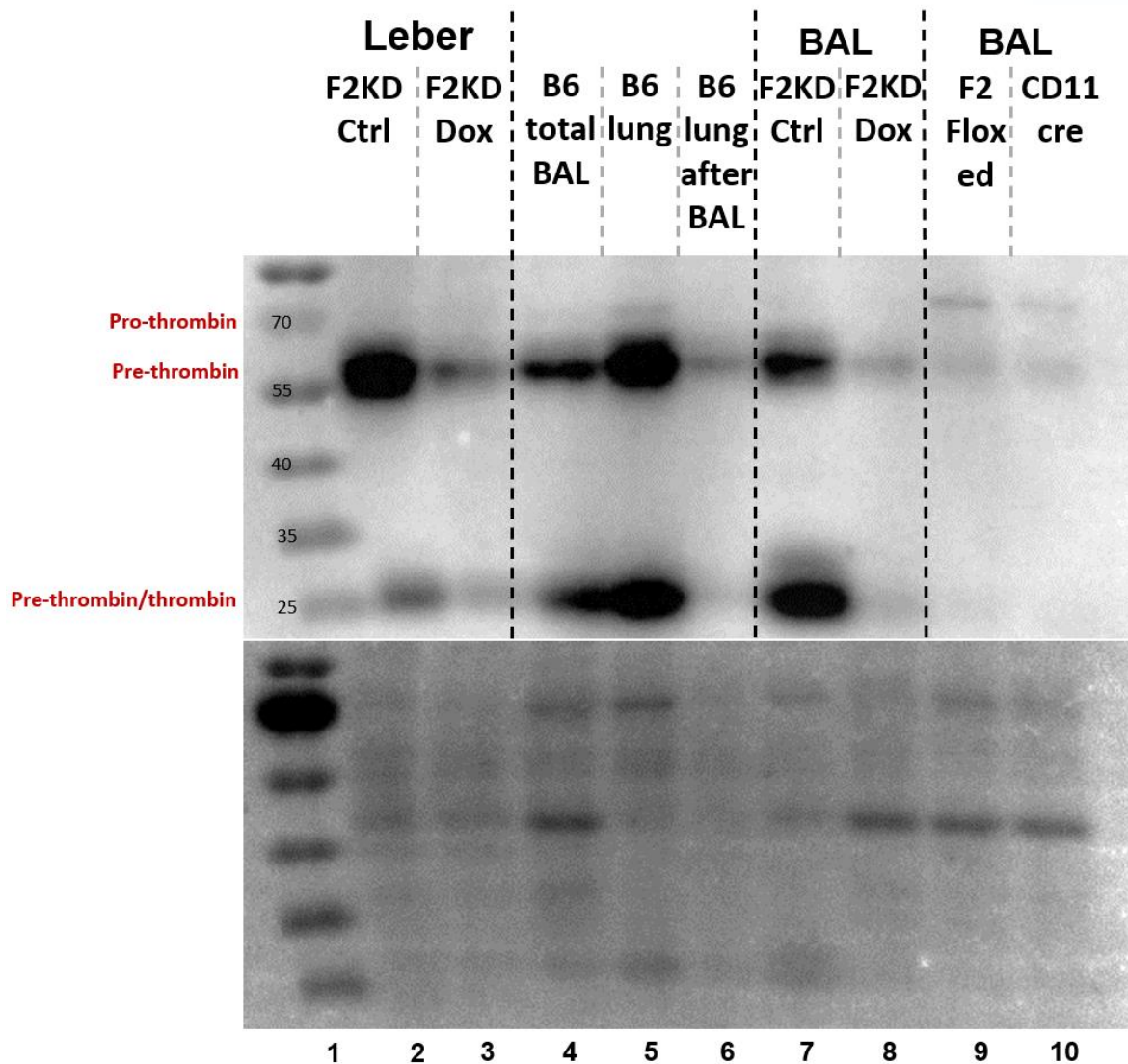


Abbildung 11: BAL-Lysate enthalten Prothrombin.

Abgebildet sind Leberproteinlysate, von F2KD Mäusen mit und ohne Doxycyclin, Proteinlysate aus BAL-Extraktion (B6) im Vergleich zu Proteinlysaten aus einer vollständigen Lunge (B6) und Proteinlysaten aus einer Lunge nach BAL-Extraktion (B6), sowie BAL-Extraktionen aus F2-Knockdown (F2KD) und F2-Knockout (CD11c cre) mit korrespondierenden Kontrollen. *Protein S Staining* der Membran zur Kontrolle der Proteinladung von 30 µg Protein pro Bande (unteres Gelbild). Repräsentatives Bild aus sieben Experimenten.

Verglichen wurde das F2-Signal anteilig am Proteinlysat. Dabei werden Prothrombin (72 kDa), Pre-Thrombin (52 kDa) und kombiniertes Pre-Thrombin/Thrombin (33 kDa) erfasst (Abbildung 11).

Die Prethrombin-Expression ist im Knockdown (F2KD mit Doxycyclin (Dox)-Futter) sichtbar in den Leberzellen herunterreguliert im Vergleich zur Kontrollbande (F2KD Ctrl liver). Die Kontrolle, welche ohne Doxycyclin Futter nicht über die entsprechende Regulierung des Promoters verfügt, zeigt die normal von Leberzellen zu erwartende F2-Expressionen. Dies veranschaulicht, dass Veränderungen in der F2-Expression mit Hilfe dieses Verfahrens qualitativ erfassbar sind. In der Wildtyp (B6)-Lunge lässt sich Pro- und Prethrombin als extrahepatische F2-Expression erfassen (Abbildung 11, Spur 5).

Das BAL-Fluid enthält erkennbare Mengen Prethrombin und bestätigt die Ergebnisse aus dem Firefly-Luciferase Versuchsaufbau (Abbildung 11, Spur 4). Korrelierend dazu zeigt eine Lunge nach BAL-Extraktion im Vergleich zur normalen Lunge deutlich weniger Signal (Abbildung 11, Spur 6).

Eine vollständige Signalauslöschung ist nicht realistisch, da bei einer BAL-Extraktion trotz repetitiver Waschvorgänge nicht alle Alveolarmakrophagen herausgelöst werden können und bis zu einem Drittel der Alveolarmakrophagen in der Lunge verbleiben. BAL-Lysate von Knockdown (F2KD mit Dox-Futter)- bzw. Knockout (CD11cre)-Tieren zeigen ebenfalls deutlich weniger F2-Expression (Abbildung 11, Spur 8 und 10), wenn sie im Zusammenhang mit ihren jeweiligen Kontrollen (F2KD Ctrl BAL bzw. F2floxed BAL, Abbildung 11, Spur 7 und Spur 9) betrachtet werden.

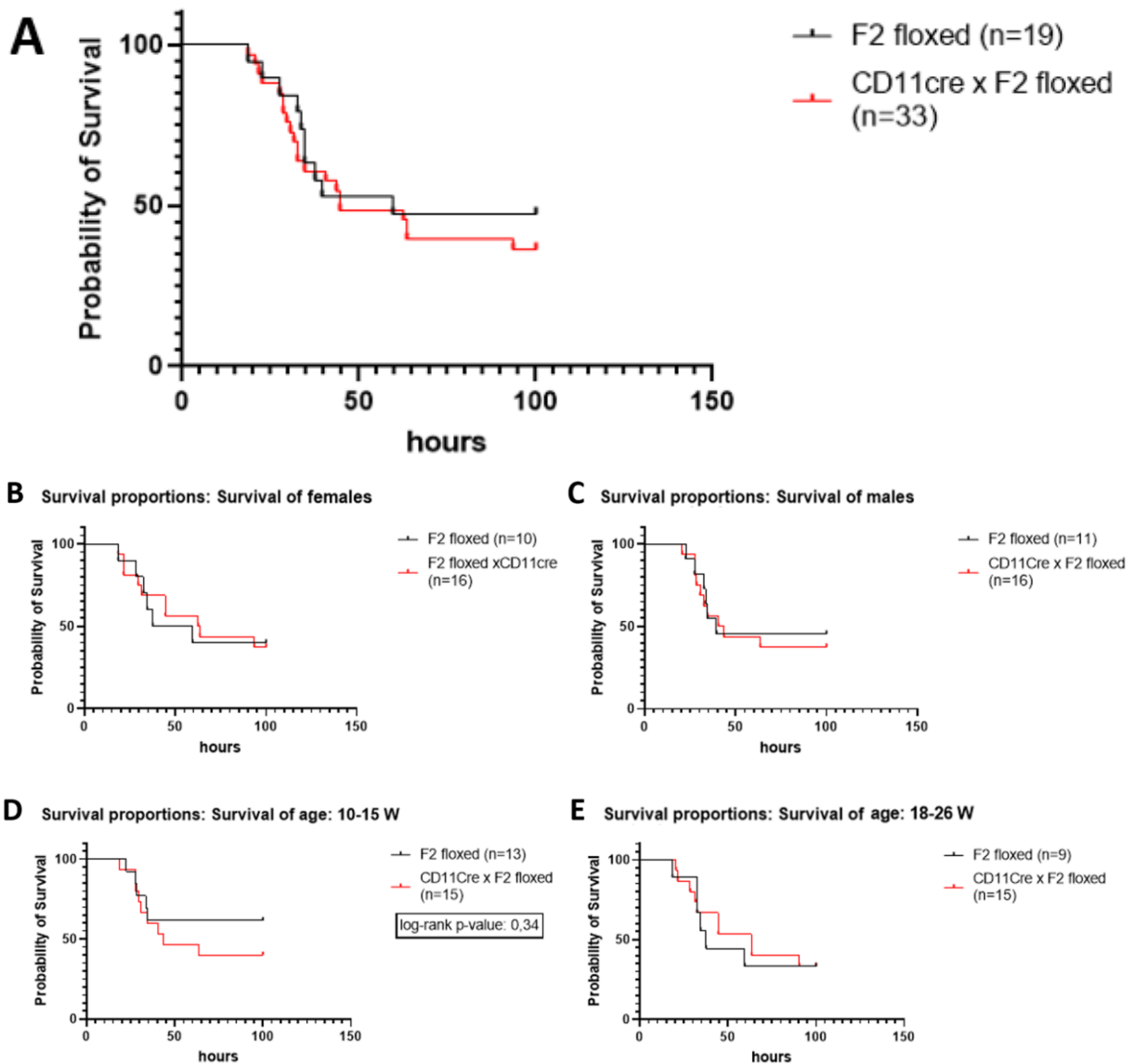
Insgesamt betrachtet bestätigen die Experimente die Annahme der Alveolarmakrophagen als eine Quelle der extrahepatischen Prothrombin (F2)-Expression in der Lunge.

## **7.2 Potenzielle funktionale Rolle der extrahepatischen Prothrombin (F2) - Expression in den Alveolarmakrophagen**

Die nachgewiesene erhöhte Prothrombin (F2)-Expression in den Alveolarmakrophagen, welche auf zellulärem Niveau im vergleichbaren Ausmaß wie bei Leberzellen zu finden ist, lässt darauf schließen, dass F2 entscheidende funktionelle Bedeutung zukommen muss. Mögliche Funktionen und Interaktionen in zellulärem Signalablauf wurden untersucht und sind im Folgenden dargestellt.

### **7.2.1 Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf das Gesamtüberleben im Sepsis Modell**

Unter Annahme einer wichtigen Rolle der F2-Expression in den Alveolarmakrophagen wird der Einfluss des Proteins auf das Gesamtüberleben im Sepsis Modell im Vergleich zu F2-Knockout (CD11c cre)-Tieren untersucht. Cd11c cre x F2floxed Mäuse sind spezifische Knockout-Mäuse, deren CD11c positiven Zellen nicht über F2 verfügen (Siehe Material und Methoden, Kap. 6.5.3.). Da Alveolarmakrophagen über CD11c als Oberflächenmarker verfügen, bietet dieses Model im Vergleich zum F2KD-Knockdown Modell eine spezifischere Möglichkeit Mäuse zu untersuchen, bei denen überwiegend nur Alveolarmakrophagen nicht über F2 verfügen. Dies ermöglicht die Gewinnung genauerer Erkenntnisse über die Funktion des Prothrombins in den Alveolarmakrophagen und der Lungenumgebung. 33 CD11c cre x F2floxed Mäuse und 19 F2 floxed Kontrollmäuse wurden nach Injektion einer Dosis LPS (12,5 µg/20 g KG) infiltriert. Das Überleben wurde über einen Zeitraum von 100 Stunden beobachtet und stündlich erfasst.



**Abbildung 12: Ein F2-Knockout in Alveolarmakrophagen hat keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben im Sepsis Modell.**

**A.** Überleben mit und ohne F2-Expression in Alveolarmakrophagen bezogen auf die Gesamtpopulation der Mäuse. **B-C.** Auftrennung nach Geschlecht. **D-E** Auftrennung nach Alter. Dargestellt sind die Ergebnisse für jüngere Mäuse im Alter von 10-15 Wochen und für ältere Mäuse im Alter von 18-26 Wochen.

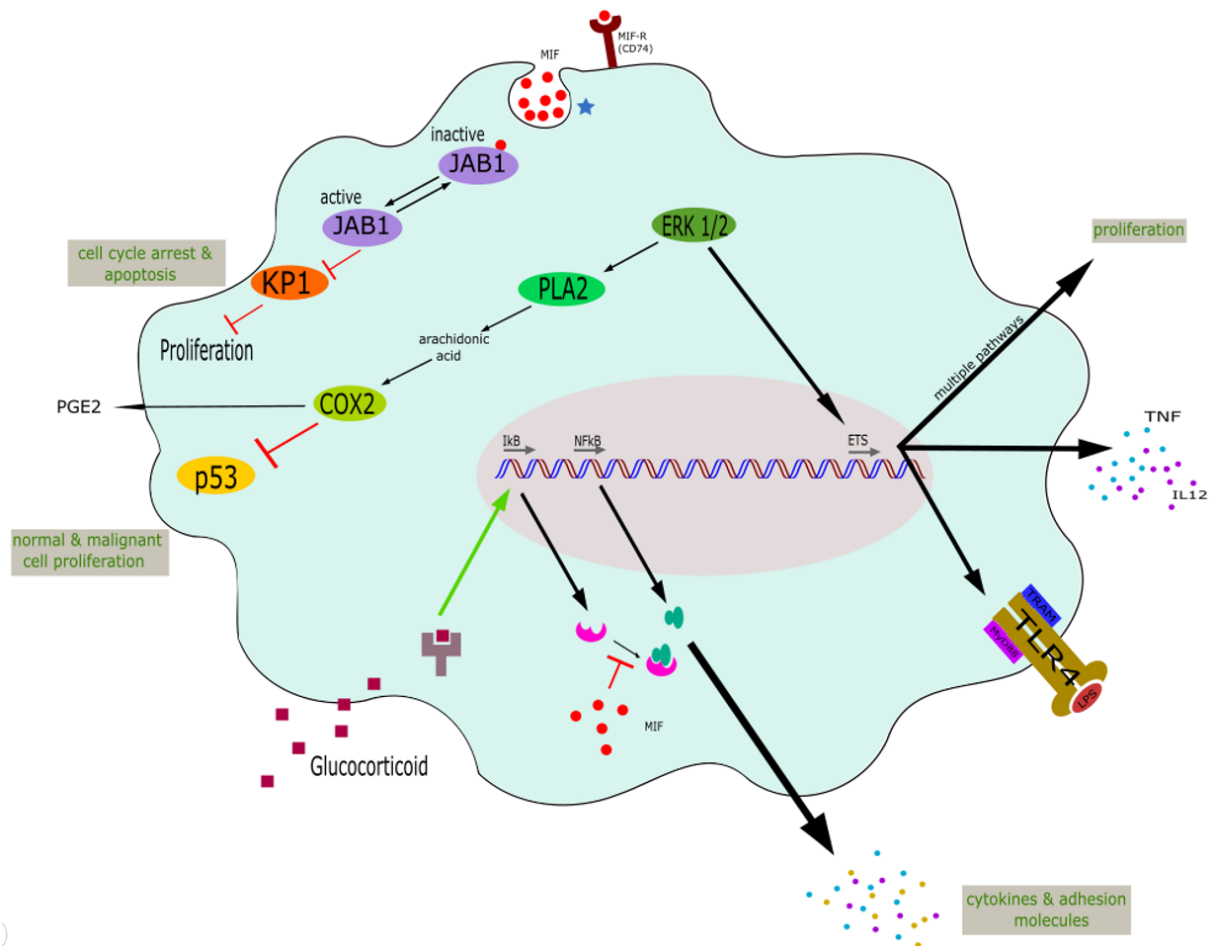
Die bisher unbekannte Funktion der F2-Expression in Alveolarmakrophagen bietet im Sepsis Modell mit entsprechender LPS-Dosis und stündlicher Verlaufsbeobachtung über 100 Stunden keinen Gesamtüberlebensvorteil im Vergleich zu CD11c cre x F2floxed Knockout (Abbildung 12, Panel A).

Eine genauere Aufschlüsselung der Ergebnisse nach Geschlecht und Alter zeigt ebenfalls keinen Überlebensvorteil für einzelne Gruppen (Abbildung 12, Panel B-E).

### **7.2.2 Einfluss der F2-Expression auf Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF) als inflammatorisches Treiber-Zytokin in der Lunge**

Obwohl die F2-Expressionen in Alveolarmakrophagen zu keinem Gesamtüberlebensvorteil führen, ist ein Effekt auf pro- bzw. antiinflammatorische Prozesse anzunehmen. Es wurde untersucht, ob die F2-Expression in Alveolarmakrophagen Einfluss auf die Bildung und Freisetzung von *Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF)* hat.

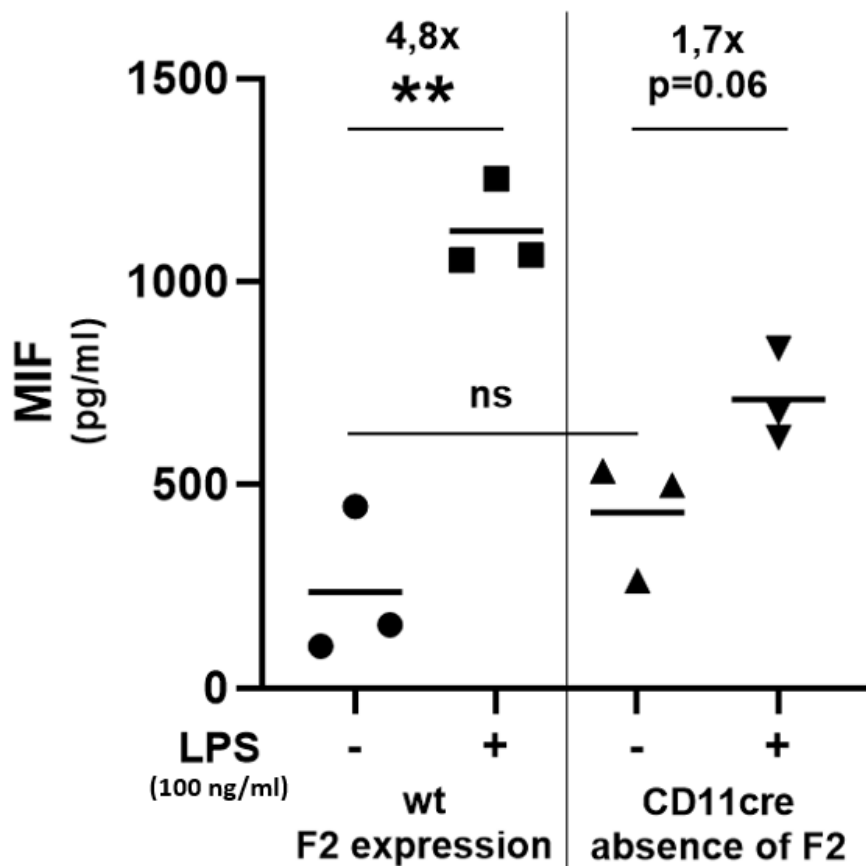
MIF ist ein Zytokin, welchem eine entscheidende Rolle sowohl in dem angeborenen als auch in dem erworbenen Immunsystem zugeschrieben wird. Bisherige wissenschaftliche Erkenntnisse deuten darauf hin, dass MIF über verschiedene Signalwege in der Pathogenese von Sepsis, Entzündungen und Autoimmunprozessen relevant ist. MIF kommt vor allem in Zellen der Immunantwort, wie dendritischen Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen, vor (Calandra & Roger, 2003). Unter den Subpopulationen der Makrophagen verfügen auch Alveolarmakrophagen über MIF, wobei besonders in älteren Mäusen höhere Konzentrationen gemessen wurden (Lafuse et al., 2019). MIF wird nicht wie andere Zytokine ausschließlich auf ein bestimmtes Signal hin produziert und freigesetzt, sondern auch in intrazellulären Pools gesammelt, sodass eine „Baseline-Produktion“ von MIF stattfindet. Mit Hilfe von MIF-defizienten Mäuse konnte ein Zusammenhang der MIF-Produktion mit der Expression von TLR4 hergestellt werden (Ohkawara et al., 2006). TLR4 als Rezeptor für LPS ist wichtig zur Aktivierung proinflammatorischer Prozesse nach Kontakt mit dem Endotoxin der Bakterien. Ein vorbestehender MIF-Pool im Zytoplasma garantiert eine schnelle Reaktion und Hochregulierung von TLR4 Rezeptoren bei Infektion (Roger, David, Glauser, & Calandra, 2001).



**Abbildung 13: MIF reguliert verschiedene Signalwege in Alveolarmakrophagen.**

MIF kann entweder klassisch über einen Rezeptor (CD74) oder per Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. MIF führt über die Bindung an *JUN-activation domain binding Protein (JAB1)* zur Inaktivierung dieses Proteins. In der Folge kommt es zur Inhibition der Proliferation und zum Zellzyklusarrest mit Apoptose. MIF phosphoryliert *extracellular signal regulated kinase 1 und 2 (ERK1/2)*. Dies führt einerseits im Downstream zur Hemmung von p53 als Tumorsuppressor Protein p53 und andererseits zur Transkription weiterer Proteine der *E26 transformation-specific (ETS)* Familie. Dies bewirkt, dass weitere Signalwege aktiviert, verschiedene Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL12 freigesetzt und die Expression von TLR4 hochreguliert werden. MIF kann außerdem der durch Glucocorticoide ausgelösten Inhibition der Freisetzung weiterer Zytokine durch Inhibition des Signalwegs entgegenwirken (verändert, Calandra & Roger et al., 2003).

Der Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf die Bildung und Freisetzung von MIF wurde über einen MIF ELISA in CD11c cre Knockout-Mäusen untersucht. Die Zellen wurden nach Extraktion in Zellkultur gebracht und für 24h mit LPS stimuliert. Die MIF-Freisetzung in den Zellkulturüberstand wird nachfolgend dargestellt (Abbildung 14). Normalisierung über *NucBlue live cell Staining* der ausgesäten Zellen.



**Abbildung 14: Prothrombin erhöht MIF-Sekretion in Alveolarmakrophagen.**

Die MIF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach 24-stündiger Stimulation mit LPS wird in pg/ml erfasst. Abgebildet sind die Ergebnisse für den Wildtyp (B6) mit F2-Expression im Vergleich zum Knockout ohne F2-Expression jeweils mit und ohne LPS-Stimulation. Normalisierung anhand des *NucBlue live cell Signals* der ausgesäten Zellen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung. (Students T-Test,  $p=0,05$ , \* $p\leq 0,01$ , \*\* $p\leq 0,001$  und ns= nicht signifikant,  $n=3$ )

In Wildtyp Kontrollmäusen (B6) wurde eine Baseline MIF-Produktion von 235 pg/ml festgestellt. Nach Stimulation der Alveolarmakrophagen mit 100 ng/ml LPS stieg die MIF-Produktion um 889 pg/ml auf 1124 pg/ml. Die erhöhte Freisetzung von MIF ist mit einem p-Wert von 0,002 signifikant. In CD11c cre Knockout Alveolarmakrophagen, welche nicht über eine F2-Expression verfügen, kam es bei Stimulation mit LPS nicht zu einem signifikanten Anstieg

der MIF-Produktion ( $p=0,06$ ). Die gemessenen Werte liegen im Mittel bei 710 pg/ml. Die Ausgangskonzentration der jeweiligen Alveolarmakrophagen pro Gruppe ist nicht unterschiedlich ( $p=0,222$ ) und entsprechend vergleichbar. Dies zeigt, dass die F2-Produktion in Alveolarmakrophagen entscheidend zur Steigerung des immunologisch bedeutsamen Zytokins MIF beiträgt.

### 7.2.3 Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf die Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )-Produktion und -Freisetzung

Da eine gesteigerte MIF-Produktion auch zu erhöhten *Tumor Necrosis Factor alpha* (TNF $\alpha$ ) führt (Calandra, Bernhagen, Mitchell, & Bucala, 1994), wurde der Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf die TNF $\alpha$ -Produktion und -Freisetzung separat untersucht. Die Alveolarmakrophagen wurden in Zellkultur gebracht und mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Die Freisetzung von TNF $\alpha$  in den Zellkulturüberstand wurde mit Hilfe eines TNF $\alpha$ -ELISA (Invitrogen) ermittelt. Die Normalisierung erfolgte anhand des *NucBlue live cell Staining* der ausgesäten Zellen.

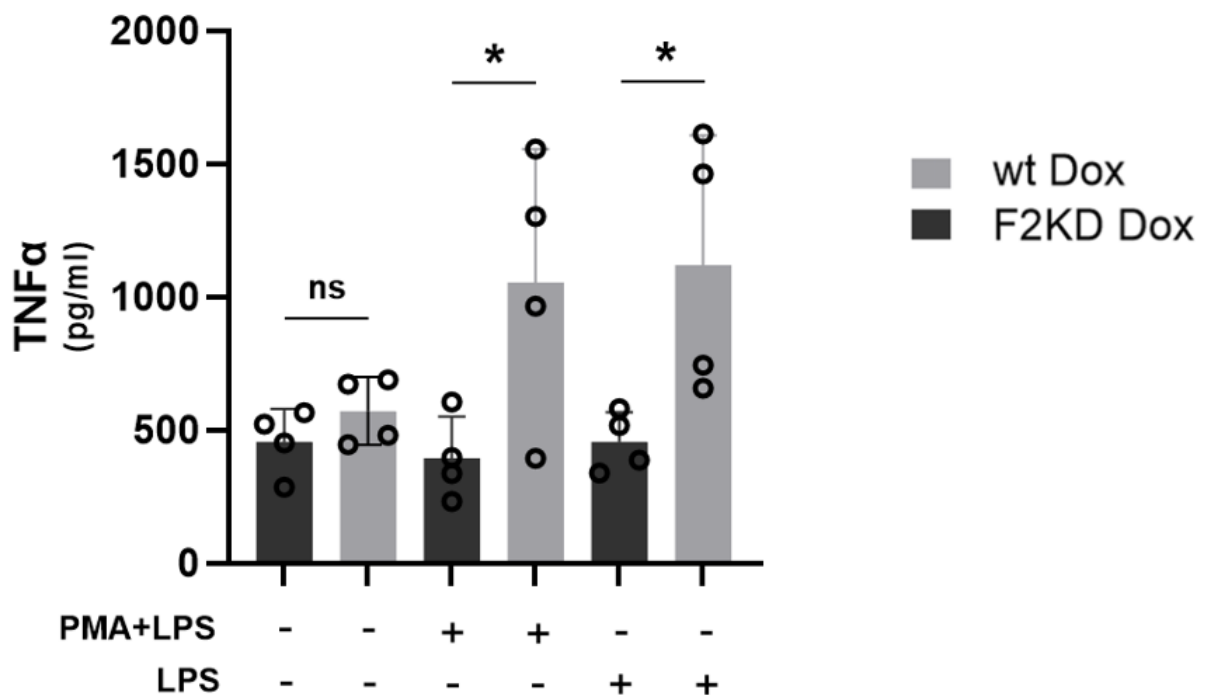


Abbildung 15: Prothrombin-Depletion inhibiert TNF $\alpha$ -Sekretion.

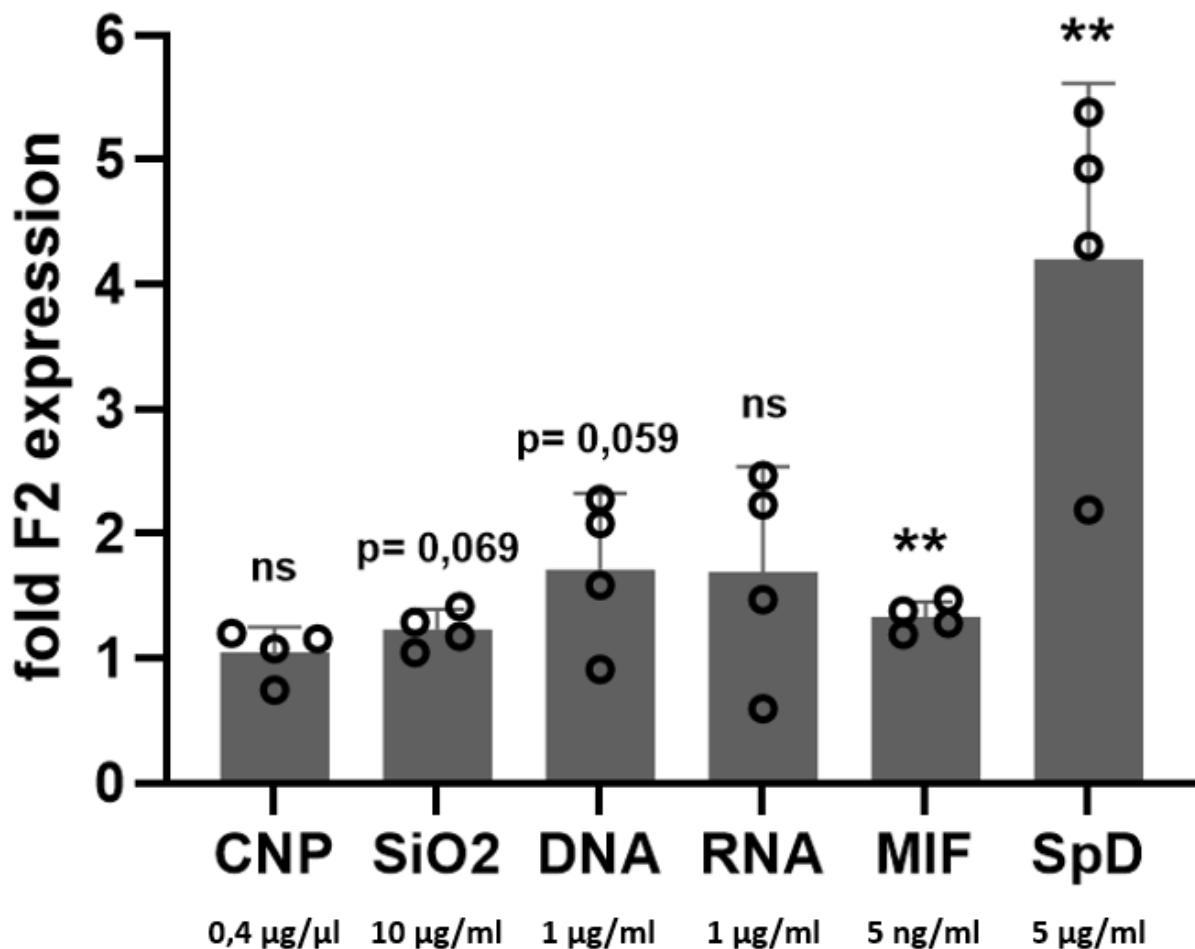
Dargestellt sind TNF $\alpha$ -Konzentration von nicht stimulierten, sowie PMA+LPS- und LPS-stimulierten Alveolarmakrophagen mit (wt Dox) und ohne (F2KD Dox) F2-Expression. Die Normalisierung erfolgt mit *NucBlue live cell Staining* der ausgesäten Zellen. Daten sind dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung. (Students T-Test, p=0,05, \*p $\leq$ 0,01, \*\* p $\leq$ 0,001 und ns= nicht signifikant, n=4)

Es wurde die TNF $\alpha$ -Produktion von Alveolarmakrophagen mit F2-Expression (wt Dox) und ohne F2-Expression (F2KD Dox) jeweils mit und ohne LPS bzw. PMA+LPS-Stimulation untersucht. Ohne Stimulation war die „Baseline Produktion“ in Alveolarmakrophagen mit (456 pg/ml) und ohne F2-Expression (394 pg/ml) vergleichbar (p=0,240) (Abbildung 15).

Sowohl bei Stimulation mit PMA+LPS als auch bei LPS allein kam es zu einem signifikanten Unterschied in den Zellreihen. Durch die LPS-Stimulation kam es in Alveolarmakrophagen mit F2-Expression zu einem signifikanten Anstieg (p=0,038) der TNF $\alpha$ -Produktion auf 1119 pg/ml während Alveolarmakrophagen ohne F2-Expression mit 456 pg/ml auf Basisniveau verblieben. Dies zeigt, dass die F2-Expression in Alveolarmakrophagen zu einer erhöhten Produktion und Freisetzung von TNF $\alpha$  führt.

#### **7.2.4 Einfluss von Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF) und anderen Stimulatoren auf die F2-Expression in Alveolarmakrophagen**

Alveolarmakrophagen sind durch ihre Lokalisation in der Lunge dem speziellen Lungenumfeld exponiert und mit diversen Substanzen in Kontakt. Einen Einfluss solcher Substanzen auf Alveolarmakrophagen und speziell F2 als möglichen Signalweginduktor der Inflammation ist denkbar und wurde im Folgenden untersucht. Hierzu wurden Alveolarmakrophagen des D-Insight Reporter-Mausmodells in Zellkultur gebracht und 24h mit unterschiedlichen Substanzen stimuliert. Die jeweilige F2-Expression wurde über Detektion der Firefly-Luciferase mit dem *GloMax Discover Plate Reader* (Promega) erfasst.



**Abbildung 16: Surfactant Protein D und MIF steigern die Prothrombin-Expression.**

Abbildung der F2-Expression in Alveolarmakrophagen nach 24-stündiger Stimulation mit CNP, SiO<sub>2</sub>, DNA, RNA, MIF und SpD. Das Signal wird über die an die F2-Expression gekoppelte Firefly-Luciferase der D-Insight Alveolarmakrophagen mit Hilfe des Glomax Discover Plate Reader erfasst. Die Normalisierung der Daten erfolgt mit *NucBlue live cell Staining* der Zelllysate. Daten sind dargestellt bezogen auf die Baseline Expression von D-Insight Alveolarmakrophagen ohne Stimulation als fold change mit Standardabweichung. (Students T-Test, p=0,05, \*p≤0,01, \*\* p≤0,001 und ns= nicht signifikant, n=4)

Feinstaub stellt ein globales Gesundheitsproblem dar und die menschliche Lunge ist im Lauf des Lebens hohen Mengen an Feinstaub ausgesetzt. Diese können zu chronischen Lungenerkrankungen führen (Constantine et al., 1959). Ein möglicher Einfluss von Feinstaub auf die F2-Expression und nachfolgend ausgelöste inflammatorische Prozesse wurde untersucht. Als Surrogat-Parameter für Feinstaub wurden die Alveolarmakrophagen mit Carbon Nanopartikeln (CNP) in einer Konzentration von 0,4 µg/µl untersucht. Die Analysen ergaben keinen signifikanten Unterschied (p=0,687). Demnach

scheint die Exposition gegenüber Feinstäuben nicht zu einer Steigerung der F2-Expression zu führen.

Siliciumdioxid (SiO<sub>2</sub>), oder auch Quarzstaub, ist heute noch häufig in industriellen Bereichen anzutreffen und eine Gefahr für die Lunge (Kreff, Wolff, & Rose, 2020; Quaintance, 1934). Nach chronischem Kontakt mit SiO<sub>2</sub> kann es zur Silikose in der menschlichen Lunge kommen, welche dann durch die Aktivierung von Fibroblasten zu einem späteren Zeitpunkt zur Fibrose führt (Monso et al., 1990). Die genauen Mechanismen sind bis heute Gegenstand der aktuellen Forschung. Angenommen wird, dass die Alveolarmakrophagen als Hauptphagozyten der Lunge eine entscheidende Rolle spielen. Durch die Phagozytose von SiO<sub>2</sub> kommt es in den Alveolarmakrophagen zur Apoptose. Durch den Apoptoseprozess werden die Zellinhalte der Alveolarmakrophagen in die Alveolen der Lunge freigesetzt. Dies führt zur Aktivierung einer inflammatorischen Kaskade, welche zur Aktivierung der Fibroblasten und nachfolgend zur letalen Fibrose führt. Entscheidend ist die Auslösung der Apoptose in den Alveolarmakrophagen. Bekannt ist bisher eine Auslösung über Beschädigung der Lysosomen bei Phagozytose des SiO<sub>2</sub>-Staubs (Hu, Zhao, Al-Humadi, Yin, & Ma, 2006; S. Tan & Chen, 2021) .

Der Einfluss von Thrombin auf die Pathomechanismen der Lungenfibrose wurde bereits erforscht. Die orale Applikation von Dabigatran zeigte, dass eine direkte Inhibierung von Thrombin die profibrotische Entwicklung von Myofibroblasten in der Lunge hemmt (Bogatkevich, Ludwicka-Bradley, & Silver, 2009). Denkbar wäre demnach auch eine Auslösung der Apoptose durch die Steigerung der F2-Expression und nachfolgende MIF-Signalwege. Eine solche Möglichkeit wurde durch Stimulation der D-Insight Alveolarmakrophagen in vitro mit 10 µg/ml SiO<sub>2</sub> untersucht. Interessanterweise zeigte sich in dem Versuch, dass SiO<sub>2</sub> tatsächlich zu einer geringen Hochregulation führt, wenn auch formal nicht signifikant. Dies legt nahe, dass die intrathorakale Prothrombin-Expression einen wichtigen Modulator für die Fibrose darstellt.

Neben LPS als Endotoxin sind auch DNA- und RNA-Bestandteile möglicher in die Lunge eindringender Pathogene und wurden auf ihren Einfluss auf die F2-Expression hin untersucht. DNA und RNA wurden jeweils in einer Konzentration von 1 µg/ml verwendet. Weder nach Stimulation mit DNA noch mit RNA lassen

sich signifikante Veränderungen der F2-Expression messen, wobei die Exposition mit DNA zu einem knapp nicht signifikantem ( $p=0,059$ ) geringen Anstieg führte. Ein Einfluss von pathogener DNA oder RNA auf die F2-Expression in Alveolarmakrophagen lässt sich demnach nicht feststellen. Durch die Stimulation von Alveolarmakrophagen mit MIF sollte untersucht werden, ob MIF, welches durch Prothrombin vermehrt gebildet und freigesetzt wird, im Sinne eines autoregulatorischen Prozesses auch Einfluss auf die F2-Expression nehmen kann. Es zeigte sich, dass die 24-stündige MIF-Stimulation der Alveolarmakrophagen zu einem geringfügigen Anstieg des Firefly Luciferase-Signals führt (Abbildung 16). Die F2-Expression liegt bei 1,332. Obwohl dies im Vergleich nur minimale Veränderungen sind, ist das Ergebnis mit einem p-Wert von 0,005 signifikant. Demnach führt MIF zu einer geringfügigen F2-Expressionserhöhung. Die reduzierte MIF-Sekretion nach Prothrombin-Knockout in Alveolarmakrophagen (Abbildung 14) deutet auf einen autoregulatorischen Mechanismus.

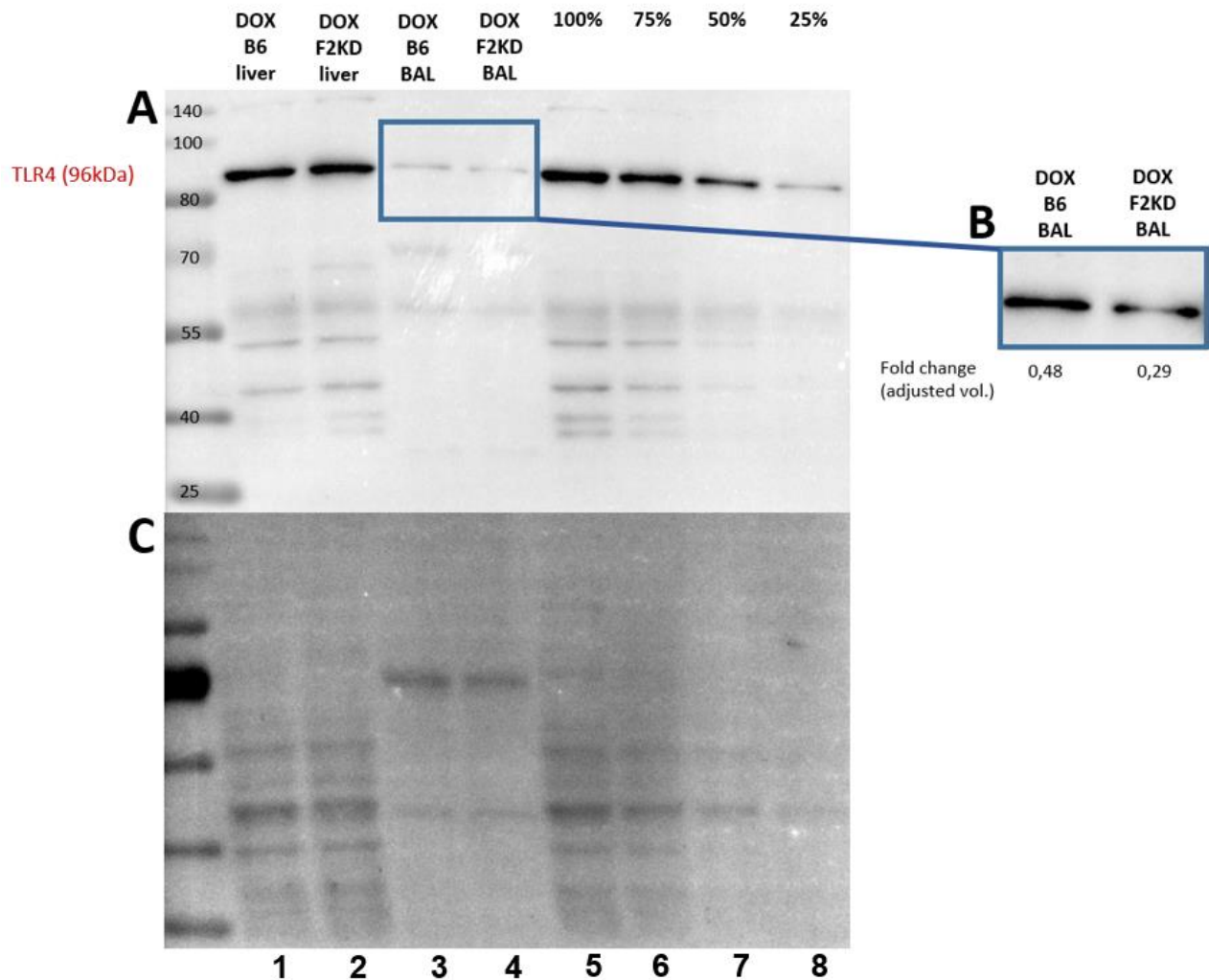
Die Alveolarmakrophagen selbst sind in den Alveolen der Lunge speziell von Surfactant umhüllt. Eine Beeinflussung der Alveolarmakrophagen durch ihr direktes Umfeld ist denkbar. Surfactant selbst besteht aus den Surfactant Proteinen A bis D und diversen Phospholipiden. Ein solche Möglichkeit wurde durch Stimulation der Alveolarmakrophagen mit *Surfactant Protein D (SFTPD)* in einer Konzentration von 5 µg/ml untersucht.

Es zeigte sich, dass die F2- Expression deutlich durch SFTPD beeinflusst wird. Es kam zu einer 4,2-fachen Induktion der F2-Expression in Alveolarmakrophagen. Der Unterschied ist mit einem p-Wert von 0,003 signifikant.

#### **7.2.5 Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf die Toll-like-Receptor 4 (TLR4)-Expression**

Alveolarmakrophagen benötigen zur Detektion von LPS und zur folgenden Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen den *Toll-like-Rezeptor-4 (TRL4)* auf ihrer Oberfläche (Janardhan et al., 2006). Aufgrund bisheriger Ergebnisse wäre ein Einfluss der F2-Expression in Alveolarmakrophagen auf

die Produktion von TLR4 denkbar. Ein möglicher Zusammenhang wurde durch die Darstellung von TLR4 aus BAL im Western Blot Verfahren analysiert.



**Abbildung 17: Reduktion der TLR4-Expression im Prothrombin-Knockdown.**

**A.** Darstellung von TLR4 (96kDa) mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens. Aufgetragen sind je 30 µg Proteine. Dargestellt sind Leberlysate von Wildtyp (B6) und F2-Knockdown (F2KD) mit Doxycyclin als Kontrolle. Es folgen Proteinextraktionen aus BAL-Fluid (Wildtyp (B6) und F2- Knockdown (F2KD)) mit Doxycyclin. **B.** Genauere Darstellung der beiden BAL-Fluid Proteine nach Signalabdeckung der stärkeren z.T. überlagernden Signale der Leberbanden mit längerer Belichtungszeit. Abgebildet ist zusätzlich jeweils der *Fold change* nach Abgleich mit Membranhintergrund und Ponceau S. **C.** Darstellung der Proteinladung mit Ponceau S.

In den Leberlysaten von Wildtyp (B6) und F2-Knockdown (F2KD) ließ sich TLR4 in der erwarteten Größe von 96 kDa darstellen (Abbildung 17, Spur 1+2,

Spur 5-8). Anhand der Konzentrationskurve (100-25%) ist erkennbar, dass unterschiedliche Mengen visualisierbar sind. Die TLR-4-Expression des BAL-Fluids ist deutlich niedriger, verglichen mit den Leberlysaten. Da es bei längerer Belichtung zur schlechteren Darstellung dieser durch die Signalüberlagerung der anderen Banden kam, wurden diese noch einmal separat länger belichtet. Es zeigte sich, dass im BAL-Fluid Wildtyp (B6) ein stärkeres Signal verglichen mit dem BAL-Fluid F2-Knockdown (F2KD) sichtbar ist. Dies deutet auf eine Reduktion der TLR4-Produktion um 40% hin, wenn F2 in den Alveolarmakrophagen nicht vorhanden ist. Die Sensibilität der Alveolarmakrophagen für LPS ist folglich möglicherweise abhängig von der F2-Expression in den Zellen. Kommt es zur Reduktion der F2-Produktion in Alveolarmakrophagen, so ist die TLR4-Expression vermindert.

## 8 Diskussion

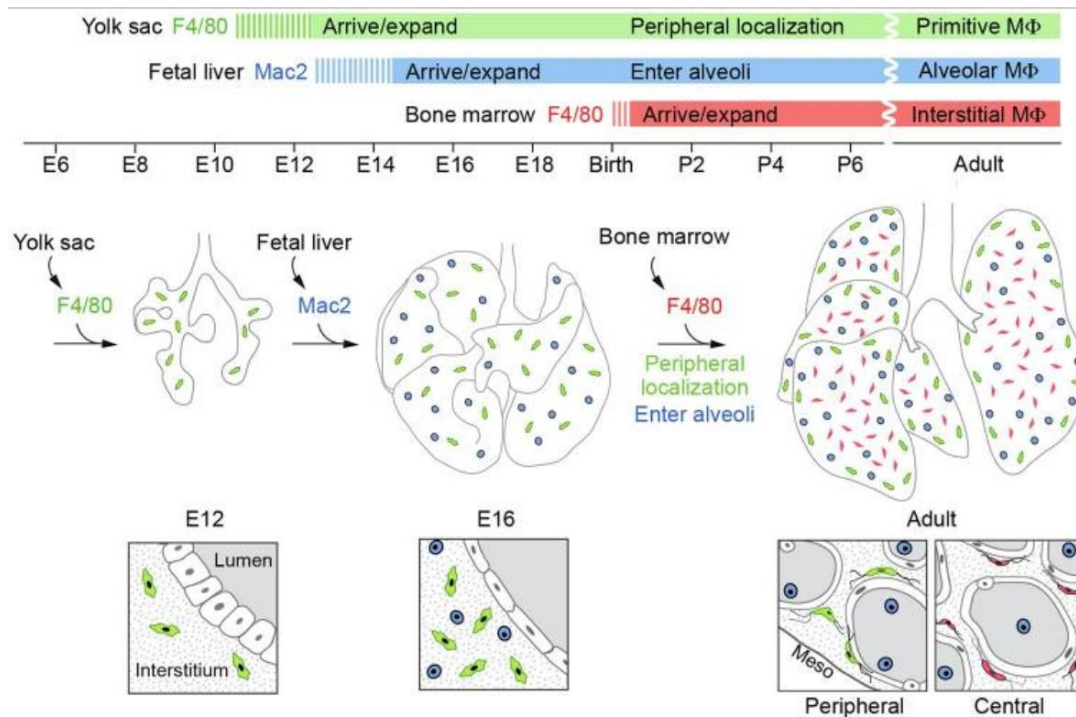
### 8.1 Alveolarmakrophagen

Als ansässige Phagozyten sind die Alveolarmakrophagen auf der luminalen Seite der Alveolen angesiedelt.

#### 8.1.1 Kolonisation der Lunge durch Makrophagen

Die Kolonisation der Lunge durch die Alveolarmakrophagen beginnt bereits wenige Tage nach der Geburt. Die angesiedelten Alveolarmakrophagen verfügen über die Fähigkeit sich selbst zu erneuern. Dabei gibt es drei Subpopulationen der Makrophagen, die in unterschiedlichen Wellen während der embryonalen und postnatalen Entwicklung in die Lunge immigrieren. Während der Embryonalwoche 10,5 kommen F4/80 positive Makrophagen aus dem Dottersack in der Lunge an und besetzen das Interstitium. Anschließend folgt die Besiedlung durch embryonale Mac2 positive Makrophagen aus der fetalen Leber. Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung sind sie ebenfalls im Interstitium zu finden. Zu einem späteren Zeitpunkt verlassen sie das Interstitium und immigrieren in den Alveolarraum und bilden die Alveolarmakrophagen. Die Migration allein reicht dafür aber nicht aus, tatsächlich wird der Granulozyten-Makrophagen stimulierende Faktor (GM-CSF) als Wachstumsfaktor benötigt, um die fetalen Monozyten in funktionsfähige Alveolarmakrophagen zu differenzieren. Falls es zu einem GM-CSF-Mangel zu diesem Zeitpunkt kommt, können die fetalen Monozyten nicht korrekt auf die durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierte *Toll-like-Rezeptor-4 (TLR4)*-Aktivierung reagieren. Dies führt dazu, dass die Phagozytose oder Prozessierung oberflächlicher Lipide nicht möglich ist (Guilliams et al., 2013; Trapnell, Carey, Uchida, & Suzuki, 2009).

Die F4/80 positiven Makrophagen, die initial vom Dottersack in das Interstitium der Lunge gewandert sind, ändern noch einmal ihren Ort und gehen in das Submesothel perivaskulärer Gebiete. Das frei gewordene Interstitium wird dann im Anschluss durch neue F4/80 positive Makrophagen aus dem Knochenmark besiedelt (Guilliams et al., 2013; Morrison, Hemmati, Wandycz, & Weissman, 1995; S. Y. Tan & Krasnow, 2016).



**Abbildung 18: Kolonisation der Lunge durch Makrophagen.**

Makrophagen immigrieren in die Lunge in drei unterschiedlichen Wellen und aus drei verschiedenen Orten während der embryonalen und postnatalen Entwicklung. In E10,5 wandern F4/80 positive Makrophagen vom Dottersack (grün) in das Interstitium ein, Mac2+ Makrophagen aus der Leber (blau) kommen hinzu (Guilliams et al., 2013). Nach der ersten postnatalen Woche ändern die beiden Zellpopulation ihren Ort. F4/80+ Makrophagen gehen in das Submesothel perivaskulär. Mac2+ werden zu den Alveolarmakrophagen im Alveolarraum. F4/80+ Zellen (rot) vom Knochenmark besiedeln zuletzt das freigewordene Interstitium (S. Y. Tan & Krasnow, 2016).

### 8.1.2 Oberflächenmarker der Alveolarmakrophagen und Klassifikation

Alveolarmakrophagen verfügen über andere Oberflächenmarker und erscheinen so als gesonderte Linie der Makrophagen in der Lunge. Ihre Fluktuationsrate im Jahr beträgt 40 Prozent (Maus et al., 2006; Mody & Meyers, 1988). Allerdings kann die Population der Alveolarmakrophagen im Fall von Zellstress oder Entzündung durch andere immigrierende Makrophagen unterstützt werden. Diese verhalten sich dann ähnlich zu Alveolarmakrophagen (Guilliams et al., 2013; Hashimoto et al., 2013; Hussell & Bell, 2014; Yona et al., 2013). Durch die Spezialisierung können Alveolarmakrophagen nicht wie andere Makrophagen klassifiziert werden. Sie unterscheiden sich auch von anderen spezialisierten Makrophagen wie Kupffer Zellen (Leber) oder Osteoklasten (Knochen) (Geissmann et al., 2010; Gordon & Taylor, 2005).

Sie sind zudem von den anderen Makrophagen abzugrenzen, die ebenfalls die Lunge besiedeln, wie zum Beispiel interstitielle Makrophagen. Zudem erscheint es so, dass sich speziell die Alveolarmakrophagen der Alveolen von den Makrophagen der etwas größeren Luftwege unterscheiden und nicht identisch sind. Dies ist allerdings noch Gegenstand der aktuellen Forschung (Hussell & Bell, 2014).

Als Teil des angeborenen Immunsystems sind Alveolarmakrophagen direkt involviert, wenn es dazu kommt, den Körper vor eindringenden Pathogenen durch den Luftweg zu schützen. Sie können Debris und apoptotische Zellen entfernen und die proinflammatorische oder ggf. die antiinflammatorische Antwort des Körpers regulieren. Diese Antwort bedarf einer guten Feinregulierung. Eine starke proinflammatorische Antwort auf harmlose Antigene oder Zellschrott ist ebenso gefährlich wie eine antiinflammatorische Reaktion auf pathologische Antigene. Ein solches Regulationssystem wird durch unterschiedliche Subpopulationen von Alveolarmakrophagen möglich (Hussell & Bell, 2014). Der Pool der Alveolarmakrophagen lässt sich in M1-Makrophagen und M2-Makrophagen aufteilen, wobei der Anteil der M1-Makrophagen an der Gesamtpopulation deutlich größer ist als der Anteil der M2-Makrophagen. Sie werden als proinflammatorische Regulatoren beschrieben und haben Eliminierungseigenschaften (Napoli et al., 2013; C. Song et al., 2019). Im Gegensatz dazu tragen M2-Makrophagen zur Reparatur des Endothels bei und fördern Proliferation. Verglichen mit den M1 Makrophagen nehmen die M2-Makrophagen eine antiinflammatorische Rolle ein (Allard, Panariti, & Martin, 2018; Mills, 2015; Mills, Kincaid, Alt, Heilman, & Hill, 2000). Obwohl M2-Makrophagen wichtig sind, um Entzündungen zu verhindern, können sie als antiinflammatorische Mediatoren eine Nische für attackierende Pathogene darstellen. Diese Pathogene können sogar Alveolarmakrophagen zum M2-Phenotyp zwingen, sodass sich ein Vorteil für die Pathogene ergibt (Buchacher, Ohradnova-Repic, Stockinger, Fischer, & Weber, 2015; Fields, Benson, & Besser, 2002).

Manche Studien zeigen allerdings, dass Alveolarmakrophagen nicht notwendigerweise streng als M1- oder M2-Phenotyp klassifiziert werden können. Tatsächlich ist der Schlüssel zu einem funktionalen Zusammenspiel

aller Makrophagen auf der luminalen Seite der Lunge nicht die theoretische Zuordnung zu einem der beiden Kategorien, sondern das Zusammenspiel des gesamten lokalen Mikroenvironments der Lunge in den unterschiedlichen Situationen (Hussell & Bell, 2014).

Wie andere Zellen auch, exprimieren Alveolarmakrophagen unterschiedliche Oberflächenmarker. *Cluster of Differentiation 11b (CD11b)* als bekannter Oberflächenmarker auf Interstitialmakrophagen ist nicht auf Alveolarmakrophagen exprimiert. Stattdessen findet sich dort CD11c. Dieser wiederum ist nicht auf den anderen beiden Makrophagentypen exprimiert (Guth et al., 2009; Zaynagetdinov et al., 2013). CD11c spielt eine wichtige Rolle für die Funktion der Alveolarmakrophagen. Durch die strukturelle Verknüpfung von CD11c mit *Cluster of Differentiation 18 (CD18)* kann eine Integrin-ähnliche Funktion ausgelöst werden. Als gemeinsamer Rezeptor können sie die Phagozytose von Komplement 3b (C3b)-markierten Partikeln einleiten und fördern (Malhotra, Hogg, & Sim, 1986).

Alveolarmakrophagen, besonders M2-Makrophagen, exprimieren außerdem in hohen Mengen *Cell surface transmembrane glycoprotein CD200 receptor 1 (CD200R)*. Dieser ist im Vergleich bei Interstitialmakrophagen deutlich niedriger und bei Peritonealmakrophagen sehr gering auf der Oberfläche vertreten (Snelgrove et al., 2008). CD200 als Ligand von CD200R wird vom respiratorischen Epithel produziert und sezerniert. Die Verbindung des Rezeptors mit seinem passenden Liganden ist wichtig für die Inhibierung von myeloischen Zellen und T-Zellen (Hatherley & Barclay, 2004; Snelgrove et al., 2008).

Der Mannose Rezeptor (CD206), welcher ebenfalls auf der Oberfläche der Alveolarmakrophagen zu finden ist, funktioniert auf ähnliche Art und Weise wie CD200R. Dieser erkennt vom Immunsystem noch unmarkierte Mikroorganismen in den Luftwegen der Lunge. Das durch den Rezeptor folgend ausgelöste Signal verhindert, dass Alveolarmakrophagen massiv proinflammatorische Mediatoren freisetzen und führt so zur Inhibition einer proinflammatorischen Überreaktion (Neese, Standing, Olson, Castro, & Limper, 1994; Steele et al., 2003).

Die Oberfläche der Alveolarmakrophagen ist außerdem durch verschiedene Rezeptoren der Trigger-Rezeptoren auf myeloiden Zellen (TREM)-Familie gekennzeichnet. Diese immunregulatorischen TREM können proinflammatorische und antiinflammatorische Eigenschaften annehmen. Während TREM1 proinflammatorische Antworten vorantreibt und besonders hoch nach TLR-Aktivierung exprimiert wird, ist TREM2 für den antiinflammatorischen Part zuständig und wird ebenso wie TREM1 nach TLR-Aktivierung hochreguliert, zur Verhinderung einer Überreaktion (Gao, Dong, Liu, & Niu, 2013; Habibzay, Saldana, Goulding, Lloyd, & Hussell, 2012). Ein weiterer Rezeptor, der besonders hoch auf der Oberfläche der Alveolarmakrophagen exprimiert ist, ist *sialic acid-binding immunoglobulin-like lektin F (SIGLEC-F)* in Mäusen. Im Menschen gibt es analog dazu *sialic acid-binding immunoglobulin-like lektin 8 (SIGLEC-8)* als Oberflächenmarker auf den Alveolarmakrophagen. Es gibt diesen Rezeptor zwar nicht in anderen Makrophagen, wohl aber in geringen Mengen auch bei eosinophilen Granulozyten. Bei den Eosinophilen ist SIGLEC-F vor allem involviert in die Apoptose und die Reduktion der Entzündung nach Antikörperbindung. Die genaue Funktion des SIGLEC F bzw. des SIGLEC 8 in den Alveolarmakrophagen ist allerdings noch nicht weiter erforscht (Mao et al., 2013; D. J. Song et al., 2009; M. Zhang et al., 2007). Ein bekannter inhibitorischer Rezeptor der Alveolarmakrophagen ist der Interleukin-10 Rezeptor. Dieser steuert proinflammatorischen Aktionen der Alveolarmakrophagen durch die Aktivierung der Janus Kinase 1 (JAK1) entgegen (Murray, 2005, 2006).

### **8.1.3 Alveolarmakrophagen Aktivierung und Signalleitung**

Der Alveolarmakrophage ist in einem ständigen Balanceakt zwischen proinflammatorischer Aktivierung und antiinflammatorischer Inhibierung. Welche Seite am Ende überwiegt, hängt maßgeblich der Signalleitung der Alveolarmakrophagen, der Signalgebung durch das alveoläre Epithel, dem Vorhandensein einer intakten Epithelbarriere und weiteren Faktoren ab (Hussell & Bell, 2014).

### 8.1.3.1 Proinflammatorische Signalwege

Zu den Rezeptoren, die proinflammatorische Signalwege aktivieren, gehören vor allem TLR2, TLR4, *Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR)*, Interferon Gamma Rezeptor 1 (IFNGR) und Interleukin Rezeptor 1 (IL-1R). TLR2 und TLR4 erkennen pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) und lösen mehrere Effekte aus (Hussell & Bell, 2014).

Auf der einen Seite können durch Interleukin-10 Rezeptor (IL-10R) ausgelöste inhibitorische Signale gehemmt werden (Fernandez, Jose, Avdiushko, Kaplan, & Cohen, 2004) und auf der anderen Seite können gleichzeitig wichtige Zytokine wie *Tumor Necrosis Factor alpha (TNF $\alpha$ )* aktiv freigesetzt werden. Speziell TLR4 kann durch LPS aktiviert werden. Das nachgeschaltete Signal, ausgelöst durch das LPS, involviert *Myeloid Differentiation Factor 88 (MyD88)*. MyD88 verhält sich wie ein Adapter und überträgt das Entzündungssignal durch Mitglieder der IL-1R-assoziierten Kinase (IRAK) Familie und durch Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6 (TRAF6). Im Anschluss aktivieren *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$  (TRIF)* und MyD88 durch ihre Signalwege beide den nukleären Faktor *kappa light chain enhancer* der B-Zellen (NF $\kappa$ B), welcher dann wiederum die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen initiiert. TNF $\alpha$  ist dann in der Lage an *Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1)* auf dem alveolären Epithel anzudocken. Dies führt zur weiteren Kommunikation mit dem nahe gelegenen Kapillarepithel (Kawai & Akira, 2006; Kuebler, Parthasarathi, Wang, & Bhattacharya, 2000). Oxidativer Stress kann auch durch gesteigerte Exozytose und Bildung von TLR4 zur proinflammatorischen Situation der Alveolarmakrophagen beitragen (Powers et al., 2006).

Ein weiterer Faktor, der zur höheren Expression von TLR4 auf der Oberfläche von Alveolarmakrophagen führt, ist der *Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF)*. MIF wird schon bei der LPS-Stimulation von den Alveolarmakrophagen freigesetzt und beeinflusst durch verschiedene Signalwege positiv die proinflammatorischen Eigenschaften der Alveolarmakrophagen. Neben einer Erhöhung der TLR4-Expression, kann MIF auch weitere Zytokine freisetzen und zur Inhibition antiinflammatorischer Signalwege, welche durch Bindung von

Glucocorticoiden initiiert werden, führen (Calandra et al., 1994; Calandra & Roger, 2003).

Ein weiteres Molekül, welches ebenfalls durch LPS-Stimulation der Alveolarmakrophagen freigesetzt wird, ist *Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1α)*. MIP-1α intensiviert die Entzündung durch die Rekrutierung von Neutrophilen (Quintero, Knolle, Cala, Zhuang, & Owen, 2010; Shanley, Schmal, Friedl, Jones, & Ward, 1995).

### **8.1.3.2 Antiinflammatorische Signalwege**

Um die Balance zu erhalten und proinflammatorische Überreaktionen zu vermeiden, können Alveolarmakrophagen auch antiinflammatorische Signalwege aktivieren. Die Alveolarmakrophagen können löslichen TLR4 in ihre Umgebung abgeben. Dieser verhält sich wie ein Decoy-Rezeptor und ist in der Lage das LPS aus den Luftwegen zu binden. Dies führt in der Konsequenz dazu, dass das frei gebundene LPS nicht mehr an den TLR4-Rezeptor der Alveolarmakrophagen-Oberfläche binden kann. Es verhindert somit ein Auslösen des proinflammatorischen Signals (Iwami et al., 2000). Eine andere Möglichkeit eines antiinflammatorischen Signals wird durch *microRNAs* ermöglicht. Es gibt verschiedene *microRNAs* wie let-7e, miR-155, miR-181c und miR125b. Sie werden hauptsächlich durch LPS aktiviert und regulieren wichtige Gene, die zum LPS-induzierten TLR-Signalweg beitragen und überwiegend die LPS-Sensitivität des Systems im Sinne einer antiinflammatorischen Situation regulieren (Androulidaki et al., 2009).

Manche dieser *microRNAs* können auch das MyD88-NFκB-System und die damit verbundene Freisetzung von Zytokinen, inhibieren oder zu höheren Sekretionsraten vom antiinflammatorischen IL-10 führen (Sheedy et al., 2010; Taganov, Boldin, Chang, & Baltimore, 2006) .

Zudem haben manche Moleküle der IRAK-Familie beide Funktionen und können nicht nur proinflammatorisch über NFκB wirken, sondern auch antiinflammatorisch über die Inhibierung von IRAK-1 (Kobayashi et al., 2002). Eine weitere antiinflammatorische Strategie involviert Efferozytose. Efferozytose ist eine spezielle Form der Phagozytose bei der speziell apoptotische Zellen aufgenommen und abgebaut werden. Dieser Prozess

verhindert, dass proinflammatorische und toxische Mediatoren aus dem Zellplasma dieser apoptotischen Zellen freigesetzt werden. Dadurch wird die Umgebung auf der luminalen Seite der Lunge nicht überschwemmt mit Entzündungsmediatoren und ein Entzündungsmilieu wird effektiv begrenzt (Ortega-Gomez, Perretti, & Soehnlein, 2013). Die Aufnahme der apoptotischen Zellen führt zudem zur weiteren Sekretion antiinflammatorischer Mediatoren wie dem *transforming growth factor (TGF- $\beta$ 1)* und Prostaglandin E2 (PGE2) (Fadok et al., 1998; Hoffmann et al., 2005; Huynh, Fadok, & Henson, 2002). Ein starkes proinflammatorische Signal ist das geschädigte alveoläre Epithel selbst während der Entzündung. Um dieses Signal unverzüglich in seinem Ausmaß zu minimieren, ist eine sofortige Reparatur des alveolären Epithels durch M2-Alveolarmakrophagen notwendig. Dieser Weg ist aufwändig, aber die wichtigste antiinflammatorische Strategie der Alveolarmakrophagen (Ortega-Gomez et al., 2013; Y. Xu et al., 2016).

### **8.1.3.3 Cross-talking Signal zwischen Alveolarmakrophagen und alveolärem Epithel**

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass Alveolarmakrophagen mit Hilfe eines Calciumaustauschs über *Gap Junctions* mit dem alveolären Epithel und untereinander kommunizieren. Das Kalzium wird durch den pathogenen Einfluss mobilisiert und über die *Gap Junction* zunächst in das alveoläre Epithel und über dieses mit weiteren *Gap Junctions* in andere Alveolarmakrophagen geschickt. Das hohe intrazelluläre Kalzium aktiviert wahrscheinlich diese Alveolarmakrophagen, die das Entzündungsgeschehen weiter steigern. Dies weist darauf hin, dass Alveolarmakrophagen eine Art Wächterfunktion einnehmen und aktiv Informationen über ein Pathogen weiterleiten (Westphalen et al., 2014). Diese Kommunikation über die *Gap Junctions* kann allerdings nicht nur in die eine, sondern auch in die andere Richtung ablaufen. Das alveoläre Epithel exprimiert TLR2 und TLR4. Beide Rezeptoren sind in der Lage PAMPS zu erkennen und führen zu ansteigenden Kalziumkonzentrationen im alveolären Epithel. Dieses Kalzium kann dann umgekehrt über die *Gap Junctions* zu den Alveolarmakrophagen geleitet

werden, sodass die Signalübertragung auch in die umgekehrte Richtung funktioniert (Thorley et al., 2011; Tomita, Sakurai, Ishibashi, & Maru, 2011). Ein weiteres „Cross-talk-Modell“ zwischen den Alveolarmakrophagen und dem alveolären Epithel schließt Mikropartikel ein. Die Mikropartikel enthalten viele antiinflammatorische Mediatoren und haben eventuell eine regulatorische Rolle in der Phagozytose. Sie werden speziell von Alveolarmakrophagen sezerniert und können vom alveolären Epithel aufgenommen werden. Nach erfolgreicher Aufnahme lösen die enthaltenen Mediatoren diverse Prozesse aus, welche in der Folge zu Inhibition der entzündlichen Situation in der Lunge führen (Bourdonnay et al., 2015).

## **8.2 Sepsis**

Sepsis ist eine lebensbedrohliche Erkrankung und beruht im Wesentlichen auf einer Fehlregulation des Immunsystems, welche im Fall einer Entzündung schädlich für den eigenen Körper wird. Obwohl das Krankheitsbild der Sepsis schon lange bekannt ist, bleibt sie bis heute ein globales Gesundheitsproblem. Allein im Jahr 2017 starben weltweit 48,9 Millionen Menschen aufgrund einer Sepsis und weitere 11 Millionen Menschen starben an den Folgen sepsisassoziierter Probleme. Im Vergleich aller globalen Todesursachen, macht der Anteil der Todesfälle durch Sepsis etwa 20 Prozent aus (Rudd et al., 2020). Überlebende leiden an den langfristigen Folgen wie kognitive Beeinträchtigungen, Depressionen, Angstzuständen, posttraumatische Belastungsstörungen, Fatigue und andere physische und psychische Einschränkungen (Prescott & Costa, 2018). Um das Überleben der Patienten mit Sepsis zu verbessern, ist es wichtig Mechanismen und Signalwege der Sepsisentstehung zu erforschen und zu verstehen.

### **8.2.1 Definition und Abgrenzung der Begrifflichkeiten**

Es gibt viele verschiedene Begriffe, um eine Sepsis zu definieren. Die meisten dieser Begriffe wie zum Beispiel die schwere Sepsis wurden aufgrund klinischer Beobachtungen eingeführt. Frühere Klassifikationen beschrieben vor allem drei Phasen: Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. Sepsis selbst beschrieb eine Infektion, welche den Körper systemisch schädigt. Im Fall

einer hinzukommenden Organdysfunktion kommt es zur nächsten Phase, die als schwere Sepsis definiert wurde. Sobald es zusätzlich entweder zur Hyperlaktatämie ( $>2\text{mmol/l}$ ) oder alternativ zur Hypotension kommt, ist die Phase des systemischen Schocks erreicht worden (Bone et al., 1992). Diese Begriffe in ihrer ursprünglichen Bedeutung sind nicht länger Teil des dritten internationalen Konsensus zur Definition von Sepsis und dem septischen Schock (Sepsis-3). Die Begriffe bzw. Phasen Sepsis und schwere Sepsis wurden überarbeitet. Die frühere Sepsis wird nun als Infektion bezeichnet und die schwere Sepsis wird durch den eigentlichen Begriff Sepsis ersetzt. Der septische Schock (Sepsis-3) verbleibt in der aktuellen Klassifikation. Die Sepsis selbst ist begleitet durch akute Organdysfunktionen, die durch ein *Sequential-Organ-Failure-Assessment (SOFA)*-Score identifiziert werden können. Dieses Score-System hilft bei der Beurteilung zur Funktion der Lunge, der Leber, der Nieren, des Kreislaufs und der Vigilanz. Zur Vereinfachung kann auch der *quickSOFA (qSOFA)*-Score benutzt werden. Eine Veränderung von zwei Punkten in dem Score ist definierend für die Sepsis (Cecconi, Evans, Levy, & Rhodes, 2018).

Von dem Begriff Sepsis ist das *systemic inflammatory response syndrome (SIRS)* zu unterscheiden. Die Kriterien für ein SIRS wie erhöhte Körpertemperatur ( $>38^{\circ}\text{C}$ ), gesteigerte Atemfrequenz ( $>20/\text{min}$ ), erhöhte Herzfrequenz ( $>90/\text{min}$ ) und Leukozytose oder Leukopenie sollten nicht mehr zur Definition einer Sepsis herangezogen werden. Es gibt viele andere Ursachen für eine SIRS wie zum Beispiel Polytraumen, Operationen und Ischämie. Die Anwesenheit von SIRS-Kriterien machen eine Sepsis zwar wahrscheinlicher, aber die Abwesenheit dieser Kriterien schließen eine Sepsis nicht aus. Um eine Sepsis früh und sicher zu diagnostizieren ist der neuere SOFA-Score ausschlaggebend (Seymour et al., 2016; Shankar-Hari et al., 2016; Singer et al., 2016).

Eine frühe Intervention mit Antibiotika in der ersten Stunde ist überlebenswichtig. Für jede Stunde, in der noch keine angemessene Behandlung stattfindet, steigt das Risiko an der Sepsis zu versterben um circa sieben Prozent (A. Kumar et al., 2006).

## 8.2.2 Pathophysiologie der Sepsis

Früher wurde die Sepsis in zwei Phasen unterteilt. Zuerst kommt es zu einer proinflammatorischen Phase, welcher im Anschluss eine immunsuppressive Phase folgt. Aktuelle Studien zeigen, dass diese nicht strikt aufeinander folgen müssen, sondern beide Phasen auch simultan auftreten können. Dies ist sowohl abhängig vom Einfluss des Pathogens als auch vom Immunsystem des Patienten. Ein Großteil der Pathophysiologie einer Sepsis insbesondere der Entstehung der Organdysfunktionen ist noch Teil der aktuellen Forschung (Hotchkiss & Karl, 2003; Hotchkiss, Monneret, & Payen, 2013; Hotchkiss & Opal, 2010).

Ein Haupttrigger der Sepsis, welcher zur Organdysfunktion führt, ist das Gerinnungssystem. Es wird durch die LPS-induzierte Aktivierung von PAMPs getriggert. Das aktivierte Gerinnungssystem führt zur Bildung von Fibrinnetzen, die es ermöglichen Bakterien auf eine mechanische Art einzufangen. Dies verhindert das Einwandern in das Gewebe oder den Blutstrom (Loof et al., 2011; M. O'Brien, 2012; H. Sun, Wang, Degen, & Ginsburg, 2009). In der Folge ist ein frühzeitiges klinisches Eingreifen in die Gerinnung durch die Behandler bei Sepsispatienten kritisch (Kipnis et al., 2004; Robriquet et al., 2006).

*Tissue Factor* erscheint als wahrscheinlichster Mediator für die Stimulation der Gerinnung während der Sepsis. Allerdings ist noch nicht vollständig bekannt, welches Event und welche Zellen zur massiven Freisetzung von TF führen (Dellinger et al., 2013; Dhainaut et al., 2005; Kipnis et al., 2004; Robriquet et al., 2006).

Ein zu spätes Eingreifen birgt jedoch die Gefahr, dass die Gerinnung außer Kontrolle gerät und es in schweren Fällen zur disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC) kommt. Die DIC führt dann im weiteren Verlauf zur Entstehung zahlreicher kleiner mikrovaskulären Thromben, die schlussendlich zum schweren Organversagen und zur Blutung nach Verbrauch aller Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren beiträgt (Angus & van der Poll, 2013; Hardaway, Williams, & Vasquez, 2001; Iskander et al., 2013).

Theoretisch könnte die prokoagulatorische Situation durch die Fibrinolyse in Schach gehalten werden, da der Plasminogenaktivator während der Sepsis ebenfalls erhöht ist. Allerdings wird die Fibrinolyse schnell durch erhöhte

Mengen von Plasminogen Aktivator Inhibitor (PAI) und Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyse Inhibitor (TAFI) gestoppt. Insgesamt ist die Sepsis also eher von einer Hypofibrinolyse begleitet. Dies steigert weiter die thrombotische Gefahr während der Sepsis (Emonts et al., 2008; Kidokoro, Iba, & Hong, 2000).

Tatsächlich konnten einige Studien zeigen, dass es eine Korrelation zwischen erhöhten PAI-Konzentrationen und Organversagen gibt (Semeraro, Ammollo, Semeraro, & Colucci, 2010).

Außerdem trägt der Konzentrationsabfall von Antithrombin (AT) und aktiviertem Protein C (APC) als wichtige Gegenregulatoren der Hämostase ebenfalls zum Organversagen und der erhöhten Mortalität bei (Dellinger et al., 2013; Dhainaut et al., 2005).

Auch steigende Schädigungen des Gefäßendothels treiben durch Entzündung die Sepsis weiter voran und tragen zur weiteren Verschlimmerung des Organversagens bei (Schouten, Wiersinga, Levi, & van der Poll, 2008).

### **8.3 Interpretation der Ergebnisse**

Die Rolle des Prothrombins in der Gerinnung ist allgemein bekannt. Die extrahepatische Expression von F2 und mögliche Funktionen in Bezug auf das System der Lunge wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der D-Insight-, F2-Knockdown- und Cd11c cre- Knockout-Tiermodelle genauer untersucht und analysiert.

Die im Labor vorbekannte Feststellung der extrahepatischen F2-Expression in der Lunge (Abbildung 7) konnte reproduziert werden. Mit Hilfe von Firefly-Luciferase-Analysen aus Bronchioalveolarlavage-Zellen wurden Alveolarmakrophagen als Ursprung der F2-Expression identifiziert (Abbildung 10). Obwohl dies eindeutige Ergebnisse sind, lassen die Experimente unklar, ob die Alveolarmakrophagen alleinige Quelle des Signals sind. In Abbildung 7 ist das Firefly-Luciferase Signal des Zwischenrippenraums am oberen Rand der messbaren Skala. Da die Verteilungsdichte der Alveolarmakrophagen mit ca. einem Alveolarmakrophagen pro drei Alveolen nicht sehr hoch ist, erscheint das gemessene Signal zu stark unter der Annahme, dass Alveolarmakrophagen die einzigen F2-exprimierenden Zellen sind. Auch die Ergebnisse aus den BAL-

Lysaten unterstreichen diese Differenz (Abbildung 10). Durch die Normalisierung der Ergebnisse zur genomischen DNA müssten die Ergebnisse aus der gesamten BAL mit dem der Siglec f+ Zellen annähernd übereinstimmen. Dies ist allerdings nicht der Fall. Tatsächlich beträgt das FLUC-Signal der Siglec f+ Zellen nur 33,1% des FLUC-Signals des BAL-Gesamtzelllysats. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass die Alveolarmakrophagen durch den Prozess der MACS-Sortierung stressbedingt ihre Aktivität einstellen und entsprechend weniger F2 produzieren. Eine Erholung der Alveolarmakrophagen in Zellkultur konnte nicht ermöglicht werden, da Alveolarmakrophagen nur schwer kultivierbar sind und innerhalb weniger Stunden oder Tage ihre Zellaktivität vollständig einstellen. Für diese Annahme spricht, dass der Gesamtanteil der Alveolarmakrophagen am Bronchioalveolarlavage 94,6% entspricht und die verbleibenden 5,4% variabler Zellen nicht ausreichend das „Delta“ zwischen den Luciferase-Signalen der gesamten BAL und der Siglec f+ Zellen erklären können (Abbildung 10). Eine Beteiligung anderer Zellen am starken F2-Signal der Lunge kann aber nicht gänzlich ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Experimente. Nichtsdestotrotz verfügen Alveolarmakrophagen über eine F2-Expression. Die Expression in den Alveolarmakrophagen ist insgesamt nicht zu vernachlässigen. Vergleicht man die F2-Expression der Alveolarmakrophagen mit derjenigen der Leber kommt man zu dem Schluss, dass bezogen auf den einzelnen Alveolarmakrophagen die gemessene Prothrombin-Expression sehr hoch ist. Legt man die Theorie zu Grunde, dass die Alveolarmakrophagen bei der MACS-Sortierung inaktiviert werden und setzt das Signal des gesamten Bronchioalveolarlavage als Alveolarmakrophagen-Signal zu Grunde, so beträgt die F2-Expression der Alveolarmakrophagen 56,3% der F2-Expression in Hepatozyten. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Prothrombin in den Alveolarmakrophagen eine entscheidende Rolle haben muss. Betrachtet man allerdings die Anzahl der Alveolarmakrophagen in der Lunge im Vergleich zu der Anzahl der Leberzellen, so ist das Signal der Leber insgesamt deutlich höher und die extrahepatische Lungenexpression insgesamt eher niedrig. Trotzdem wirft die Entdeckung eines für den einzelnen Alveolarmakrophagen so starken F2-Signals Fragen nach der Funktion in

Bezug auf die Lunge auf. Besonders, da sich das von Alveolarmakrophagen gebildete Prothrombin aufgrund der räumlichen Lage der Alveolarmakrophagen luminal befindet. Der Alveolarmakrophage könnte möglicherweise sogar die einzige Quelle für luminal gelegenes Prothrombin sein. Denn mit einer Größe von 72 kDa kann das intravasale Prothrombin ähnlich zu anderen intravasalen Proteinen wie zum Beispiel Albumin unter normalen Umständen nicht nach extravasal gelangen und verbleibt strikt vaskulär.

Untersucht wurden die möglichen Funktionen der luminalen F2-Expression der Alveolarmakrophagen im Kontext proinflammatorischer Immunprozesse in der Lunge. Obwohl die F2-Expression in der Lunge insgesamt nicht das Gesamtüberleben in der Septikämie beeinflusst (Abbildung 12), wurden mit Hilfe des Experimentsetups einige Interaktionen von F2 mit immunologisch wichtigen Signalwegstationen im Alveolarmakrophagen entdeckt.

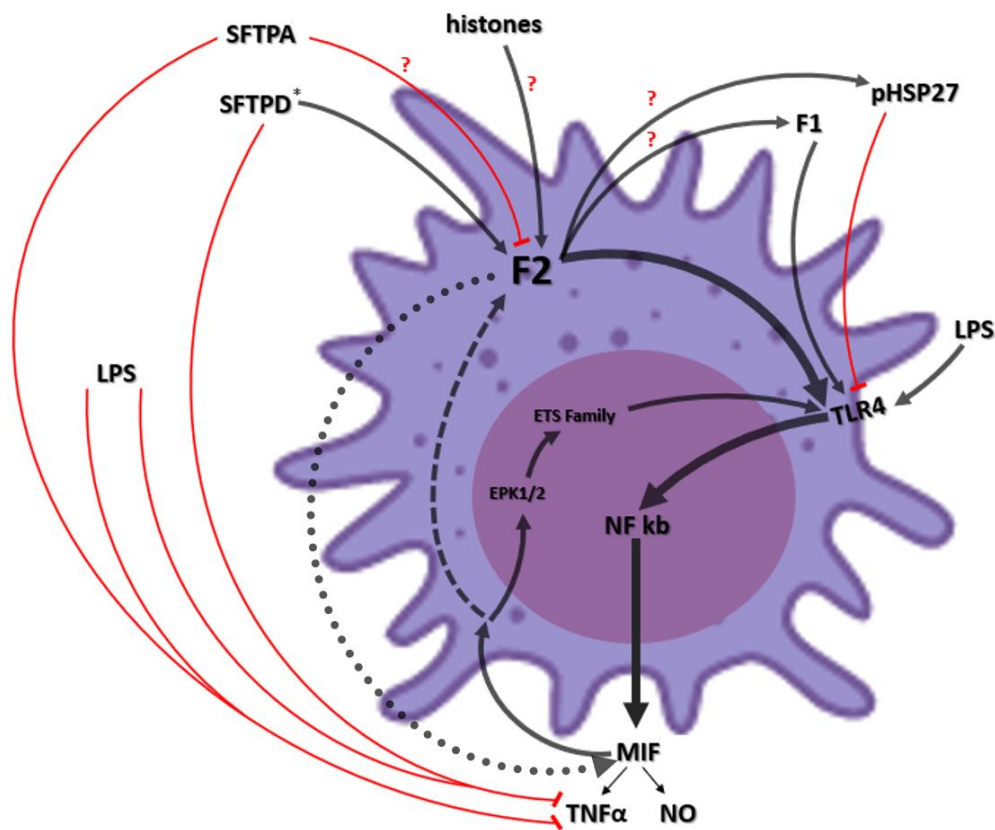
Bedeutende Funktion im Gesamtbild kommt der MIF-Produktion durch F2-Expression zu. MIF als Zytokin vor allem der angeborenen Immunität ist an der Pathogenese verschiedener immunologisch getriggelter Erkrankungen beteiligt, deren Ursprung häufig in der Lunge zu finden ist. Eine dieser Erkrankungen ist z.B. die Sepsis. Sie ist bis heute ein globales Gesundheitsproblem mit hoher Letalität und die Heilung an Sepsis erkrankter Menschen ist schwierig und gelingt oft nicht. Einblicke in die Regulation von MIF können zum Erkenntnisgewinn und ggf. zukünftig zur Verbesserung der Behandlung führen. Wie in Abbildung 14 dargestellt, konnte eine Involvierung von F2 in die Produktion und Freisetzung von MIF in Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden. Während die MIF-Produktion nach Stimulation mit LPS in Wildtyp Alveolarmakrophagen signifikant ansteigt, bleibt eine signifikante Steigerung der MIF-Produktion in F2-Knockout-Alveolarmakrophagen aus. Kritisch muss allerdings betrachtet werden, dass es bei genauerer Analyse zu einem minimalen Anstieg in den Knockout Alveolarmakrophagen kommt. Dieser Anstieg beträgt immerhin 31% des Anstiegs in Wildtyp Alveolarmakrophagen. Dies ist zwar mit einem p-Wert von 0,06 formal nicht signifikant und kann dem Zufall der Messungen unterliegen, allerdings hätte eine weitere, hier nicht durchgeführte Versuchsreihe ggf. das Ergebnis in Richtung Signifikanz

verschieben können. Dies legt die Vermutung nahe, dass die F2-Expression zwar maßgeblich für die MIF-Produktion und Freisetzung verantwortlich ist, aber wahrscheinlich nicht alleiniger Trigger ist und weitere Faktoren unabhängig von F2, wenn auch nur geringfügig, zur Steigerung von MIF beitragen können.

Die bisherigen gewonnenen Erkenntnisse des Zusammenhangs zwischen F2-Expression und MIF-Freisetzung werden zusätzlich durch die Untersuchungen zu TNF $\alpha$  unterstützt. Bisherige wissenschaftliche Bemühungen haben bereits den Zusammenhang zwischen MIF und TNF $\alpha$  hergestellt (Calandra et al., 1994). Die hier erarbeiteten Ergebnisse zur Abhängigkeit der TNF $\alpha$ -Produktion von der F2-Expression in den Alveolarmakrophagen (Abbildung 15), bestätigen das Bild einer immunologischen Kaskade, die durch F2 über MIF zur Freisetzung von TNF $\alpha$  und nachfolgenden Effekten führt.

Ebenfalls in Zusammenhang mit MIF steht die Expression von TLR-4. In MIF-Knockdown-Mäusen konnte bereits eine Minderung der TLR4-Expression nachgewiesen werden (Roger et al., 2001).

Durch die in Abbildung 17 dargestellten Versuchsergebnisse wird auch hier verifiziert, dass die durch MIF bekannte Steuerung der TLR4-Expression abhängig von der F2-Expression der Alveolarmakrophagen ist. Eine 100%ige Herunterregulation wird nicht erreicht, allerdings wurde im Versuchsaufbau das Knockdown-Modell verwendet, was nicht zu 100% zur Depletion von F2 im Vergleich zu einem Knockout-Modell führt, weshalb ein vollständiges Ausbleiben der TLR-4 Expression nicht zu erwarten ist. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass wie bereits vermutet, weitere Faktoren die MIF- und TLR-4-Expression unabhängig von F2 regulieren können. Insgesamt bieten die bisherigen Ergebnisse die Annahme des folgenden dargestellten Modells.



**Abbildung 19: Potenzielles pro-inflammatorisches Signal durch die F2-Expression in den Alveolarmakrophagen mit autoregulatorischer Schleife.**

Übersicht über die aufgrund der Versuchsergebnisse gewonnenen Erkenntnisse der Signalwege von Prothrombin in Alveolarmakrophagen. Vermutete, aber nicht explizit nachgewiesene Zusammenhänge sind mit Fragezeichen gekennzeichnet und sind Bestandteil der Diskussion dieser Arbeit.

Es ergibt sich durch die F2-Expression in Alveolarmakrophagen ein Hauptvektor der Signalkaskade. Dieser ist in der Abbildung 19 anhand der intensiv schwarzen Pfeile sichtbar. Die extrahepatische F2-Expression in den Alveolarmakrophagen führt zur gesteigerten Produktion von TLR-4-Rezeptoren. Durch die dann gesteigerte Integration dieser Rezeptoren in die Zelloberfläche, würden die Alveolarmakrophagen sensibler für LPS von Pathogenen der Lunge. So könnte bei kleinsten Mengen von LPS bereits eine proinflammatorische Reaktion ausgelöst werden. Durch die intrazellulären Mechanismen der TLR-4 käme es folglich zur gesteigerten Produktion und Freisetzung von *Macrophage Migration Inhibiting Factor (MIF)*. Die einzelnen

Unterpunkte dieses Signalwegs zwischen TLR4 und MIF sind allerdings noch unklar. Wahrscheinlich ist eine Aktivierung der MIF-Produktion und Induktion auf transkriptioneller Ebene über NfκB (Kim et al., 2017). Die intraalveoläre Thrombinverfügbarkeit würde somit die Suszeptibilität der Alveolarmakrophagen gegenüber LPS modulieren.

Eine direkte Aktivierung der MIF-Synthese durch Prothrombin kann allerdings nicht ausgeschlossen werden und ist durchaus, ggf. auch zusätzlich, möglich. Dies ist in der Abbildung 19 anhand des gepunkteten Pfeils dargestellt.

Der genaue Prozess muss in weiteren Experimenten analysiert werden.

Die nun freigesetzten MIF-Moleküle dienen als Treiber-Zytokin und führen zur weiteren Aktivierung des Alveolarmakrophagen, welcher dann auch unter anderem TNFα bildet und freisetzt. Durch diesen von F2 modulierten Prozess, entsteht durch den Alveolarmakrophagen ein proinflammatorisches Umfeld in der Lunge.

Diese proinflammatorische Reaktion würde zusätzlich durch einen autoregulatorischen Prozess verstärkt. Ein Teil des freigesetzten MIF aus den Alveolarmakrophagen kann durch Endozytose wieder in den Alveolarmakrophagen aufgenommen werden. Die Ergebnisse in Abbildung 16 zeigen, dass MIF regulatorische Wirkung auf die F2-Expression hat und zu einer geringfügigen, aber signifikanten Erhöhung von F2 führt. Erhöhte F2-Expression führt dann wieder zur erhöhten MIF-Bildung. Dies würde einem autoregulatorischen positiven Feedback-Loop gleichkommen, wonach MIF die F2-Expression in den Alveolarmakrophagen induziert, sodass bei drohender Gefahr durch Endotoxine von Pathogenen schnell proinflammatorische Ressourcen mobilisiert werden könnten. Dieser Aspekt könnte zusätzlich durch einen integrierten kleinen Loop unterstützt sein. Das wiederaufgenommene MIF kann über Aktivierung von EPK1/2 und der nachfolgenden ETS-Familie ebenfalls die Produktion und Expression von TLR4 steigern (Roger et al., 2001).

Weitere Ergebnisse aus Abbildung 16 zeigen, dass die im Alveolarmakrophagen durch F2 ausgelöste proinflammatorische Schleife auch

durch die Umgebung der Alveolarmakrophagen beeinflusst werden kann. Durch Stimulation der Alveolarmakrophagen mit *Surfactant Protein D (SFTPD)* als wichtiger Bestandteil des den Alveolarmakrophagen umhüllenden Surfactants, wird die F2-Expression um das Vierfache erhöht. *Surfactant Protein D* ist ebenso wie *Surfactant Protein A (SFTPA)* als Teil der C-Typ-Lektin-Familie in die Erkennung von verschiedenen Pathogenen wie Viren, Bakterien und Pilzen involviert (Brummer & Stevens, 2010; Sano et al., 2006; Silveyra & Floros, 2012). So könnten neben LPS als Endotoxin auch weitere Bestandteile von Pathogenen über SFTPD zur Aktivierung der F2-abhängigen pro-inflammatorischen Schleife führen. Obwohl hier nicht untersucht, gibt es Hinweise, dass SFTPA im Gegensatz zu SFTPD ggf. inhibitorisch auf F2 wirken könnte, da es einen verstärkten Abbau von TLR4 bewirkt (Freundt et al., 2022).

Eine Beeinflussung der F2-Expression durch weitere pathogene Faktoren wie RNA konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Abbildung 16). Allerdings kommt es in dem Versuch mit DNA trotzdem zu einem geringfügigen Anstieg in der F2-Expression. Obwohl dieser mit einem p-Wert von 0,059 formal nicht signifikant ist, stellt sich die Frage, ob DNA eventuell doch Teil eines Aktivierungsprozess der F2-Expression sein könnte und das experimentelle Setup mit stark aufgereinigter DNA ohne Histone und weitere immunologische Bestandteile aus der Lungenumgebung einen solchen Prozess nicht erfassen kann. Dies wird vor allem durch die Beobachtung untermauert, dass Histone in Kombination mit DNA als Bestandteil von *Neutrophil Extracellular Traps (NETs)* nach Fragmentierung zu TLR4 Aktivierung und Rekrutierung führt (Tsourouktsoglou et al., 2020). Ein solcher Zusammenhang konnte hier nicht explizit untersucht werden und erfordert weitere Experimente.

Eine weitere Verstärkung der TLR4-Expression in einer zweiten kleinen Schleife ist durch Fibrinogen (F1) vorstellbar. Fibrinogen kann über Rekrutierung von diversen Chemokinen Funktionen von TLR4 induzieren. Dies führt zur Aktivierung von NFkB (Sitrin, Pan, Srikanth, & Todd, 1998; Smiley, King, & Hancock, 2001).

Der Einfluss von F2 auf F1 ist allerdings noch nicht nachgewiesen und erfordert weitere Experimente.

Bisherige beschriebene Mechanismen dienen überwiegend der Verstärkung des dargestellten proinflammatorischen Loops. Damit es zu keiner extremen proinflammatorischen Überreaktion in den Alveolarmakrophagen kommt, müssen ähnlich wie bei anderen Kaskaden auch inhibitorische Prozesse eingreifen. Die Steigerung der Inflammation könnte durch die Lebenszeit der Alveolarmakrophagen eingeschränkt sein. Durch deren Turnover käme es zur Termination des proinflammatorischen Autoloops. Vorstellbar ist auch, dass bestimmte Substanzen über pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen verfügen. *Surfactant Protein D* kann neben seiner expressionssteigernden Wirkung auf F2 in Alveolarmakrophagen auch die proinflammatorischen Effekte des freigesetzten TNF $\alpha$  inhibieren (Hortobagyi et al., 2008). Dies geschieht in ähnlicher Weise auch durch *Surfactant Protein A* (Alcorn & Wright, 2004). Ein weiterer Angriffspunkt einer Regulierung der proinflammatorischen Signalwege setzt am TLR4 an.

*Phosphorylated Heat Shock Protein 27* (pHSP27) bzw. *Heat Shock Protein 25* (Hsp25) in murinen Zellen, kann LPS induzierte Entzündung durch endozytotische Aufnahme, Ubiquitinierung und anschließenden Abbau verhindern. Dies ist in erster Linie für Thp1-Zellen nachgewiesen (Li et al., 2019). Ein Nachweis speziell für Alveolarmakrophagen und der Zusammenhang der F2-Expression mit pHSP27 ist denkbar, aber bisher noch nicht nachgewiesen.

#### **8.4 Limitationen der Arbeit**

Die Arbeit zeigte, dass Alveolarmakrophagen eine Quelle der extrahepatischen Prothrombin-Expression sind. Die luminale F2-Expression führte zur gesteigerten Expression von TLR4 und gesteigerten Sekretion von MIF und TNF $\alpha$ . Dies könnte im Wesentlichen zu einem proinflammatorischen Milieu beitragen. Die F2-Expression unterliegt dabei wahrscheinlich sowohl einer Autoregulation durch MIF als auch einer Regulation durch andere Substanzen aus der Lungenumgebung wie *Surfactant Protein D*.

Einschränkend sei hier anzumerken, dass die Ergebnisse der Arbeit nur im Rahmen der Untersuchung von Mausmodellen gewonnen wurden. Der

Nachweis einer Prothrombin-Expression und deren mögliche Funktion in Alveolarmakrophagen des Menschen ist nicht erfolgt.

Aufgrund der schweren Anzucht von Alveolarmakrophagen in der Zellkultur und dem damit verbundenen hohen Aufwand in der Mauszucht erfolgten die Versuche in geringer Anzahl. Weitere Versuche könnten Veränderungen in der Signifikanz ergeben.

## **8.5 Empfehlungen für zukünftige Forschung**

Künftige Arbeiten könnten durch Gewinnung von Bronchioalveolarlavage des Menschen und Luciferase-Assays eine Prothrombin-Expression im Menschen nachweisen. Zur Gewinnung weiterer Einblicke in eine mögliche Funktion der Prothrombin-Expression in Alveolarmakrophagen könnten einige der in dieser Arbeit verwendeten Experimente abgewandelt werden. So könnte zum Beispiel ein möglicher inhibitorischer Einfluss von *Surfactant Protein A* auf die Prothrombin-Expression durch Stimulation von Alveolarmakrophagen aus D-Insight-Mäusen in Zellkultur mit SFTPA und anschließender Messung der Prothrombin-Expression mit Hilfe des Luciferase-Assays erfolgen.

Auch der Einfluss von DNA könnte durch Verwendung von nicht aufgereinigter DNA mit noch vorhandenen Histonen durch Zellkultur-Stimulation und Luciferase-Assays untersucht und erneut evaluiert werden.

Durch die Verwendung von Alveolarmakrophagen aus F2-Knockdown- oder F2-Knockout-Mäusen wäre auch die Untersuchung eines Einflusses von Prothrombin auf pHSP27 oder F1 durch entsprechende ELISA-Kits denkbar. Da das Gesamtüberleben durch einen alveolären F2-Kockout nicht verändert wird, aber die intraalveoläre Thrombinverfügbarkeit vermutlich die Suszeptibilität der Alveolarmakrophagen gegenüber LPS moduliert, könnten Versuche mit Thrombin-Inhibitoren genauere Erkenntnisse über die für einen Überlebensvorteil benötigte Thrombinmenge in den Alveolarmakrophagen bei inflammatorischen Erkrankungen bewirken.

## 9 Zusammenfassung

Prothrombin wird bekanntermaßen hauptsächlich in der Leber exprimiert. Dennoch gibt es extrahepatische Prothrombin-Expression. Der Ursprung der Prothrombin-Expression der Lunge lässt sich auf den Alveolarmakrophagen als wichtigen Regulator der angeborenen und erworbenen Immunität in der Lunge zurückführen. Die hier gewonnenen Ergebnisse und weitere Erkenntnisse aus der wissenschaftlichen Literatur ermöglichen es proinflammatorische Prozesse speziell in Alveolarmakrophagen näher zu beleuchten. Die F2-Expression in den Alveolarmakrophagen bringt in einem Sepsismodell zwar keine Veränderung im Gesamtüberleben, dennoch kommt der F2-Expression eine wichtige Funktion in der Auslösung und Kontrolle von proinflammatorischen Prozessen zu.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die F2-Expression zur Steigerung von *Toll-like-Rezeptor-4*, *Macrophage Migration Inhibiting-Factor* und *Tumor Necrosis Factor alpha* führt. Des Weiteren zeigen die Experimente, dass eine Regulation der F2-Expression über *Macrophage Migration Inhibiting Factor* und *Surfactant Protein D* möglich ist.

Es entsteht ein Gesamtbild eines Alveolarmakrophagen, der Prothrombin-gesteuert proinflammatorische Signalwege aktiviert und zur Ausschüttung von Zytokinen führt. F2 spielt dabei eine wesentliche Rolle und kann durch intra- und extrazelluläre Faktoren beeinflusst werden.

Die sich selbst steigernde proinflammatorische Schleife, die durch F2 gestartet wird und über die Expression und Aktivierung von TLR-4 zur Ausschüttung von MIF und nachfolgend auch zur Ausschüttung von TNF $\alpha$  führt, kann entscheidend zu bestimmten akuten Lungenerkrankungen beitragen.

Ebenso wie andere Kaskaden, ist diese Schleife nicht unkontrolliert und antiinflammatorische Faktoren führen wahrscheinlich zu einem Gleichgewicht.

Möglich ist auch eine Terminierung der Schleife durch den Untergang der Prothrombin-exprimierenden Zellen. Die Untersuchung der genauen Zwischenschritte bzw. ggf. auch Störungen dieser hier erarbeiteten Reaktionsschleifen kann zu dem Verständnis inflammatorischer Lungenerkrankungen beitragen und sollte zur Verbesserung von Therapien weiter Ziel der Forschung bleiben.

## 10 Referenzen

- Adams, G. N., Rosenfeldt, L., Frederick, M., Miller, W., Waltz, D., Kombrinck, K., . . . Palumbo, J. S. (2015). Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen. *Cancer Res*, 75(19), 4235-4243. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0964
- Alcorn, J. F., & Wright, J. R. (2004). Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(1), L129-136. doi:10.1152/ajplung.00427.2002
- Allard, B., Panariti, A., & Martin, J. G. (2018). Alveolar Macrophages in the Resolution of Inflammation, Tissue Repair, and Tolerance to Infection. *Front Immunol*, 9, 1777. doi:10.3389/fimmu.2018.01777
- Androulidaki, A., Iliopoulos, D., Arranz, A., Doxaki, C., Schworer, S., Zacharioudaki, V., . . . Tsatsanis, C. (2009). The kinase Akt1 controls macrophage response to lipopolysaccharide by regulating microRNAs. *Immunity*, 31(2), 220-231. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.024
- Angus, D. C., & van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369(21), 2063. doi:10.1056/NEJMc1312359
- Astrup, T. (1956). The biological significance of fibrinolysis. *Lancet*, 271(6942), 565-568. doi:10.1016/s0140-6736(56)92048-7
- Aukrust, P., Halvorsen, B., Yndestad, A., Ueland, T., Oie, E., Otterdal, K., . . . Damas, J. K. (2008). Chemokines and cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11), 1909-1919. doi:10.1161/ATVBAHA.107.161240
- Bae, J. S., Kim, Y. U., Park, M. K., & Rezaie, A. R. (2009). Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase. *J Cell Physiol*, 219(3), 744-751. doi:10.1002/jcp.21718
- Barr, A. J., Brass, L. F., & Manning, D. R. (1997). Reconstitution of receptors and GTP-binding regulatory proteins (G proteins) in Sf9 cells. A direct evaluation of selectivity in receptor.G protein coupling. *J Biol Chem*, 272(4), 2223-2229. doi:10.1074/jbc.272.4.2223
- Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., Mannori, G., & Cecconi, O. (1994). Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. *Annu Rev Med*, 45, 361-378. doi:10.1146/annurev.med.45.1.361
- Blaschke, E., Eklund, A., Skog, S., & Danielsson, B. (1985). Isolation of human alveolar macrophages and lymphocytes from bronchoalveolar lavage fluid by centrifugal elutriation. *Scand J Clin Lab Invest*, 45(8), 691-696. doi:10.1080/00365518509155281

- Bogatkevich, G. S., Ludwicka-Bradley, A., & Silver, R. M. (2009). Dabigatran, a direct thrombin inhibitor, demonstrates antifibrotic effects on lung fibroblasts. *Arthritis Rheum*, *60*(11), 3455-3464. doi:10.1002/art.24935
- Bombeli, T., Mueller, M., & Haeberli, A. (1997). Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost*, *77*(3), 408-423.
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., . . . Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, *101*(6), 1644-1655. doi:10.1378/chest.101.6.1644
- Borissoff, J. I., Spronk, H. M., Heeneman, S., & ten Cate, H. (2009). Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? *Cardiovasc Res*, *82*(3), 392-403. doi:10.1093/cvr/cvp066
- Born, G. V. (1970). Observations on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate. *J Physiol*, *209*(2), 487-511. doi:10.1113/jphysiol.1970.sp009176
- Bourdonnay, E., Zaslona, Z., Penke, L. R., Speth, J. M., Schneider, D. J., Przybranowski, S., . . . Peters-Golden, M. (2015). Transcellular delivery of vesicular SOCS proteins from macrophages to epithelial cells blunts inflammatory signaling. *J Exp Med*, *212*(5), 729-742. doi:10.1084/jem.20141675
- Brinkhous, K. M., & Mason, R. G. (1972). Fibrinogen: requirement for platelet aggregation and adhesion. *Acta Univ Carol Med Monogr*, *53*, 9-16.
- Broos, K., Feys, H. B., De Meyer, S. F., Vanhoorelbeke, K., & Deckmyn, H. (2011). Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*, *25*(4), 155-167. doi:10.1016/j.blre.2011.03.002
- Brummer, E., & Stevens, D. A. (2010). Collectins and fungal pathogens: roles of surfactant proteins and mannose binding lectin in host resistance. *Med Mycol*, *48*(1), 16-28. doi:10.3109/13693780903117473
- Buchacher, T., Ohradanova-Repic, A., Stockinger, H., Fischer, M. B., & Weber, V. (2015). M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen *Chlamydia pneumoniae*. *PLoS One*, *10*(11), e0143593. doi:10.1371/journal.pone.0143593
- Bugge, T. H., Flick, M. J., Danton, M. J., Daugherty, C. C., Romer, J., Dano, K., . . . Degen, J. L. (1996). Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(12), 5899-5904. doi:10.1073/pnas.93.12.5899

- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A., & Bucala, R. (1994). The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med*, 179(6), 1895-1902. doi:10.1084/jem.179.6.1895
- Calandra, T., & Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 3(10), 791-800. doi:10.1038/nri1200
- Camerer, E., Huang, W., & Coughlin, S. R. (2000). Tissue factor- and factor X-dependent activation of protease-activated receptor 2 by factor VIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(10), 5255-5260. doi:10.1073/pnas.97.10.5255
- Cecconi, M., Evans, L., Levy, M., & Rhodes, A. (2018). Sepsis and septic shock. *Lancet*, 392(10141), 75-87. doi:10.1016/S0140-6736(18)30696-2
- Chen, D., & Dorling, A. (2009). Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 122-126. doi:10.1111/j.1538-7836.2009.03413.x
- Chen, J., Ishii, M., Wang, L., Ishii, K., & Coughlin, S. R. (1994). Thrombin receptor activation. Confirmation of the intramolecular tethered liganding hypothesis and discovery of an alternative intermolecular liganding mode. *J Biol Chem*, 269(23), 16041-16045.
- Chen, Z., Pelc, L. A., & Di Cera, E. (2010). Crystal structure of prethrombin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(45), 19278-19283. doi:10.1073/pnas.1010262107
- Chung, S. W., Park, J. W., Lee, S. A., Eo, S. K., & Kim, K. (2010). Thrombin promotes proinflammatory phenotype in human vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 396(3), 748-754. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.009
- Cirino, G., Cicala, C., Bucci, M. R., Sorrentino, L., Maraganore, J. M., & Stone, S. R. (1996). Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J Exp Med*, 183(3), 821-827. doi:10.1084/jem.183.3.821
- Constantine, H., Dautrebande, L., Kaltreider, N., Lovejoy, F. W., Jr., Morrow, P., & Perkins, P. (1959). Influence of carbachol and of fine dust aerosols upon the breathing mechanics and the lung volumes of normal subjects and of patients with chronic respiratory disease before and after administering sympathomimetic aerosols. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 123, 239-252.
- Cook, S. M., Skora, A., Gillen, C. M., Walker, M. J., & McArthur, J. D. (2012). Streptokinase variants from *Streptococcus pyogenes* isolates display

- altered plasminogen activation characteristics - implications for pathogenesis. *Mol Microbiol*, 86(5), 1052-1062. doi:10.1111/mmi.12037
- Coughlin, S. R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*, 407(6801), 258-264. doi:10.1038/35025229
- Danckwardt, S., Gantzert, A. S., Macher-Goeppinger, S., Probst, H. C., Gentzel, M., Wilm, M., . . . Kulozik, A. E. (2011). p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell*, 41(3), 298-310. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.032
- Danckwardt, S., Hentze, M. W., & Kulozik, A. E. (2013). Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med (Berl)*, 91(11), 1257-1271. doi:10.1007/s00109-013-1074-5
- Davie, E. W., Fujikawa, K., & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*, 30(43), 10363-10370. doi:10.1021/bi00107a001
- Davie, E. W., & Kulman, J. D. (2006). An overview of the structure and function of thrombin. *Semin Thromb Hemost*, 32 Suppl 1, 3-15. doi:10.1055/s-2006-939550
- Davie, E. W., & Ratnoff, O. D. (1964). Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*, 145(3638), 1310-1312. doi:10.1126/science.145.3638.1310
- Dellinger, R. P., Levy, M. M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S. M., . . . Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric, S. (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med*, 39(2), 165-228. doi:10.1007/s00134-012-2769-8
- Detser, S., Stampfl, B., & Wetzstein, R. (1965). [Changes in the shape of thrombocytes in an experimental thrombus]. *Verh Anat Ges*, 115, 221-231.
- Dhainaut, J. F., Shorr, A. F., Macias, W. L., Kollef, M. J., Levi, M., Reinhart, K., & Nelson, D. R. (2005). Dynamic evolution of coagulopathy in the first day of severe sepsis: relationship with mortality and organ failure. *Crit Care Med*, 33(2), 341-348. doi:10.1097/01.ccm.0000153520.31562.48
- Dihanich, M., Kaser, M., Reinhard, E., Cunningham, D., & Monard, D. (1991). Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron*, 6(4), 575-581. doi:10.1016/0896-6273(91)90060-d
- Donovan, F. M., Pike, C. J., Cotman, C. W., & Cunningham, D. D. (1997). Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a

- pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities. *J Neurosci*, 17(14), 5316-5326.
- Emonts, M., de Bruijne, E. L., Guimaraes, A. H., Declerck, P. J., Leebeek, F. W., de Maat, M. P., . . . Gils, A. (2008). Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is associated with severity and outcome of severe meningococcal infection in children. *J Thromb Haemost*, 6(2), 268-276. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02841.x
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101(4), 890-898. doi:10.1172/JCI11112
- Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., & Balducci, D. (2003). Clotting mechanisms and cancer: implications in thrombus formation and tumor progression. *Clin Adv Hematol Oncol*, 1(11), 673-678.
- Fear, J. D., Miloszewski, K. J., & Losowsky, M. S. (1984). An acquired inhibitor of factor XIII with a qualitative abnormality of fibrin cross-linking. *Acta Haematol*, 71(5), 304-309. doi:10.1159/000206606
- Fearnley, G. R., & Lackner, R. (1955). The fibrinolytic activity of normal blood. *Br J Haematol*, 1(2), 189-198. doi:10.1111/j.1365-2141.1955.tb05500.x
- Fernandez, S., Jose, P., Avdiushko, M. G., Kaplan, A. M., & Cohen, D. A. (2004). Inhibition of IL-10 receptor function in alveolar macrophages by Toll-like receptor agonists. *J Immunol*, 172(4), 2613-2620. doi:10.4049/jimmunol.172.4.2613
- Fields, B. S., Benson, R. F., & Besser, R. E. (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*, 15(3), 506-526. doi:10.1128/cmr.15.3.506-526.2002
- Freundt, K., Herzmann, C., Biedziak, D., Scheffzuk, C., Gaede, K. I., & Stamme, C. (2022). Surfactant Protein A Enhances the Degradation of LPS-Induced TLR4 in Primary Alveolar Macrophages Involving Rab7, beta-arrestin2, and mTORC1. *Infect Immun*, 90(2), e0025021. doi:10.1128/IAI.00250-21
- Gao, X., Dong, Y., Liu, Z., & Niu, B. (2013). Silencing of triggering receptor expressed on myeloid cells-2 enhances the inflammatory responses of alveolar macrophages to lipopolysaccharide. *Mol Med Rep*, 7(3), 921-926. doi:10.3892/mmr.2013.1268
- Garcia-Lopez, M. T., Gutierrez-Rodriguez, M., & Herranz, R. (2010). Thrombin-activated receptors: promising targets for cancer therapy? *Curr Med Chem*, 17(2), 109-128. doi:10.2174/092986710790112639

- Garcia, P. S., Gulati, A., & Levy, J. H. (2010). The role of thrombin and protease-activated receptors in pain mechanisms. *Thromb Haemost*, 103(6), 1145-1151. doi:10.1160/TH09-12-0848
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327(5966), 656-661. doi:10.1126/science.1178331
- Gerszten, R. E., Garcia-Zepeda, E. A., Lim, Y. C., Yoshida, M., Ding, H. A., Gimbrone, M. A., Jr., . . . Rosenzweig, A. (1999). MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*, 398(6729), 718-723. doi:10.1038/19546
- Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D., & Kaufmann, R. (2013). Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal*, 11, 86. doi:10.1186/1478-811X-11-86
- Gleissner, C. A., von Hundelshausen, P., & Ley, K. (2008). Platelet chemokines in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(11), 1920-1927. doi:10.1161/ATVBAHA.108.169417
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, 5(12), 953-964. doi:10.1038/nri1733
- Griffin, J. H. (1995). Blood coagulation. The thrombin paradox. *Nature*, 378(6555), 337-338. doi:10.1038/378337a0
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., . . . Lambrecht, B. N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med*, 210(10), 1977-1992. doi:10.1084/jem.20131199
- Guth, A. M., Janssen, W. J., Bosio, C. M., Crouch, E. C., Henson, P. M., & Dow, S. W. (2009). Lung environment determines unique phenotype of alveolar macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 296(6), L936-946. doi:10.1152/ajplung.90625.2008
- Habibzay, M., Saldana, J. I., Goulding, J., Lloyd, C. M., & Hussell, T. (2012). Altered regulation of Toll-like receptor responses impairs antibacterial immunity in the allergic lung. *Mucosal Immunol*, 5(5), 524-534. doi:10.1038/mi.2012.28
- Halkar, M., & Lincoff, A. M. (2016). Dual antiplatelet therapy for acute coronary syndromes: How long to continue? *Cleve Clin J Med*, 83(9), 675-688. doi:10.3949/ccjm.83a.15092
- Hardaway, R. M., Williams, C. H., & Vasquez, Y. (2001). Disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Semin Thromb Hemost*, 27(6), 577-583. doi:10.1055/s-2001-18863

- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., . . . Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, *38*(4), 792-804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004
- Hatherley, D., & Barclay, A. N. (2004). The CD200 and CD200 receptor cell surface proteins interact through their N-terminal immunoglobulin-like domains. *Eur J Immunol*, *34*(6), 1688-1694. doi:10.1002/eji.200425080
- Hoffmann, P. R., Kench, J. A., Vondracek, A., Kruk, E., Daleke, D. L., Jordan, M., . . . Fadok, V. A. (2005). Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*, *174*(3), 1393-1404. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1393
- Hortobagyi, L., Kierstein, S., Krytska, K., Zhu, X., Das, A. M., Poulain, F., & Haczku, A. (2008). Surfactant protein D inhibits TNF-alpha production by macrophages and dendritic cells in mice. *J Allergy Clin Immunol*, *122*(3), 521-528. doi:10.1016/j.jaci.2008.05.002
- Hotchkiss, R. S., & Karl, I. E. (2003). The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, *348*(2), 138-150. doi:10.1056/NEJMra021333
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat Rev Immunol*, *13*(12), 862-874. doi:10.1038/nri3552
- Hotchkiss, R. S., & Opal, S. (2010). Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med*, *363*(1), 87-89. doi:10.1056/NEJMcibr1004371
- Hu, S., Zhao, H., Al-Humadi, N. H., Yin, X. J., & Ma, J. K. (2006). Silica-induced apoptosis in alveolar macrophages: evidence of in vivo thiol depletion and the activation of mitochondrial pathway. *J Toxicol Environ Health A*, *69*(13), 1261-1284. doi:10.1080/15287390500361875
- Hung, D. T., Wong, Y. H., Vu, T. K., & Coughlin, S. R. (1992). The cloned platelet thrombin receptor couples to at least two distinct effectors to stimulate phosphoinositide hydrolysis and inhibit adenylyl cyclase. *J Biol Chem*, *267*(29), 20831-20834.
- Hussell, T., & Bell, T. J. (2014). Alveolar macrophages: plasticity in a tissue-specific context. *Nat Rev Immunol*, *14*(2), 81-93. doi:10.1038/nri3600
- Huynh, M. L., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*, *109*(1), 41-50. doi:10.1172/JCI11638

- Ishihara, H., Connolly, A. J., Zeng, D., Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Timmons, C., . . . Coughlin, S. R. (1997). Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*, *386*(6624), 502-506. doi:10.1038/386502a0
- Iskander, K. N., Osuchowski, M. F., Stearns-Kurosawa, D. J., Kurosawa, S., Stepien, D., Valentine, C., & Remick, D. G. (2013). Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. *Physiol Rev*, *93*(3), 1247-1288. doi:10.1152/physrev.00037.2012
- Ito, K., Date, T., Ikegami, M., Hongo, K., Fujisaki, M., Katoh, D., . . . Yoshimura, M. (2013). An immunohistochemical analysis of tissue thrombin expression in the human atria. *PLoS One*, *8*(6), e65817. doi:10.1371/journal.pone.0065817
- Ivey, M. E., & Little, P. J. (2008). Thrombin regulates vascular smooth muscle cell proteoglycan synthesis via PAR-1 and multiple downstream signalling pathways. *Thromb Res*, *123*(2), 288-297. doi:10.1016/j.thromres.2008.04.019
- Iwaki, T., Sandoval-Cooper, M. J., Brechmann, M., Ploplis, V. A., & Castellino, F. J. (2006). A fibrinogen deficiency accelerates the initiation of LDL cholesterol-driven atherosclerosis via thrombin generation and platelet activation in genetically predisposed mice. *Blood*, *107*(10), 3883-3891. doi:10.1182/blood-2005-09-3780
- Iwami, K. I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T., & Yoshikai, Y. (2000). Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol*, *165*(12), 6682-6686. doi:10.4049/jimmunol.165.12.6682
- Janardhan, K. S., Mclsaac, M., Fowlie, J., Shrivastav, A., Caldwell, S., Sharma, R. K., & Singh, B. (2006). Toll like receptor-4 expression in lipopolysaccharide induced lung inflammation. *Histol Histopathol*, *21*(7), 687-696. doi:10.14670/HH-21.687
- Kahn, M. L., Zheng, Y. W., Huang, W., Bigornia, V., Zeng, D., Moff, S., . . . Coughlin, S. R. (1998). A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature*, *394*(6694), 690-694. doi:10.1038/29325
- Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ*, *13*(5), 816-825. doi:10.1038/sj.cdd.4401850
- Key, N. S., Khorana, A. A., Mackman, N., McCarty, O. J., White, G. C., Francis, C. W., . . . Sood, A. K. (2016). Thrombosis in Cancer: Research Priorities Identified by a National Cancer Institute/National Heart, Lung, and Blood Institute Strategic Working Group. *Cancer Res*, *76*(13), 3671-3675. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3100

- Khalil, J., Bensaid, B., Elkacemi, H., Afif, M., Bensaid, Y., Kebdani, T., & Benjaafar, N. (2015). Venous thromboembolism in cancer patients: an underestimated major health problem. *World J Surg Oncol*, *13*, 204. doi:10.1186/s12957-015-0592-8
- Kidokoro, A., Iba, T., & Hong, J. (2000). Role of DIC in multiple organ failure. *Int J Surg Investig*, *2*(1), 73-80.
- Kim, M. J., Kim, W. S., Kim, D. O., Byun, J. E., Huy, H., Lee, S. Y., . . . Choi, I. (2017). Macrophage migration inhibitory factor interacts with thioredoxin-interacting protein and induces NF-kappaB activity. *Cell Signal*, *34*, 110-120. doi:10.1016/j.cellsig.2017.03.007
- Kipnis, E., Guery, B. P., Tournoys, A., Leroy, X., Robriquet, L., Fialdes, P., . . . Fourrier, F. (2004). Massive alveolar thrombin activation in *Pseudomonas aeruginosa*-induced acute lung injury. *Shock*, *21*(5), 444-451. doi:10.1097/00024382-200405000-00008
- Kissel, K., Berber, S., Nockher, A., Santoso, S., Bein, G., & Hackstein, H. (2006). Human platelets target dendritic cell differentiation and production of proinflammatory cytokines. *Transfusion*, *46*(5), 818-827. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00802.x
- Klages, B., Brandt, U., Simon, M. I., Schultz, G., & Offermanns, S. (1999). Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*, *144*(4), 745-754. doi:10.1083/jcb.144.4.745
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, *110*(2), 191-202. doi:10.1016/s0092-8674(02)00827-9
- Koenen, R. R., von Hundelshausen, P., Nesmelova, I. V., Zerneck, A., Liehn, E. A., Sarabi, A., . . . Weber, C. (2009). Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med*, *15*(1), 97-103. doi:10.1038/nm.1898
- Kreff, S., Wolff, J., & Rose, C. (2020). Silicosis: An Update and Guide for Clinicians. *Clin Chest Med*, *41*(4), 709-722. doi:10.1016/j.ccm.2020.08.012
- Kuebler, W. M., Parthasarathi, K., Wang, P. M., & Bhattacharya, J. (2000). A novel signaling mechanism between gas and blood compartments of the lung. *J Clin Invest*, *105*(7), 905-913. doi:10.1172/JCI8604
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., . . . Cheang, M. (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human

- septic shock. *Crit Care Med*, 34(6), 1589-1596.  
doi:10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9
- Kumar, P., Shen, Q., Pivetti, C. D., Lee, E. S., Wu, M. H., & Yuan, S. Y. (2009). Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*, 11, e19.  
doi:10.1017/S1462399409001112
- Lafuse, W. P., Rajaram, M. V. S., Wu, Q., Moliva, J. I., Torrelles, J. B., Turner, J., & Schlesinger, L. S. (2019). Identification of an Increased Alveolar Macrophage Subpopulation in Old Mice That Displays Unique Inflammatory Characteristics and Is Permissive to Mycobacterium tuberculosis Infection. *J Immunol*, 203(8), 2252-2264.  
doi:10.4049/jimmunol.1900495
- Lankhof, H., van Hoeij, M., Schiphorst, M. E., Bracke, M., Wu, Y. P., Ijsseldijk, M. J., . . . Sixma, J. J. (1996). A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost*, 75(6), 950-958.
- Lanuza, M. A., Garcia, N., Gonzalez, C. M., Santafe, M. M., Nelson, P. G., & Tomas, J. (2003). Role and expression of thrombin receptor PAR-1 in muscle cells and neuromuscular junctions during the synapse elimination period in the neonatal rat. *J Neurosci Res*, 73(1), 10-21.  
doi:10.1002/jnr.10576
- Lee, L. (1962). Reticuloendothelial clearance of circulating fibrin in the pathogenesis of the generalized Shwartzman reaction. *J Exp Med*, 115, 1065-1082. doi:10.1084/jem.115.5.1065
- Leem, E., Jeong, K. H., Won, S. Y., Shin, W. H., & Kim, S. R. (2016). Prothrombin Kringle-2: A Potential Inflammatory Pathogen in the Parkinsonian Dopaminergic System. *Exp Neurobiol*, 25(4), 147-155.  
doi:10.5607/en.2016.25.4.147
- Li, J., Qi, X., Jiang, B., Huang, T., Luo, L., Liu, S., & Yin, Z. (2019). Phosphorylated Heat Shock Protein 27 Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammation in Thp1 Cells by Promoting TLR4 Endocytosis, Ubiquitination, and Degradation. *Inflammation*, 42(5), 1788-1799.  
doi:10.1007/s10753-019-01041-x
- Longstaff, C. (2018). Measuring fibrinolysis: from research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost*, 16(4), 652-662. doi:10.1111/jth.13957
- Loof, T. G., Morgelin, M., Johansson, L., Oehmcke, S., Olin, A. I., Dickneite, G., . . . Herwald, H. (2011). Coagulation, an ancestral serine protease cascade, exerts a novel function in early immune defense. *Blood*, 118(9), 2589-2598. doi:10.1182/blood-2011-02-337568

- Macfarlane, R. G., & Biggs, R. (1948). Fibrinolysis; its mechanism and significance. *Blood*, 3(10), 1167-1187.
- Macfarlane, S. R., Seatter, M. J., Kanke, T., Hunter, G. D., & Plevin, R. (2001). Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*, 53(2), 245-282.
- Malhotra, V., Hogg, N., & Sim, R. B. (1986). Ligand binding by the p150,95 antigen of U937 monocytic cells: properties in common with complement receptor type 3 (CR3). *Eur J Immunol*, 16(9), 1117-1123.  
doi:10.1002/eji.1830160915
- Mao, H., Kano, G., Hudson, S. A., Brummet, M., Zimmermann, N., Zhu, Z., & Bochner, B. S. (2013). Mechanisms of Siglec-F-induced eosinophil apoptosis: a role for caspases but not for SHP-1, Src kinases, NADPH oxidase or reactive oxygen. *PLoS One*, 8(6), e68143.  
doi:10.1371/journal.pone.0068143
- Martorell, L., Martinez-Gonzalez, J., Rodriguez, C., Gentile, M., Calvayrac, O., & Badimon, L. (2008). Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost*, 99(2), 305-315.  
doi:10.1160/TH07-08-0481
- Maus, U. A., Janzen, S., Wall, G., Srivastava, M., Blackwell, T. S., Christman, J. W., . . . Lohmeyer, J. (2006). Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35(2), 227-235.  
doi:10.1165/rcmb.2005-0241OC
- Mehaffey, J. H., Charles, E. J., Schubert, S., Salmon, M., Sharma, A. K., Money, D., . . . Kron, I. L. (2018). In vivo lung perfusion rehabilitates sepsis-induced lung injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 155(1), 440-448 e442. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.08.124
- Mills, C. D. (2015). Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. *Front Immunol*, 6, 212. doi:10.3389/fimmu.2015.00212
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol*, 164(12), 6166-6173. doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166
- Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. R., & Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(4), 503-510.  
doi:10.1165/rcmb.2013-0086MA
- Mody, G. M., & Meyers, O. L. (1988). A radiographic survey of hip involvement in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 17(3), 223-224.  
doi:10.3109/03009748809098786

- Molino, M., Barnathan, E. S., Numerof, R., Clark, J., Dreyer, M., Cumashi, A., . . . Brass, L. F. (1997). Interactions of mast cell tryptase with thrombin receptors and PAR-2. *J Biol Chem*, 272(7), 4043-4049. doi:10.1074/jbc.272.7.4043
- Monroe, D. M., & Hoffman, M. (2006). What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(1), 41-48. doi:10.1161/01.ATV.0000193624.28251.83
- Monso, E., Tura, J. M., Marsal, M., Morell, F., Pujadas, J., & Morera, J. (1990). Mineralogical microanalysis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Arch Environ Health*, 45(3), 185-188. doi:10.1080/00039896.1990.9936714
- Morrison, S. J., Hemmati, H. D., Wandycz, A. M., & Weissman, I. L. (1995). The purification and characterization of fetal liver hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(22), 10302-10306. doi:10.1073/pnas.92.22.10302
- Motta, J. P., Denadai-Souza, A., Sagnat, D., Guiraud, L., Edir, A., Bonnart, C., . . . Vergnolle, N. (2019). Active thrombin produced by the intestinal epithelium controls mucosal biofilms. *Nat Commun*, 10(1), 3224. doi:10.1038/s41467-019-11140-w
- Murray, P. J. (2005). The primary mechanism of the IL-10-regulated antiinflammatory response is to selectively inhibit transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(24), 8686-8691. doi:10.1073/pnas.0500419102
- Murray, P. J. (2006). Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*, 6(4), 379-386. doi:10.1016/j.coph.2006.01.010
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., . . . Ignarro, L. J. (2013). Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *J Am Coll Cardiol*, 62(2), 89-95. doi:10.1016/j.jacc.2013.03.070
- Neese, L. W., Standing, J. E., Olson, E. J., Castro, M., & Limper, A. H. (1994). Vitronectin, fibronectin, and gp120 antibody enhance macrophage release of TNF-alpha in response to *Pneumocystis carinii*. *J Immunol*, 152(9), 4549-4556.
- Nelsestuen, G. L., Zytkevich, T. H., & Howard, J. B. (1974). The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. *J Biol Chem*, 249(19), 6347-6350.
- Niewiarowski, S., & Thomas, D. P. (1966). Platelet aggregation by ADP and thrombin. *Nature*, 212(5070), 1544-1547. doi:10.1038/2121544a0

- O'Brien, M. (2012). The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Top Companion Anim Med*, 27(2), 46-52. doi:10.1053/j.tcam.2012.06.003
- O'Brien, P. J., Prevost, N., Molino, M., Hollinger, M. K., Woolkalis, M. J., Woulfe, D. S., & Brass, L. F. (2000). Thrombin responses in human endothelial cells. Contributions from receptors other than PAR1 include the transactivation of PAR2 by thrombin-cleaved PAR1. *J Biol Chem*, 275(18), 13502-13509. doi:10.1074/jbc.275.18.13502
- Offermanns, S., Laugwitz, K. L., Spicher, K., & Schultz, G. (1994). G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(2), 504-508. doi:10.1073/pnas.91.2.504
- Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J. P., & Simon, M. I. (1997). Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of G $\alpha$ 13 deficiency. *Science*, 275(5299), 533-536. doi:10.1126/science.275.5299.533
- Offermanns, S., Toombs, C. F., Hu, Y. H., & Simon, M. I. (1997). Defective platelet activation in G  $\alpha$ (q)-deficient mice. *Nature*, 389(6647), 183-186. doi:10.1038/38284
- Ohkawara, T., Takeda, H., Miyashita, K., Nishiwaki, M., Nakayama, T., Taniguchi, M., . . . Nishihira, J. (2006). Regulation of Toll-like receptor 4 expression in mouse colon by macrophage migration inhibitory factor. *Histochem Cell Biol*, 125(5), 575-582. doi:10.1007/s00418-005-0092-y
- Ortega-Gomez, A., Perretti, M., & Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, 5(5), 661-674. doi:10.1002/emmm.201202382
- Ossovskaya, V. S., & Bunnett, N. W. (2004). Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev*, 84(2), 579-621. doi:10.1152/physrev.00028.2003
- Osugi, Y., Vuckovic, S., & Hart, D. N. (2002). Myeloid blood CD11c(+) dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their ability to stimulate T lymphocytes. *Blood*, 100(8), 2858-2866. doi:10.1182/blood.V100.8.2858
- Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B. C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y. M., . . . Furie, B. (1992). Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*, 359(6398), 848-851. doi:10.1038/359848a0
- Palumbo, J. S. (2008). Mechanisms linking tumor cell-associated procoagulant function to tumor dissemination. *Semin Thromb Hemost*, 34(2), 154-160. doi:10.1055/s-2008-1079255

- Petaja, J. (2011). Inflammation and coagulation. An overview. *Thromb Res*, 127 Suppl 2, S34-37. doi:10.1016/S0049-3848(10)70153-5
- Popovic, M., Smiljanic, K., Dobutovic, B., Syrovets, T., Simmet, T., & Isenovic, E. R. (2012). Thrombin and vascular inflammation. *Mol Cell Biochem*, 359(1-2), 301-313. doi:10.1007/s11010-011-1024-x
- Powers, K. A., Szaszi, K., Khadaroo, R. G., Tawadros, P. S., Marshall, J. C., Kapus, A., & Rotstein, O. D. (2006). Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med*, 203(8), 1951-1961. doi:10.1084/jem.20060943
- Prescott, H. C., & Costa, D. K. (2018). Improving Long-Term Outcomes After Sepsis. *Crit Care Clin*, 34(1), 175-188. doi:10.1016/j.ccc.2017.08.013
- Quaintance, P. A. (1934). Silicosis: A Study of 106 Pottery Workers. *Am J Public Health Nations Health*, 24(12), 1244-1251. doi:10.2105/ajph.24.12.1244
- Quick, A. J., Hussey, C. V., Harris, J., & Peters, K. (1959). Occult intravascular clotting by means of intravenous injection of thrombin. *Am J Physiol*, 197, 791-794. doi:10.1152/ajplegacy.1959.197.4.791
- Quintero, P. A., Knolle, M. D., Cala, L. F., Zhuang, Y., & Owen, C. A. (2010). Matrix metalloproteinase-8 inactivates macrophage inflammatory protein-1 alpha to reduce acute lung inflammation and injury in mice. *J Immunol*, 184(3), 1575-1588. doi:10.4049/jimmunol.0900290
- Rasmussen, U. B., Vouret-Craviari, V., Jallat, S., Schlesinger, Y., Pages, G., Pavirani, A., . . . Van Obberghen-Schilling, E. (1991). cDNA cloning and expression of a hamster alpha-thrombin receptor coupled to Ca<sup>2+</sup> mobilization. *FEBS Lett*, 288(1-2), 123-128. doi:10.1016/0014-5793(91)81017-3
- Remick, D. G. (2005). Interleukin-8. *Crit Care Med*, 33(12 Suppl), S466-467. doi:10.1097/01.ccm.0000186783.34908.18
- Rickles, F. R., Patierno, S., & Fernandez, P. M. (2003). Tissue factor, thrombin, and cancer. *Chest*, 124(3 Suppl), 58S-68S. doi:10.1378/chest.124.3\_suppl.58s
- Robriquet, L., Collet, F., Tournoy, A., Prangere, T., Neviere, R., Fourrier, F., & Guery, B. P. (2006). Intravenous administration of activated protein C in Pseudomonas-induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response. *Respir Res*, 7, 41. doi:10.1186/1465-9921-7-41

- Roger, T., David, J., Glauser, M. P., & Calandra, T. (2001). MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, *414*(6866), 920-924. doi:10.1038/414920a
- Rouser, G. (1958). Phospholipids and blood coagulation. *Am J Clin Nutr*, *6*(6), 681-687. doi:10.1093/ajcn/6.6.681
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., . . . Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*, *395*(10219), 200-211. doi:10.1016/S0140-6736(19)32989-7
- Rukoyatkina, N., Begonja, A. J., Geiger, J., Eigenthaler, M., Walter, U., & Gambaryan, S. (2009). Phosphatidylserine surface expression and integrin alpha IIb beta 3 activity on thrombin/convulxin stimulated platelets/particles of different sizes. *Br J Haematol*, *144*(4), 591-602. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07506.x
- Sachais, B. S., Turrentine, T., Dawicki McKenna, J. M., Rux, A. H., Rader, D., & Kowalska, M. A. (2007). Elimination of platelet factor 4 (PF4) from platelets reduces atherosclerosis in C57Bl/6 and apoE<sup>-/-</sup> mice. *Thromb Haemost*, *98*(5), 1108-1113.
- Sano, H., Kuronuma, K., Kudo, K., Mitsuzawa, H., Sato, M., Murakami, S., & Kuroki, Y. (2006). Regulation of inflammation and bacterial clearance by lung collectins. *Respirology*, *11 Suppl*, S46-50. doi:10.1111/j.1440-1843.2006.00808.x
- Schmaier, A. H. (2008). Assembly, activation, and physiologic influence of the plasma kallikrein/kinin system. *Int Immunopharmacol*, *8*(2), 161-165. doi:10.1016/j.intimp.2007.08.022
- Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., & van der Poll, T. (2008). Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, *83*(3), 536-545. doi:10.1189/jlb.0607373
- Semeraro, N., Ammollo, C. T., Semeraro, F., & Colucci, M. (2010). Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, *2*(3), e2010024. doi:10.4084/MJHID.2010.024
- Seymour, C. W., Liu, V. X., Iwashyna, T. J., Brunkhorst, F. M., Rea, T. D., Scherag, A., . . . Angus, D. C. (2016). Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, *315*(8), 762-774. doi:10.1001/jama.2016.0288
- Shankar-Hari, M., Phillips, G. S., Levy, M. L., Seymour, C. W., Liu, V. X., Deutschman, C. S., . . . Sepsis Definitions Task, F. (2016). Developing a

- New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 775-787. doi:10.1001/jama.2016.0289
- Shanley, T. P., Schmal, H., Friedl, H. P., Jones, M. L., & Ward, P. A. (1995). Role of macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 alpha) in acute lung injury in rats. *J Immunol*, 154(9), 4793-4802.
- Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E. J., Martin, C., O'Leary, J. J., Ruan, Q., . . . O'Neill, L. A. (2010). Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat Immunol*, 11(2), 141-147. doi:10.1038/ni.1828
- Siller-Matula, J. M., Bayer, G., Bergmeister, H., Quehenberger, P., Petzelbauer, P., Friedl, P., . . . Jilma, B. (2010). An experimental model to study isolated effects of thrombin in vivo. *Thromb Res*, 126(5), 454-461. doi:10.1016/j.thromres.2010.08.018
- Silveyra, P., & Floros, J. (2012). Air pollution and epigenetics: effects on SP-A and innate host defence in the lung. *Swiss Med Wkly*, 142, w13579. doi:10.4414/smw.2012.13579
- Sinegre, T., Teissandier, D., Milenkovic, D., Morand, C., & Lebreton, A. (2019). Epicatechin influences primary hemostasis, coagulation and fibrinolysis. *Food Funct*, 10(11), 7291-7298. doi:10.1039/c9fo00816k
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., . . . Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287
- Sitrin, R. G., Pan, P. M., Srikanth, S., & Todd, R. F., 3rd. (1998). Fibrinogen activates NF-kappa B transcription factors in mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 161(3), 1462-1470.
- Smiley, S. T., King, J. A., & Hancock, W. W. (2001). Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol*, 167(5), 2887-2894. doi:10.4049/jimmunol.167.5.2887
- Snelgrove, R. J., Goulding, J., Didierlaurent, A. M., Lyonga, D., Vekaria, S., Edwards, L., . . . Hussell, T. (2008). A critical function for CD200 in lung immune homeostasis and the severity of influenza infection. *Nat Immunol*, 9(9), 1074-1083. doi:10.1038/ni.1637
- Song, C., Li, H., Li, Y., Dai, M., Zhang, L., Liu, S., . . . Pan, P. (2019). NETs promote ALI/ARDS inflammation by regulating alveolar macrophage polarization. *Exp Cell Res*, 382(2), 111486. doi:10.1016/j.yexcr.2019.06.031

- Song, D. J., Cho, J. Y., Lee, S. Y., Miller, M., Rosenthal, P., Soroosh, P., . . . Broide, D. H. (2009). Anti-Siglec-F antibody reduces allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *J Immunol*, *183*(8), 5333-5341. doi:10.4049/jimmunol.0801421
- Springer, T. A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, *346*(6283), 425-434. doi:10.1038/346425a0
- Stapleton, A. M., Timme, T. L., & Ryall, R. L. (1998). Gene expression of prothrombin in the human kidney and its potential relevance to kidney stone disease. *Br J Urol*, *81*(5), 666-671; discussion 671-662. doi:10.1046/j.1464-410x.1998.00620.x
- Steele, C., Marrero, L., Swain, S., Harmsen, A. G., Zheng, M., Brown, G. D., . . . Kolls, J. K. (2003). Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med*, *198*(11), 1677-1688. doi:10.1084/jem.20030932
- Steinbrecher, K. A., Horowitz, N. A., Blevins, E. A., Barney, K. A., Shaw, M. A., Harmel-Laws, E., . . . Palumbo, J. S. (2010). Colitis-associated cancer is dependent on the interplay between the hemostatic and inflammatory systems and supported by integrin alpha(M)beta(2) engagement of fibrinogen. *Cancer Res*, *70*(7), 2634-2643. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3465
- Stern, D., Nawroth, P., Handley, D., & Kiesel, W. (1985). An endothelial cell-dependent pathway of coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *82*(8), 2523-2527. doi:10.1073/pnas.82.8.2523
- Stern, D. M., Carpenter, B., & Nawroth, P. P. (1986). Endothelium and the regulation of coagulation. *Pathol Immunopathol Res*, *5*(1), 29-36. doi:10.1159/000157001
- Sun, H., Wang, X., Degen, J. L., & Ginsburg, D. (2009). Reduced thrombin generation increases host susceptibility to group A streptococcal infection. *Blood*, *113*(6), 1358-1364. doi:10.1182/blood-2008-07-170506
- Sun, W. Y., Witte, D. P., Degen, J. L., Colbert, M. C., Burkart, M. C., Holmback, K., . . . Degen, S. J. (1998). Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(13), 7597-7602. doi:10.1073/pnas.95.13.7597
- Suttie, J. W. (1985). Vitamin K-dependent carboxylase. *Annu Rev Biochem*, *54*, 459-477. doi:10.1146/annurev.bi.54.070185.002331
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(33), 12481-12486. doi:10.1073/pnas.0605298103

- Tan, S., & Chen, S. (2021). Macrophage Autophagy and Silicosis: Current Perspective and Latest Insights. *Int J Mol Sci*, 22(1). doi:10.3390/ijms22010453
- Tan, S. Y., & Krasnow, M. A. (2016). Developmental origin of lung macrophage diversity. *Development*, 143(8), 1318-1327. doi:10.1242/dev.129122
- Taylor, F. B., Jr., Peer, G. T., Lockhart, M. S., Ferrell, G., & Esmon, C. T. (2001). Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo. *Blood*, 97(6), 1685-1688. doi:10.1182/blood.v97.6.1685
- Taylor, S. J., Chae, H. Z., Rhee, S. G., & Exton, J. H. (1991). Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature*, 350(6318), 516-518. doi:10.1038/350516a0
- ten Cate, H. (2012). Tissue factor-driven thrombin generation and inflammation in atherosclerosis. *Thromb Res*, 129 Suppl 2, S38-40. doi:10.1016/j.thromres.2012.02.028
- Thorley, A. J., Grandolfo, D., Lim, E., Goldstraw, P., Young, A., & Tetley, T. D. (2011). Innate immune responses to bacterial ligands in the peripheral human lung--role of alveolar epithelial TLR expression and signalling. *PLoS One*, 6(7), e21827. doi:10.1371/journal.pone.0021827
- Tie, J. K., & Stafford, D. W. (2016). Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *J Thromb Haemost*, 14(2), 236-247. doi:10.1111/jth.13217
- Tomita, T., Sakurai, Y., Ishibashi, S., & Maru, Y. (2011). Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. *Oncogene*, 30(31), 3429-3439. doi:10.1038/onc.2011.53
- Trapnell, B. C., Carey, B. C., Uchida, K., & Suzuki, T. (2009). Pulmonary alveolar proteinosis, a primary immunodeficiency of impaired GM-CSF stimulation of macrophages. *Curr Opin Immunol*, 21(5), 514-521. doi:10.1016/j.coi.2009.09.004
- Tsopanoglou, N. E., & Maragoudakis, M. E. (2004). Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost*, 30(1), 63-69. doi:10.1055/s-2004-822971
- Tsourouktsoglou, T. D., Warnatsch, A., Ioannou, M., Hoving, D., Wang, Q., & Papayannopoulos, V. (2020). Histones, DNA, and Citrullination Promote Neutrophil Extracellular Trap Inflammation by Regulating the Localization and Activation of TLR4. *Cell Rep*, 31(5), 107602. doi:10.1016/j.celrep.2020.107602

- Turpin, B., Miller, W., Rosenfeldt, L., Kombrinck, K., Flick, M. J., Steinbrecher, K. A., . . . Palumbo, J. S. (2014). Thrombin drives tumorigenesis in colitis-associated colon cancer. *Cancer Res*, *74*(11), 3020-3030. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3276
- Ulrich, M. M., Furie, B., Jacobs, M. R., Vermeer, C., & Furie, B. C. (1988). Vitamin K-dependent carboxylation. A synthetic peptide based upon the gamma-carboxylation recognition site sequence of the prothrombin propeptide is an active substrate for the carboxylase in vitro. *J Biol Chem*, *263*(20), 9697-9702.
- Vendrov, A. E., Madamanchi, N. R., Niu, X. L., Molnar, K. C., Runge, M., Szyndralewicz, C., . . . Runge, M. S. (2010). NADPH oxidases regulate CD44 and hyaluronic acid expression in thrombin-treated vascular smooth muscle cells and in atherosclerosis. *J Biol Chem*, *285*(34), 26545-26557. doi:10.1074/jbc.M110.143917
- Vergnolle, N., Derian, C. K., D'Andrea, M. R., Steinhoff, M., & Andrade-Gordon, P. (2002). Characterization of thrombin-induced leukocyte rolling and adherence: a potential proinflammatory role for proteinase-activated receptor-4. *J Immunol*, *169*(3), 1467-1473. doi:10.4049/jimmunol.169.3.1467
- Versteeg, H. H., Heemskerk, J. W., Levi, M., & Reitsma, P. H. (2013). New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*, *93*(1), 327-358. doi:10.1152/physrev.00016.2011
- Vossen, C. Y., Hoffmeister, M., Chang-Claude, J. C., Rosendaal, F. R., & Brenner, H. (2011). Clotting factor gene polymorphisms and colorectal cancer risk. *J Clin Oncol*, *29*(13), 1722-1727. doi:10.1200/JCO.2010.31.8873
- Vouret-Craviari, V., Boquet, P., Pouyssegur, J., & Van Obberghen-Schilling, E. (1998). Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol Biol Cell*, *9*(9), 2639-2653. doi:10.1091/mbc.9.9.2639
- Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I., & Coughlin, S. R. (1991). Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, *64*(6), 1057-1068. doi:10.1016/0092-8674(91)90261-v
- Westphalen, K., Gusarova, G. A., Islam, M. N., Subramanian, M., Cohen, T. S., Prince, A. S., & Bhattacharya, J. (2014). Sessile alveolar macrophages communicate with alveolar epithelium to modulate immunity. *Nature*, *506*(7489), 503-506. doi:10.1038/nature12902
- Wojtukiewicz, M. Z., Hempel, D., Sierko, E., Tucker, S. C., & Honn, K. V. (2016). Thrombin-unique coagulation system protein with multifaceted

- impacts on cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 35(2), 213-233. doi:10.1007/s10555-016-9626-0
- Wun, T., & White, R. H. (2009). Epidemiology of cancer-related venous thromboembolism. *Best Pract Res Clin Haematol*, 22(1), 9-23. doi:10.1016/j.beha.2008.12.001
- Xu, W. F., Andersen, H., Whitmore, T. E., Presnell, S. R., Yee, D. P., Ching, A., . . . Foster, D. C. (1998). Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(12), 6642-6646. doi:10.1073/pnas.95.12.6642
- Xu, Y., Meng, C., Liu, G., Yang, D., Fu, L., Zhang, M., . . . Zhang, S. (2016). Classically Activated Macrophages Protect against Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury by Expressing Amphiregulin in Mice. *Anesthesiology*, 124(5), 1086-1099. doi:10.1097/ALN.0000000000001026
- Xue, J., Wu, Q., Westfield, L. A., Tuley, E. A., Lu, D., Zhang, Q., . . . Sadler, J. E. (1998). Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7603-7607. doi:10.1073/pnas.95.13.7603
- Yanagita, M., Kobayashi, R., Kashiwagi, Y., Shimabukuro, Y., & Murakami, S. (2007). Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 364(2), 318-324. doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.002
- Yona, S., Kim, K. W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., . . . Jung, S. (2013). Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1), 79-91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
- Zaynagetdinov, R., Sherrill, T. P., Kendall, P. L., Segal, B. H., Weller, K. P., Tighe, R. M., & Blackwell, T. S. (2013). Identification of myeloid cell subsets in murine lungs using flow cytometry. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 49(2), 180-189. doi:10.1165/rcmb.2012-0366MA
- Zhang, M., Angata, T., Cho, J. Y., Miller, M., Broide, D. H., & Varki, A. (2007). Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood*, 109(10), 4280-4287. doi:10.1182/blood-2006-08-039255
- Zhang, N., Lou, W., Ji, F., Qiu, L., Tsang, B. K., & Di, W. (2016). Low molecular weight heparin and cancer survival: clinical trials and experimental mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142(8), 1807-1816. doi:10.1007/s00432-016-2131-6
- Zhang, P., Ozdemir, T., Chung, C. Y., Robertson, G. P., & Dong, C. (2011). Sequential binding of alphaVbeta3 and ICAM-1 determines fibrin-

mediated melanoma capture and stable adhesion to CD11b/CD18 on neutrophils. *J Immunol*, 186(1), 242-254. doi:10.4049/jimmunol.1000494

Zhao, R., Lin, H., Bereza-Malcolm, L., Clarke, E., Jackson, C. J., & Xue, M. (2019). Activated Protein C in Cutaneous Wound Healing: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci*, 20(4). doi:10.3390/ijms20040903