

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

Thrombinabhängige Tumorangiogenese

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

Vorgelegt von

Maria Elisabeth Elsbernd  
aus Münster

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 28.03.2025

Für Anne

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Zielsetzung	2
1.3 Fazit	2
1.4 Tumorangiogenese	3
1.5 Vaskulogenese und Angiogenese	4
1.6 Gerinnung	5
1.6.1 Primäre Hämostase	6
1.6.2 Sekundäre Hämostase	7
1.6.3 Fibrinolyse	8
1.7 Thrombin	9
1.7.1 Thrombin Struktur	11
1.7.2 Prothrombin Biosynthese	13
1.8 Thrombinabhängige Tumorangiogenese	14
1.9 Fragestellung	16
<b>2 Material und Methodik</b>	<b>17</b>
2.1 Zellkulturreagenzien	17
2.2 RT-PCR Reagenzien	18
2.3 Western Blot Reagenzien	19
2.4 Antikörper	21
2.5 Geräte	21
2.6 Software	22
2.7 Verwendete Zellkulturlinien	22
2.8 Primer	23
2.8.1 Primersequenzen	23
2.9 F2KD Modell	24
2.10 Kandidatenauswahl	25
2.11 Beschreibung der Datenbanken	25
2.11.1 Gene Ontology (GO)	25
2.11.2 STRING	26
2.11.3 PubMed	26
2.12 Zellkulturmethoden	26
2.12.1 Zellen auftauen	26
2.12.2 Zellzählung	27
2.12.3 Zellen Passagieren	27
2.12.5. Zellen Pelletieren und Einfrieren im Kryoröhrchen	28
2.13 RNA Methodik	29
2.13.1 Primer-Generierung	29
2.13.2 RNA-Isolierung mit TriFast	30
2.13.3 Messung RNA-Konzentration	31
2.13.4 Reverse Transkription (cDNA Synthese)	32
2.13.5 quantitative PCR	32
2.13.6 Verdünnungsreihe	33

2.13.7 Technische Replikate .....	33
2.13.8 Biologische Replikate .....	33
2.14 Proteinmethodik .....	34
2.14.1 Proteinisolierung .....	34
2.14.2 Bradford Assay .....	34
2.14.3 Berechnung Proteinkonzentration .....	35
2.14.4 Western Blot .....	35
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1 Einteilung der Kandidatengene .....	38
3.2 Ergebnisse RNA Experimente im Vergleich zum Sequencing-Datensatz.....	43
3.2.1 Einteilung der Kandidatengene anhand ihres Expressionsverhaltens .....	45
3.2.2 Einteilung der Kandidatengene anhand ihrer Angiogenität .....	46
3.2.3 Expressionsdaten der angiogenen Kandidatengene.....	48
3.2.4 Expressionsdaten der antiangiogenen Kandidatengene .....	49
3.3 Ergebnisse Western Blots .....	51
3.3.1 Expression MMP2 im Westernblot .....	51
3.3.2 Expression HSPB1 im Westernblot .....	53
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>54</b>
4.1 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des antiangiogenen HSPB1 .....	56
4.2 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des antiangiogenen COL18A1.....	58
4.3 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des antiangiogenen RRAS .....	58
4.4 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des angiogenen MMP2.....	59
4.5 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des angiogenen MANF.....	60
4.6 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des angiogenen TGFB2 .....	61
4.7 Einteilung von Genen in proangiogen und antiangiogen .....	62
4.8 Die duale Rolle des Prothrombins im Hinblick auf die Tumorangiogenese.....	63
4.9 Die Ergebnisse auf RNA Ebene stimmen nicht mit den Ergebnissen auf Proteinebene überein .....	64
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>66</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>67</b>
<b>7 Danksagung .....</b>	<b>92</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutgerinnung.....	9
Abbildung 2 Vergleich Der Expression Mit Angiogenese Assozierter Gene Nach Depletion Von Prothrombin.....	44
Abbildung 3 Expressionsverhalten Der Gene .....	46
Abbildung 4 Anzahl Proangiogener Und Antiangiogener Gene.....	47
Abbildung 5 Expression Proangiogener Gene.....	48
Abbildung 6 Expression Antiangiogener Gene .....	50
Abbildung 7 Western Blot Mmp2 .....	52
Abbildung 8 Western Blot Hspb1 .....	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einteilung Der Kandidatengene .....	43
-----------------------------------------------	----

# 1 Einleitung

## 1.1 Zusammenfassung

Die Bildung von Blutgefäßen ist unter anderem essentiell für die Versorgung von Tumorzellen. Dieser Prozess wird als Angiogenese bezeichnet. Er wird durch angiogenetische und angiostatische Gene reguliert, welche verschiedene Effektormoleküle beeinflussen. Eine ausgeprägte Angiogenese geht häufig mit einem aggressiveren Tumorwachstum einher, daher ist die Angiogenese seit Jahren ein wichtiger Fokus in der Tumorforschung.

In der hier skizzierten Arbeit soll untersucht werden, ob Gene, die mit der Angiogenese assoziiert sind, durch das hämostatische System reguliert werden. Hierzu wurden Tumorzellkulturlinien verwendet, die aus chemisch induzierten Fibrosarkomen in Doxycyclin-induzierbaren F2 hypomorphen Mäusen (F2KD) und normalen B6 Wildtypmäusen gewonnen wurden. Die Arbeit beinhaltet zunächst eine umfassende Literaturrecherche, in welcher Kandidaten, welche sich in Bezug auf Angiogenese und Thrombin als wissenschaftlich relevant erweisen, ermittelt wurden. Als Grundlage dafür wurde ein bereits vorhandener Genexpressionsdatensatz verwendet, in welchem F2KD Fibrosarkomzellen mit und ohne Doxycyclin behandelt wurden und mit Zellen aus B6 Wildtyp Mäusen mit und ohne Doxycyclinbehandlung miteinander verglichen wurden. Gene, die spezifisch in F2KD Tumorlinien nach Doxycyclinbehandlung reguliert werden, gelten als aussichtsreiche Kandidaten. Diese Kandidaten wurden zusätzlich hinsichtlich ihres *fold changes* und statistischer Tests gefiltert. Die so ermittelten Kandidatengene wurden anschließend in einer Literaturrecherche weiterführend auf eine angiogenetische Assoziation hin beurteilt. Vielversprechende Kandidatengene wurden anschließend mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Nach erfolgreicher Etablierung erfolgte mittels RT-PCR eine erneute Analyse der RNA-Expression technischer Replikate, die dem ursprünglichen Datensatz zugrunde liegen. Anschließend erfolgte die Überprüfung biologischer Replikate. Hierzu wurden die Tumorzelllinien jeweils mit und ohne Doxycyclin erneut in Triplikaten ausgesät, die RNA isoliert, die RNA-Expression der Kandidatengene

bestimmt und diese dann mit den Expressionsdaten der technischen Triplikate verglichen. Anschließend wurde die RNA-Expression auf Proteinebene mittels Westernblots für ausgewählte Kandidaten validiert.

Die abschließende Auswertung der Ergebnisse auf RNA-Ebene und Proteinebene bezieht sich auf mögliche thrombinabhängige Prozesse, welche einen Einfluss auf die Tumorangienese nehmen. Die Auswertung der Versuche ergab, dass auf RNA-Ebene Gene unter einer Depletion von Prothrombin in ihrer Expression verringert und erhöht wurden. Dies gilt für proangiogene und antiangiogene Gene. Dass unter einer Depletion von Prothrombin sowohl proangiogene, also als antiangiogene Gene in ihrer Expression reguliert wurden, gibt einen interessanten Ausblick auf mögliche antiangiogene Eigenschaften von Thrombin, neben den proangiogenen Eigenschaften des Thrombins. Auf Proteinebene konnten bei ausgewählten Kandidatengenen keine Expressionsänderungen unter einer Depletion von Prothrombin ermittelt werden. Weshalb der Fokus weiterführender Arbeiten, basierend auf dem in dieser Arbeit verwendeten Arbeitsmodell, auf die Ermittlung messbarer prothrombinabhängiger Expressionsunterschiede auf Proteinebene gelegt werden sollte. Dabei können zudem weitere Versuchsmodelle zur Ermittlung eines funktionellen Effekts genutzt werden.

## 1.2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu ermitteln, wie sich Gene, welche mit der Tumorangienese assoziiert werden, unter einer Depletion von Prothrombin in ihrer Expression verändern und ob diese Expressionsänderung auf RNA-Ebene und auf Proteinebene messbar ist. Dadurch kann eine mögliche Rolle des Prothrombins über die Hämostase hinaus im Hinblick auf dessen Regulation der Tumorangienese untersucht werden und ob diese Regulation sich auf proangiogene, als auch antiangiogene Prozesse auswirkt.

## 1.3 Fazit

Das Fazit dieser Arbeit ist, dass sich unter einer Depletion von Prothrombin Gene, welche mit der Tumorangienese assoziiert sind, in ihrer Expression verändern.

Diese Expressionsänderung unter einer Depletion von Prothrombin betrifft sowohl proangiogene als auch antiangiogene Gene. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Prothrombin in komplexer Weise sowohl proangiogene als auch antiangiogene Prozesse der Tumorangiogenese beeinflussen könnte.

## 1.4 Tumorangiogenese

Bei der Bildung von Neoplasien findet auch immer eine Neovaskularisation statt (Folkman 1971, S. 1182). Der Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und der damit einhergehenden Gefäßbildung ist bereits früh erforscht worden (Feigin et al. 1958; Goodall et al. 1965). Die Neovaskularisation von Neoplasien ist jedoch im Vergleich zu der, bei Verletzung oder Entzündung stärker ausgeprägt (Folkman 1971; ALGIRE et al. 1954). Dass die Angiogenese bei verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen unterschiedlich ausgeprägt ist, lässt auf unterschiedliche Faktoren schließen, welche die Angiogenese beeinflussen (Hanahan und Folkman 1996).

Tumore senden anders als Transplantate keine Gefäße aus, um sich dem Gefäßsystem des Patienten anzuschließen, sondern müssen die Gefäße des Wirts zu sich „locken“ (Folkman 1971). Tumore brauchen nur wenige Tage, um sich an das Gefäßsystem des Patienten anzuschließen (BAUER et al. 1956). Tumorzellen senden Signale an nahegelegene Endothelzellen, wodurch diese von einem nichtproliferativen Zustand in einen proliferativen wechseln und neue Gefäße gebildet werden (Folkman 1971). Zu den früh erforschten Faktoren, welche die Angiogenese herbeiführen, gehören die fibroblastischen Wachstumsfaktoren bFGF und FGF (Vlodavsky und Christofori 1999; Friesel und Maciag 1995). Diese Wachstumsfaktoren haben eine hohe Affinität zu Heparin und werden bei der Angiogenese vermehrt gebildet. Studien zeigen, dass FGF außerdem mit dem proangiogenetischen vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) reagiert, wodurch die Tumorangiogenese zusätzlich verstärkt wird (Korc und Friesel 2009). VEGF ist ein ebenfalls früh erforschter sekretorischer angiogenetischer Faktor, welcher die vaskuläre Permeabilität erhöht und ein sehr potenter Faktor ist (Senger et al. 1983; Brown et al. 1997). Im Laufe der Jahrzehnte wurden noch viele weitere angiogenetische Faktoren erforscht.

Sind Tumore hingegen nicht in der Lage, Neovaskularisation auszulösen, wachsen sie nicht über 2-3 mm hinaus (Folkman 1971; Folkman et al. 1963; Gimbrone et al. 1969). Die Stärke der Neovaskularisation von Tumoren hängt von der Proliferation der Endothelzellen ab. Dies ergibt sich aus der Beobachtung, dass Tumorzellen stärker wachsen, je näher sie sich in der Nähe von Gefäßen befinden (Tannock 1968). Wenn Tumorzellen keinen Zugang zu einem vaskulären System haben, nekrotisieren und/oder apoptieren diese (Brem et al. 1976; Holmgren et al. 1995). Tumorstadium kann durch die Proliferationsrate von umliegenden Gefäßen beeinflusst werden (Tannock 1968). Die Dichte an Gefäßen der Tumore hat einen diagnostischen Stellenwert. Bei Brust- und Prostatakarzinomen beispielsweise ist eine höhere Gefäßdichte der Tumore mit einer schlechteren Prognose verbunden (Weidner et al. 1993; Weidner et al. 1991).

## 1.5 Vaskulogenese und Angiogenese

Bestimmte fibroblastische Wachstumsfaktoren induzieren das paraaxiale und laterale Plattenmesoderm zur Bildung von Angioblasten und hämatopoetischen Zellen. VEGF wird vom Endoderm produziert, die Rezeptoren werden jedoch von mesoderm abgeleiteten Angioblasten exprimiert (Risau 1997). Die Differenzierung von Angioblasten setzt einen gewissen Schwellenwert von VEGF voraus (Carmeliet et al. 1996; Ferrara et al. 1996). Es wird davon ausgegangen, dass VEGF-R2 die Differenzierung von Angioblasten initiiert und die Aktivität der VEGF-Liganden für das Überleben der Angioblasten sorgt (Risau 1997). Dass intraembryonale Angioblasten vom splanchnopleurischen Mesoderm im Gegensatz zu Angioblasten vom somatopleurischen Mesoderm hämatopoetische Zellen produzieren können, weist auf verschiedene Subtypen von Angioblasten hin (Pardanaud et al. 1996). Während ein Teil der Angioblasten Gefäße am Entstehungsort generiert, migriert ein anderer Teil, um einen vaskulären Plexus zu bilden (Feinberg 1991). Die migrierten Angioblasten adhären und bilden Fäden. Unter dem Faktor bFGF (Basis-Fibroblasten-Wachstumsfaktor) wird die Spezifikation von Angioblasten initiiert und die Vaskulogenese der pluripotenten Stammzellen des Blastoderms induziert (Cox und Poole 2000; Flamme et al. 1997).

Wenn der primäre vaskuläre Plexus geformt ist, können die neu gebildeten Endothelzellen neue Kapillaren austreiben oder sich teilen und in einem de novo Prozess der Angiogenese Kapillaren bilden. Es wird daher zwischen dem echten Austreiben von Kapillaren aus bereits existierenden Gefäßen und der nicht austreibenden, sogenannten Angiogenese unterschieden (Risau 1997). Bei der Angiogenese findet keine erneute Differenzierung endotheler Zellen statt, sondern eine Neuorganisation bestehender vaskulärer Gefäße, welche auf angiogentische Faktoren, wie VEGF, TGF- $\beta$ , PDGF und Ang-1 reagieren (Ribatti et al. 2015). In vitro wurde Angiogenese das erste Mal von Folkman und Haudenschild entdeckt (Folkman und Haudenschild 1980). Organe aus dem Ektoderm wie die Glieder, das Gehirn, die Nieren und der Thymus werden größtenteils durch Angiogenese vaskularisiert, bei welcher endotheliale Zellen aus der Umgebung angelockt werden. Im Gegensatz dazu werden Organe des Mesoderms und Endoderms wie Herz, Lungen, Pankreas und Leber aus einer Mischung aus Angiogenese und Vaskularisation, bei welcher eine Ansammlung von Angioblasten die Vaskularisation einleitet, vaskularisiert (Bär 1980; Pardanaud et al. 1989).

## 1.6 Gerinnung

Wenn Gefäße durch ein Trauma verletzt werden, stoppt die Hämostase die Blutung, während die normale Blutzirkulation weiterhin aufrechterhalten wird (Gale 2011). Die Hämostase kann in 3 Mechanismen eingeteilt werden: Zunächst kommt es zu einer Vasokonstriktion des betroffenen Blutgefäßes, darauf folgt die Bildung eines temporären Thrombozytenthrombus. Anschließend wird die plasmatische Gerinnungskaskade aktiviert und mittels Fibrin wird ein Thrombus gebildet, der die Wunde verschließt (LaPelusa und Dave 2021). Der weiße Thrombus ist der reine Plättchenthrombus. Der rote Thrombus reflektiert den durch Fibrinbildung konsolidierten primären (weißen) Plättchenthrombus, in dessen Fibrinnetz sekundär Erythrozyten hängen bleiben.

Die Hämostase wird in die primäre und die sekundäre Hämostase unterteilt. Beide Mechanismen verlaufen gleichzeitig und sind miteinander verflochten. Für die

Aufrechterhaltung der Hämostase wirken koagulative und antikoagulative Mechanismen miteinander (Gale 2011).

### 1.6.1 Primäre Hämostase

Der Mensch besitzt 150 bis 400 Millionen Thrombozyten pro Milliliter Blut, welche ca. zehn Tage im Körper zirkulieren (Zucker-Franklin 1996). Die azellulären Thrombozyten schnüren sich von den Megakaryozyten ab, welche dem Knochenmark entstammen (Schulze und Shivdasani 2005). Unter physiologischen Bedingungen aggregieren oder adhären Thrombozyten nicht. Werden die Thrombozyten bei einer Verletzung einer subendothelialen Matrix exponiert, adhären diese und werden aktiviert (Gale 2011). Die Aggregation der Thrombozyten wird durch die Thrombozytenrezeptoren GPVI, GPIb/V/IX,  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, PAR1 und PAR4, die Thrombozyten-Agonisten ADP, TXA2 und Serotonin, die adhäsiven Thrombozytenproteine VWF, P-Selectin, CD40L und Vitronectin und den adhäsiven Plasmaproteinen VWF, Fibrinogen und Fibronectin vermittelt (Gale 2011).

Die primäre Hämostase startet mit dem Rezeptor GPIb-IX-V, welcher durch eine Interaktion von GPIb $\alpha$  und der A1 Domäne vom Von-Willebrandt-Faktor an den Von-Willebrandt-Faktor bindet. Der Von-Willebrandt-Faktor wird von Megakaryozyten und Endothelzellen sezerniert. Er liegt sowohl gelöst im Plasma, als auch gebunden in der subendothelialen Matrix vor (Ruggeri 2007; Gale 2011). Kollagen, welches ebenfalls in der subendothelialen Matrix vorliegt und bei einer Verletzung des Gewebes dem Blut exponiert wird, ist der Ligand des ständig aktiven Rezeptors GPVI. Die Rezeptoren GPVI und GPIb-IX-V sind für die Adhäsion der Thrombozyten an die endotheliale Matrix zuständig (Gale 2011; Kehrel et al. 1998; Nieswandt et al. 2001). Bei der Aktivierung der Thrombozyten findet eine Konformitätsänderung der auf der Oberfläche der Thrombozyten befindlichen Integrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 und  $\alpha$ v $\beta$ 3 statt, wodurch diese sich an Liganden binden können (Gale 2011; Luo und Springer 2006; Xiao et al. 2004).

Die Aktivierung weiterer Thrombozyten verläuft mittels der sogenannten Feedback-Aktivierung. Sie wird durch Agonisten ausgelöst, welche von aktivierten Thrombozyten G-Protein vermittelt ausgeschüttet werden. Serotonin wird beispielsweise von einer dichten Granula sezerniert. An die Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 bindet der Agonist

ADP, welcher von der Thrombozytengranula ausgeschüttet wird (Gale 2011; Mills 1996), währenddessen wird der Agonist Thromboxan A<sub>2</sub> von aktivierten Thrombozyten synthetisiert. Dieser bindet primär an den Thromboxan-Rezeptor und zu geringeren Maße an andere prostanoide Rezeptoren (Hanasaki und Arita 1988).

Als weiterer wichtiger Faktor zur Aktivierung der Thrombozyten dient der Faktor Thrombin, welcher die G-Protein-vermittelten Rezeptoren PAR1 und PAR4 spaltet. Durch die Spaltung wird ein N-terminales Ende exponiert, welches den Rezeptor aktiviert und durch Zellsignalisierungen zur Sekretion von Thrombozytengranula, zu einer Aktivierung der Integrine und zum Umbau des Zytoskeletts führt (Gale 2011; Kahn et al. 1998; Vu et al. 1991b; Müller-Berghaus 2004).

Die Adhäsion und Aggregation der aktivierten Thrombozyten wird durch Thrombozyten-Thrombozyten-Verbindungen zwischen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, welches an Fibronectin, VWF, Fibronectin oder Vitronectin gebunden ist, und zwischen  $\alpha$ v $\beta$ 3, welches an Vitronectin oder Thrombospondin gebunden ist, verstärkt. Durch die Wechselwirkung von dem Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 und Kollagen wird die Haftung ans subendotheliale Kollagen verstärkt (Gale 2011).

## 1.6.2 Sekundäre Hämostase

Im Rahmen der sekundären Hämostase wird die plasmatische Gerinnungskaskade aktiviert, in der Fibrin durch Thrombin gebildet wird und zu einer Quervernetzung des primären Plättchenthrombus führt. Zentraler Bestandteil der kaskadenartig aufeinanderfolgenden Aktivierung von Gerinnungsfaktoren ist der Gewebefaktor.

Dieser Gewebefaktor ist ein Cofaktor der Serinprotease VIIa (Kirchhofer und Nemerson 1996). Bei einer Verletzung der Gefäße aktiviert der Komplex aus dem Gewebefaktor und dem Faktor VIIa die Faktoren X und IX, was als extrinsischer Weg bezeichnet wird. Durch den Cofaktor VIIa aktiviert der Faktor IXa ebenfalls Faktor X. Anschließend aktiviert der Faktor Xa mittels des Cofaktors Va das Prothrombin, welches nachfolgend Thrombin generiert (Gale 2011; Dahlbäck 2000).

Die Serinprotease Thrombin ist bei vielen Prozessen der Gerinnungskaskade beteiligt: Thrombin spaltet Fibrinogen zu Fibrin, aktiviert die Thrombozyten mittels der Spaltung von PAR1 und PAR4 (Protease-aktivierte Rezeptoren) und vermittelt einen positiven Feedback-Mechanismus der Hämostase für die Ausdehnung des Thrombus. Es

aktiviert die Cofaktoren VIII und V und es aktiviert den Faktor XI, welcher anschließend den Faktor IX aktiviert (Gale 2011; Kahn et al. 1998; Lane et al. 2005; Bouma et al. 1998).

Zum Beenden der Kaskade bindet Thrombin an Thrombomodulin und aktiviert dadurch das Protein C zum aktivierten Protein C (APC). Das aktivierte Protein C spaltet und inaktiviert unter dem Cofaktor S die Cofaktoren VIIIa und Va, wodurch die Gerinnungskaskade runterreguliert wird. Zusätzlich agiert Faktor V als Cofaktor für das aktivierte Protein C und Protein S und hemmt so die Gerinnungskaskade (Gale 2011; Esmon und Owen 1981; Fulcher et al. 1984; Guinto und Esmon 1984; Cramer et al. 2010; Shen und Dahlbäck 1994; Walker 1980).

### 1.6.3 Fibrinolyse

Während der Fibrinolyse wird der Thrombus, welcher während der Wundheilung entsteht, aufgelöst. Zu Beginn der Fibrinolyse spaltet die Serinprotease Plasmin das Fibrin. Plasmin wird unter dem gewebspezifischen Plasminogenaktivator (t-PA) und dem Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) generiert. Der T-PA und das Plasminogen binden an der Oberfläche des Fibrins, welches durch die anschließende Aktivierung des Plasminogens durch T-PA gespalten wird. Auch uPA aktiviert bei der Anwesenheit von uPA-Rezeptoren das Plasminogen. (Hematology. Basic Principles and Practice 1995; Gale 2011).

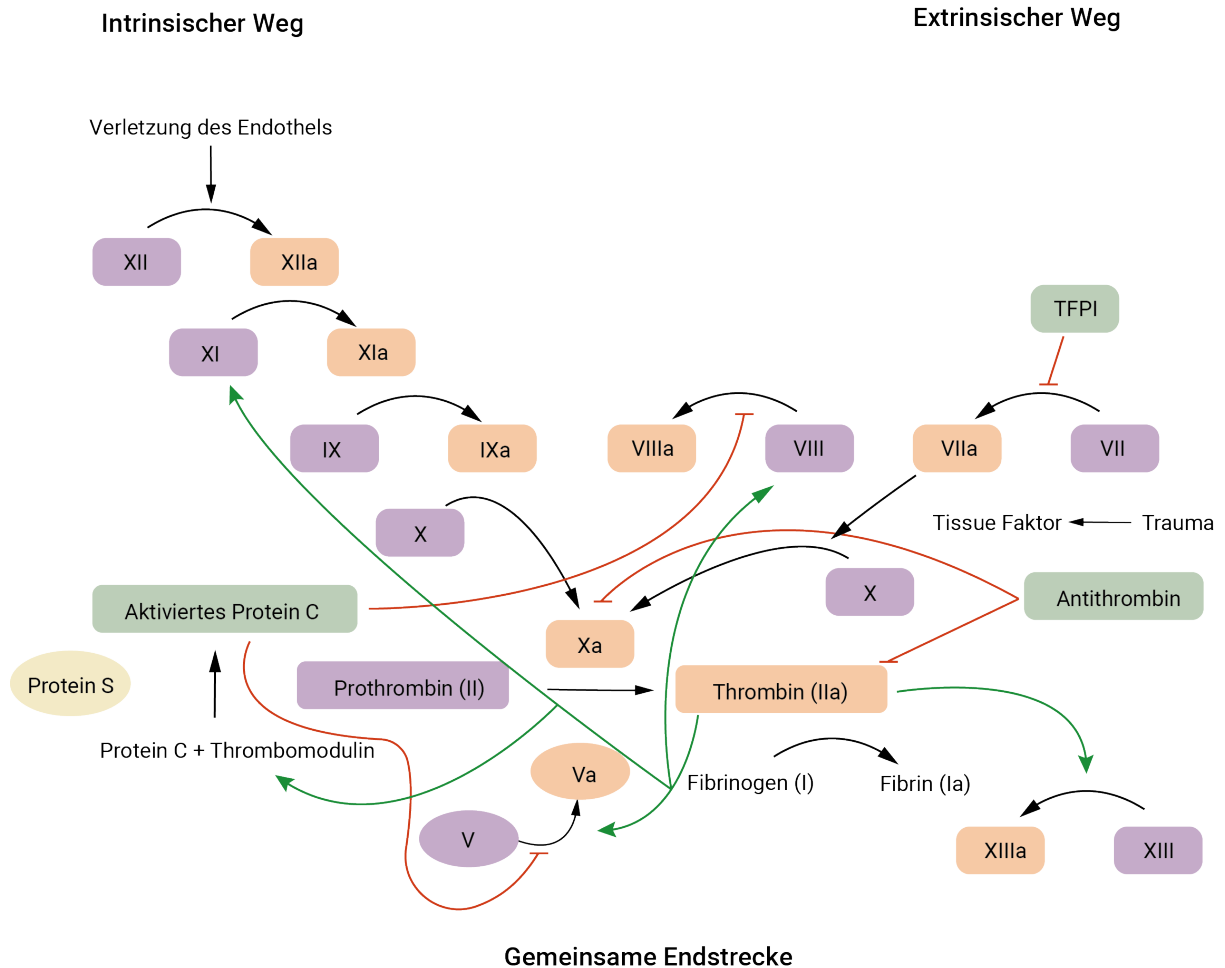


Abbildung 1: Blutgerinnung

## 1.7 Thrombin

Entwicklungsgeschichtlich geht Thrombin aus den Komplementfaktoren C1r, C1s und MASP2 hervor (Di Cera 2008; Krem und Di Cera 2001; Krem und Di Cera 2002). Es wird davon ausgegangen, dass alle Vitamin-K-abhängigen Proteasen wie beispielsweise die Faktoren der Gerinnungskaskaden VIIa, IXa und Xa und das aktivierte Protein C, welches neben der negativen Regulation der Gerinnungskaskade eine wichtige Funktion in Entzündungsreaktionen spielt, aus dem Thrombin hervorgehen (Di Cera 2008; Krem und Di Cera 2001; Gailani und Broze 1991; Esmon 2003; Cohen 2002).

Die allosterische Serinprotease Thrombin wird durch  $\text{Na}^+$  aktiviert und gilt als Schlüsselenzym der Hämostase (Di Cera 2008; Wells und Di Cera 1992; Di Cera 2003; Di Cera et al. 2007).

Neben der Hämostase und Thrombozytenaggregation wirkt es auf verschiedene Zelltypen mitogen und sekretogen. Das in der Leber gebildete Thrombin wird in einer inaktivierten zymogenen Form als das Glykoprotein Prothrombin sekretiert. Vom Aufbau ähnelt das Thrombin dem pankreatischen Enzym Trypsin (Davie und Kulman 2006).

Thrombin aktiviert PARs (Coughlin 2000) und stimuliert Endothelzellen, welche anschließend Adhäsionsmoleküle sezernieren und Wachstumsfaktoren und Zytokine produzieren (Colotta et al. 1994; Hattori et al. 1989; Daniel et al. 1986) (Davie und Kulman 2006).

Prothrombin wird neben der Leber auch während der Entwicklung und in Rattengehirnen exprimiert (Di Cera 2008; Dihanich et al. 1991). Die Spaltung von Osteopontin, welches eine wichtige Rolle bei chronischen Entzündungsreaktionen und Durchblutungsstörungen spielt, sowie die Induzierung der Chemotaxis von Monozyten und die Migration von Zellen durch die extrazelluläre Matrix, welche wichtig für die Embryogenese und Tumormetastasen ist, sind weitere wichtige Funktionen des Thrombins (Di Cera 2008; Scatena et al. 2007; Bar-Shavit et al. 1983).

Das aktivierte Thrombin wird von seinem inaktiven Vorläufer Prothrombin im Blut generiert, in welchem Thrombin sowohl pro-, als auch antikoagulant wirkt (Griffin 1995). Während der Umwandlung von Fibrinogen in unlösliches Fibrin, bei der mithilfe der Thrombozyten bei einer Verletzung die Wundheilung initiiert wird, wirkt Thrombin als prokoagulativer Faktor (Di Cera 2008). Dieser Prozess wird durch die Stabilisierung des Fibrins durch den Faktor XIII (Lorand et al. 1968), die Aktivierung der Faktoren V, VII und XI (Mann 2003; Davie und Kulman 2006) und die Inhibition der Fibrinolyse durch die Aktivierung von TAFI (Bajzar et al. 1996) zusätzlich unterstützt (Di Cera 2008).

Die Bindung von Thrombin an Thrombomodulin unterdrückt die Spaltung von Fibrinogen und PAR1 durch Thrombin und erhöht auf der anderen Seite dessen Spezifität zugunsten des Protein C um das 1000-fache und wirkt dadurch antikoagulant (Di Cera 2008). Durch spezifische Protein C Rezeptoren wird dieser Prozess zusätzlich verstärkt (Esmon et al. 1999; Taylor et al. 2001). Thrombin wird mit

der Hilfe von Heparin und dem thrombin-spezifischen heparinischen Cofaktor II durch den Serinproteaseinhibitor Antithrombin irreversibel inhibiert (Gettins 2002; Olson 2002; Tollefsen 2007).

Die Spaltung von PAR1 (Vu et al. 1991a), PAR3 (Ishihara et al. 1997; Sambrano et al. 2001) und PAR4 (Kahn et al. 1998; Xu et al. 1998; Nakanishi-Matsui et al. 2000) durch Thrombin an einer bestimmten Stelle am extrazellulären N-terminalen Ende legt einen neuen am N-terminalen Ende liegenden Liganden frei, welcher an den gespaltenen Rezeptor bindet und diesen aktiviert (Di Cera 2008; Coughlin 2000). Bei geringen Thrombinkonzentrationen fördert PAR1 die Thrombozytenaktivierung und –aggregation. Wie bereits bei der primären Hämostase beschrieben, vermittelt die thrombotische Rolle von Thrombin im Blut und wird bei einer hohen Enzymkonzentration von PAR4 unterstützt (Coughlin 2000). Im Gegensatz dazu wird bei der Maus ausschließlich durch PAR4 die Thrombozytenaktivierung vermittelt und durch PAR3 bei geringen Thrombinkonzentrationen die Spaltung von PAR4 erleichtert (Kahn et al. 1998; Nakanishi-Matsui et al. 2000). Durch die sowohl pro- als auch antikoagulative Rolle des Thrombins nimmt es eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Gerinnungskaskade ein (Di Cera 2008).

### 1.7.1 Thrombin Struktur

Aktivierte Proteasen der Blutgerinnung wie Thrombin haben eine chymotrysin-ähnliche Proteinfaltung, bei der zwei sechsverleite  $\beta$ -Fässer asymmetrisch an der Schnittstelle der Reste der katalytischen Triade von H57, D102 und S195 zusammenkommen (Page und Di Cera 2008). Vom N-terminalen  $\beta$ -Fass mit der nukleophilen Ser und dem Oxyanionloch, welche vom C-Terminus des  $\beta$ -Fasses generiert werden, stammen zwei Reste der Triade. Das Thrombin besteht aus zwei Polypeptidketten. Die A-Kette hat 36 Reste und ist mit der B-Kette, welche 259 Reste hat, über eine Disulfidbrücke kovalent zwischen den Resten C1 und C122 verbunden (Bode et al. 1992; Bode 2006).

Nach der Orientierung nach „Bode“ (Bode et al. 1992) liegt die A-Kette im hinteren Bereich des Moleküls, währenddessen die B-Kette, welche die aktive Seite des Enzyms und die funktionellen Epitope beinhaltet, gegenüber der A-Kette vorne liegt

(Di Cera 2008; Pineda et al. 2004). Obwohl die A-Kette lange als funktionsloses Anhängsel des Prothrombins angesehen wurde, werden mittlerweile Mutationen der A-Kette mit schweren Blutungen in Verbindung gebracht (Hageman et al. 1975; DiBella et al. 1995; Akhavan et al. 1999; Akhavan et al. 2000; Lefkowitz et al. 2000; Sun et al. 2000).

Die geladenen Reste der A-Kette gehen polare Verbindungen mit Partnern in der B-Kette ein. Es wird davon ausgegangen, dass ein signifikanter Teil der negativ geladenen Reste, welche Verbindungen im Bereich des C-Terminus, also in der Nähe zu der Na<sup>+</sup> Seite der B-Kette, die Na<sup>+</sup> Bindung und die allosterische Transduktion beeinflussen. Zusätzlich vermittelt die A-Kette einen „Informationsfluss“ zwischen der Na<sup>+</sup> Seite und der Rückseite der aktiven Region, im Hinblick auf die Substraterkennung und die Katalyse. Die A-Kette wird durch die Ionenpaare D1a-K9 und R14d-E13 und das Ionencluster R4-E8-D14-E14c stabilisiert. Störungen oder Unterbrechungen dieser Verbindungen wirken sich auch auf die Interaktionen mit der B-Kette und deren Eigenschaften aus. So führt zum Beispiel die Mutation des Thrombins, bei der K9 nicht vorhanden ist, zu einer signifikanten Verringerung der Gerinnung und Na<sup>+</sup> Effekten (Cristofaro et al. 2004). Andererseits führen Störungen der Reste des Ionenclusters R4-E8-D14-E14c zu Einschränkungen von Thrombinfunktionen, aber auch der Reste der B-Kette (Di Cera 2008).

Bei der Aktivierung von Prothrombin wird dieses in die Kringle-Regionen 1&2 und Thrombin gespalten (Mann 1976; Taneda et al. 1994). Das aktivierte Thrombin ist in der Lage pKr -1 und -2 zu spalten (Shikamoto und Morita 1999). Im Bereich der Angiogenese sind die Funktionen des pKr2 besonders interessant. So wirkt pKr2 in LPS-behandelten Seren während der bovinen kapillaren Endothelzellproliferation als an angiogener Inhibitor (Lee et al. 1998). Es wurde herausgefunden, dass eine Behandlung mit pKr2 zu einer Suppression des bfg-Faktors induzierten Endothelwachstums und Angiogenese in der chorioallantoischen Membran von Hühnerembryonen führt (Rhim et al. 1998). Des Weiteren führt eine Behandlung mit pKr2 zu einer Inhibition der Endothelzellproliferation und Angiogenese über die Inaktivierung des Cyclin D1 und CDK4 Komplex, die Induktion der ROS Produktion und Hochregulierung nuklearer CDK Inhibitoren (Kim et al. 2005). Durch die Bindung an Thrombin und der damit induzierten Konformitätsänderung der aktiven Seite, wird die Gerinnungsaktivität von Thrombin im Sinne der Fibrinbildung und

Thrombozytenaggregation verringert (Dasgupta und Thiagarajan 2007). Rekombinantes humanes pKr2 inhibiert die Metastasen des B16F10 Melanoms durch eine reduzierte Immunreaktivität der Matrixmetalloproteasen 2 und 9 und der Reduktion der Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (Kim et al. 2006) (Leem et al. 2016).

### 1.7.2 Prothrombin Biosynthese

Die primäre prepro-prothrombin Sequenz besteht aus einer Leitsequenz, einer  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure (Gla) Domäne, bestehend aus ca. 40 Resten, zwei Kringle Domänen mit jeweils ca. 80 Resten und einer C-Terminus-Serienproteasen-Domäne. Bevor Prothrombin in Thrombin umgewandelt wird, finden verschiedene posttranslative Modifikationen statt: Zunächst wird durch eine Signalpeptidase das Signalpeptid vom Prepro-Prothrombin gelöst und das entstandene Polypeptid in das endoplasmatische Retikulum (ER) importiert. Die  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase modifiziert im endoplasmatischen Retikulum anschließend das entstandene Prothrombin. Es katalysiert die Vitamin-K-abhängige Umwandlung der 10 Glutamatreste zu  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure mit ca. 40 Resten (Davie und Kulman 2006; Gettins 2002; Nelsestuen et al. 1974; Stenflo et al. 1974; Wu et al. 1991; Foster et al. 1987).

Erst durch diese Modifikation ist die  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure in der Lage mit  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen zu interagieren und eine Konformationsänderung einzugehen, welche für die Bindung an die Oberfläche anionischer Phospholipide und die Oberfläche aktivierter Thrombozyten bei einer Gefäßverletzung notwendig ist (Davie und Kulman 2006; Hansson und Stenflo 2005). Bei der Umwandlung von den Glutamatresten zu  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure durch die  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase verwendet diese eine reduzierte Form von Vitamin K (Vitamin K Hydroquion) als Cofaktor und oxidiert das Vitamin K Hydroquion zu Vitamin K 2,3-Epoxid (Donisi et al. 2009). Vitamin-K-Epoxid-Reduktase und Vitamin-K-Reduktase reduzieren das Vitamin K 2,3-Epoxid zurück zu Vitamin K Hydroquion. Beide Reduktasen werden durch Warfarin inhibiert (MacNicoll et al. 1984; Fasco und Principe 1980; Cain et al. 1997).

Dieser sogenannte Vitamin K Zyklus verringert die Konzentration von funktionalem carboxylierten Prothrombin im Blutplasma (Ren et al. 1977; Stenflo 1974).

Anschließend entfernt eine furinähnliche Proproteinkonvertase das Propeptid, um den N-Terminus des fertigen Zymogens zu generieren, wodurch das fertige Prothrombin ins Plasma sekretiert werden kann. Sowohl das menschliche, als auch das bovine Prothrombin hat 3 N-terminale Kohlenhydratketten, von welchen eine in der Serinproteasedomäne und zwei in der ersten Kringledomäne enthalten sind. Zwischen den einzelnen Kohlenhydratketten des Thrombins und denen des bovinen wurden verschiedene Unterschiede entdeckt (Stark et al. 2021; Mizuochi et al. 1981; Nilsson et al. 1983).

Die mit dem menschlichen Thrombin verknüpfte Kohlenhydratkette ist mit Asn53 des menschlichen Thrombins verbunden und ist ein Glykan des N-Acetyl-Glucosamid Prototyps und ist zusammen mit Fucose in 50% der Kohlenhydratketten enthalten (Nilsson et al. 1983).

## 1.8 Thrombinabhängige Tumorangiogenese

Maligne Tumorerkrankungen gehen oft mit Störungen der plasmatischen Gerinnung einher (Nash et al. 2001). Neben der Zirkulation von Fibrinopeptiden sind bei Krebspatienten sowohl die Krebszellen als auch die Endothelzellen mit Faktoren ausgestattet, welche perizellulär die Bildung von Fibrin begünstigen (Del Rosso et al. 2002; Rickles und Edwards 1983). Durch die hypoxieabhängige VEGF-induzierte Gefäßhyperpermeabilität enthält das Tumorstroma eine hohe Konzentration von Fibrinogen und Prothrombin (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004). Der in vielen Tumorzellen gebildete Gewebefaktor (Faktor III) führt zu der Aktivierung der Blutgerinnung (Hillen 2000), welche zu einer Thrombinaktivierung führt, welches die perizelluläre Ablagerung von Fibrin fördert (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004). Das Fibrin wiederum bildet durch eine provisorische Matrix eine gute Möglichkeit für die Anlagerung und Invasion von Tumorzellen und unterstützt ebenfalls die Endothelzellen bei der Invasion des Tumors (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004). Es wird davon ausgegangen, dass Thrombin und dessen Rezeptoren auch bei der Tumorprogression und dessen Wachstum eine wichtige Rolle spielen (Tsopanoglou et al. 1993; Folkman 1985). Der weitverbreitete Thrombinrezeptor PAR-1 wird neben Thrombin ebenfalls stark in Tumorzellen und Biopsieproben von Tumoren exprimiert

(Even-Ram et al. 1998; Wojtukiewicz et al. 1995). Thrombin regt Tumorzellen zur Freisetzung von VEGF an und sensibilisiert Endothelzellen gegenüber VEGF (Möhle et al. 1997; Tsopanoglou und Maragoudakis 1999). Die Aktivierung von PAR-1 durch Thrombin verstärkt unter statischen Konditionen die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen, die Subendotheliale Matrix, Fibronectin und den Von-Willebrand-Faktor (Nierodzik et al. 1995; Wojtukiewicz et al. 1993; Klepfish et al. 1993). Unter einer Strömungskonditionierung sorgt die thrombininduzierte Aktivierung von PAR-1 für eine thrombozytenabhängige Melanomzelladhäsion an Endothelzellen, welche durch Oberflächenmoleküle wie GPIIb-IIIa und P-Selectin unterstützt wird (Dardik et al. 1998).

Dass Thrombin einen starken angiogenen Einfluss hat, wurde in Experimenten mit chorioallantoischen Membranen und in vivo Matrigelsystemen gezeigt (Tsopanoglou et al. 1993; Haralabopoulos et al. 1997). Neben der Voraussetzung, dass die katalytische Seite des Thrombins aktiv ist, ist das angiogene Potential des Thrombins auch dosisabhängig (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004). Weitere Experimente mit chorioallantoischen Membranen zeigen, dass kleine Kapillaren und vaskuläre Plexi am stärksten von der Anwesenheit von Thrombin beeinflusst werden (Dimitropoulou et al. 1998). Es wird davon ausgegangen, dass die angiogenetische Aktivität von Thrombin rezeptorabhängig und fibrinunabhängig ist (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004). Dieser Schluss begründet sich unter anderem durch das  $\gamma$ -Thrombin, welches katalytisch aktiv proangiogen wirkt, jedoch keine Anionenbindungsseite für Fibrin besitzt und dadurch kein Fibrin bilden kann.

Wenn der Gewebefaktor den Faktor VII aktiviert, wird die Gerinnungskaskade initiiert. Durch eine extrazelluläre Aktivierung von Faktor VII durch den Gewebefaktor wird aus dem im Plasma zirkulierenden Prothrombin Thrombin gebildet (Zucker et al. 1998). Es wird davon ausgegangen, dass eine Überaktivierung des Gerinnungssystems, was bei vielen Krebspatienten der Fall ist, zu einer erhöhten Thrombinproduktion führt (Rickles und Edwards 1983). Es wurde beobachtet, dass sowohl immobilisiertes, als auch gelöstes Thrombin reichlich in der Nähe von Tumoren vorliegt, und das Tumorzellwachstum die Adhäsion an Thrombozyten und Invasion begünstigt (Nierodzik et al. 1992). Bei Entfernungen von Tumoren wurde im Gewebe neben aktiviertem Thrombin auch eine Überexpression von Thrombinrezeptoren festgestellt,

was einen Zusammenhang von Thrombin und Tumorprogression zusätzlich herstellt (Nierodzik et al. 1992; Even-Ram et al. 2001).

## 1.9 Fragestellung

Aufgrund der wichtigen Rolle des Prothrombins im Hinblick auf physiologische Prozesse wie die Gerinnungskaskade und Angiogenese stellt sich die Frage, welche Rolle Prothrombin auf die pathologische Angiogenese bei Tumoren einnimmt und ob diese Rolle eindeutig in proangiogen oder antiangiogen einteilbar ist. Zunächst muss dafür überprüft werden, ob Prothrombin die Expression von Genen, welche mit der Tumorangio-genese assoziiert werden, beeinflusst.

Daher wird mit dem F2KD Modell, bei welchem die Prothrombinexpression mit Hilfe einer sh-RNA durch Doxycyclin herunterreguliert, gearbeitet. Gene, die im Zusammenhang mit Angiogenese stehen, werden im Hinblick auf ihre RNA- und Proteinexpression in verschiedenen Modellen verglichen. So werden die Expressionsdaten in F2KD-Zellen mit und ohne 10ug/ul Doxycyclinbehandlung mit den Expressionsdaten von Black-6-Wildtyp-Mäusen mit und ohne Doxycyclin verglichen. Sollte die Expression nur in den F2KD-Zellen mit Doxycyclin signifikant, im Vergleich zu den F2KD-Zellen ohne Doxycyclin und den Black-6-Wildtypmäusen mit und ohne Doxycyclin hoch- oder runterreguliert sein, würde dies auf einen Einfluss des Thrombins in der Angiogenese hindeuten. Die Arbeitshypothese dieser Arbeit ist, dass Prothrombin sowohl einen proangiogenen, als auch einen antiangiogenen Einfluss auf die Tumorangio-genese nehmen kann. Diese Hypothese ließe sich bestätigen, wenn unter einem Knockdown von Prothrombin sowohl proangiogene als auch antiangiogene Gene in ihrer Expression jeweils hoch- und runterreguliert werden.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Zellkulturreagenzien

Name	Hersteller	Artikelnummer
Zell Medium ROTI®Cell DMEM High Glucose	CARLROTH	9007.1
FBS Fetal Bovine Serum, qualified	Gibco™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	10270106
Pen Strep Penicillin- Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	15140122
DMSO Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich (Merck)	276855-100ML
Doxycyclin Doxycycline hyclate	Sigma-Aldrich (Merck)	D9891-5G
DPBS DPBS,calcium, magnesium	Gibco™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	14040091
Trypsin Trypsin-EDTA solution	Sigma-Aldrich (Merck)	T4049-100ML
TriFast peqGOLD TriFast™	VWR Peqlab	30-2010

## 2.2 RT-PCR Reagenzien

Glycogen Glycogen, RNA grade	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	R0551
10xTurbo DNase Buffer	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	AM8170G
OligodTs Oligo(dT)18 Primer	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	SO132
dNTPs	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	R0181
0,1M DTT	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	P2325
Ribolock RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	EO0381
RevertAid H- RevertAid H Minus Reverse Transcriptase Included: 5xRT-buffer	Thermo Scientific™ (ThermoFisher SCIENTIFIC)	EP0452
SYBR Green Biozym Blue S'Green qPCR Kit	Biozym	331416XL
96 PCR Plate Holbrand Flach	Sarstedt	721.979.102 210143
210143	Eppendorf	30.127.838

		J131120Q
--	--	----------

## 2.3 Western Blot Reagenzien

Protein Assay Dye Reagent Concentrate	biorad	500-0006
2-Mercaptoethanol	ROTH	4227,1 171170610
TEMED	biorad	161-001
4x Laemmli Sample Buffer	biorad	1610747 L004133B
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa	ThermoFisher Scientific	26616 275697
TRIS	ROTH	4855,3 166242558
Tween 20	ROTH	9127,2 31167207
NaCl	ROTH	3957.2 4252334892

HCL 37%	SIGMA	258148-500ML 102414645
NaOH 40 %	ROTH	4347.1 31162488
Glycin	ROTH	3908.3 262187094
cOmplete Protease Inhibitor, Ultra tablets, EDTA free	Roche	6538282001 31744600
Milchpulver	ROTH	T145.2 371306718
SDS Solution 20%	biorad	161-0418 1610418
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	ROTH	3029.1 39467337
Methanol >99%	ROTH	8388.1 141307334
Sodium desoxycholate	SIGMA	30970-25G BCBF4834V
Triton X 100	ROTH	3051.2 311174627

Ethanol vergällt >99,8%	ROTH	K928.3 201309766
Essigsäure ROTIPURAN 100%, p.a.	ROTH	3738.5 337262049
Ponceau S	SIGMA	P3504-10G MKBF2200V
Amersham Hybond P 0,045 PVDF Blotting membrane	Amersham	1060029 A29776927
ECL-Select Western Blotting detection Reagent	Amersham	RPN2235 17425161

## 2.4 Antikörper

HSPB1 Antikörper	Santa-Cruz-Biotechnology sc-13132
MMP2 Antikörper	Proteintech 10373-2-AP

## 2.5 Geräte

Art des Geräts	Name	Hersteller
Sterilbank	Sterilbank	HERASafe Kendro Laboratory Products
Autoklav		
Brutschrank	Brutschrank	Binder
ChemiDoc	ChemiDoc™MP Imaging System Bio-Rad	Bio-Rad

Mikroskop		Leica Mikroskop DMIL
qPCR-Maschine	Flexcycler	Analytik Jena AG
Wasserbad	Wasserbad	Julabo SW23
Plattenzentrifuge	Beckmann Centrifuge	CS-15R Beckmann
Zentrifuge	Eppendorf 5424R	Centrifuge Eppendorf

## 2.6 Software

Verwendung	Name
Graphen, Layout und Statistik	GraphPad Prism 10
qPCR Analyse	Bio-Rad CFX Maestro
RNA-Konzentrationsmessung	NanoDrop

## 2.7 Verwendete Zellkulturlinien

Es wurden Zellen aus einem Fibrosarkom von F2-Knockdown-Mäusen, nachfolgend als F2KD-Zellen bezeichnet, und Black-6 Wildtyp-Mäusen, nachfolgend als B6-Zellen bezeichnet, verwendet. Die Zellen wuchsen bei 37°C unter 5% CO<sub>2</sub> in einem Medium mit 89% Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM High Glucose, CARLROTH), 10% fetales Kälberserum (FBS, Qualified, Gibco, Thermofisher SCIENTIFIC) und 1% Penicillin/Streptomycin (Pen Strep, Gibco, Thermofisher SCIENTIFIC). Es wurden vier Zellkulturen geführt. Bei jeder Zellkultur wurden 500µl Medium mit 500 µl DMSO versetzt. Bei den Zellkulturen mit Doxycyclin wurde das Doxycyclin 10µg/µl in DMSO gelöst. Die erste Zellkulturlinie enthielt F2KD-Zellen versetzt mit 10µg/µl Doxycyclin pro ml Medium in DMSO gelöst. Die zweite Zellkulturlinie enthielt F2KD-Zellen ohne Zusatz von Doxycyclin. Die dritte Zellkulturlinie enthielt B6-Zellen versetzt mit 10µg/µl

in DMSO gelöst. Die vierte Zellkulturlinie enthielt B6-Zellen ohne Zusatz von Doxycyclin. Für jede Zellkulturlinie wurden zu Beginn 1 Millionen Zellen jeweils als Triplikate ausgesät, die Zellkulturen wurden 7 Tage kultiviert, bis sie geerntet wurden, alle 24 Stunden wurden die Zellkulturen passagiert.

## 2.8 Primer

### 2.8.1 Primersequenzen

Gene	Forward-Primer	Reverse-Primer
Tlr4	5'ttctctcctgacctgacacc3'	5'catgccatgccttgcttca3'
Col18a1	5'cctctaggctgcaggatctc3'	5'aggacatctctgccgtcaaa'3
Mmp2	5'aggaggagaaggctgtgttc'3	5'accgggggtccattttcttct'3
Aggf1	5'tggaccattgtcaacggga'3	5'cttctatcgaggcggagg'3
Rras	5'tttcaatgaggtgggcaagc'3	5'cagctgctcaaatgcctcat'3
Arid2	5'tggtgcaatcccacttct'3	5'ttctcaagctgcatgacgtg'3
Fktn	5'taagctgaccactcatgcca'3	5'acttgctgtaactctggcct'3
Ddx5	5'attctagtgaccgagaccgc'3	5'ccttgccaaatcagggtgtt'3
Dusp5	5'acagaccagcctatgaccag'3	5'cacgggatccactgtagt'3
Fkrp	5'caccctcagcctgaaaccta'3	5'gagttctgggctgggttg'3
P2rx4	5'gttcattcaacgcgtctg'3	5'agggtgtaatgttggggagg'3
Casp8	5'tggagaagaggaccatgctg'3	5'gtcacacagttccgccattt'3
C1galt1	5'gtctggagctggctcggttat'3	5'cagcctcttctcgcaacaaa'3
Traf6	5'agatccagggtacgatgtg'3	5'ttgcaactgggcactgtg'3
Dicer1	5'atggaggcggagttcagaaa'3	5'acgaaccaccaaatgcactt'3
Wdr43	5'aatagcagcgtcagttccct'3	5'ctaagcgacgaaacaggtgc'3

Bmp6	5' actgtgtggtgggagttt '3	5' aaccttctctgaggccac '3
Fkrp	5' caccctcagcctgaaaccta '3	5' gagttctgggctggtgtg '3
Rasa1	5' aggccttgctcatctgttct '3	5' agcattctgccctacacaa '3
Hspb1	5' aggagctcacagtgaagacc	5' ccatgtctgctgccttc '3
Rtn4	5' agatccctgacagctgtattgt	5' accaaacaccactccagtct '3
Tgfb2	5' aggcagagttcagggtcttc '3	5' ctatcgatgtagcgctgggt '3
Stk4	5' catcatgcagcagtgtagaca '3	5' agatacagaaccagccccac '3
Hoxa7	5' agttccgcattctaccctg '3	5' cttctccagttccagcgtct '3
Mecp2	5' ggccgatctgctggaagta '3	5' cctctcccagttaccgtgaa '3
Six1	5' gagggagaaacgggagctg '3	5' tgcttggaggaggaggtt '3
Myc	5' ccctagtgtgcatgagga '3	5' tgctcttctccacagacac '3
Slc1a5	5' ccctatcgattcctgtgggg '3	5' tgaaccggctgatgtttg '3
Manf	5' atcaatgaggtgtcgaagcc '3	5' ttcaccggagcttctca '3
Lclat1	5' gattagcagccgtcttgg '3	5' tgcgggtggtcatgatga '3
Pde3b	5' tctgggactgggactgaag '3	5' ttgggtcaatcagcaggtct '3
Hk2	5' taccacacaccctacagcag '3	5' tgtctgtcacccttactcgg '3
Spred1	5' tcgatgacaagaagttggcc '3	5' ctccctctcagcctcagtt '3

## 2.9 F2KD Modell

Im Rahmen der Arbeit wurden induzierte RNAi-Mäuse verwendet. Bei den F2KD-Zellen wird eine (sh)RNA, welche F2 ansteuert, unter dem tet-promotor H1-tetO exprimiert. Ohne Doxycyclinbehandlung inhibiert der tet-repressor (itetR) den H1-tetO-promotor. Unter Doxycyclinbehandlung dissoziiert der tet-Repressor von dem tet-Promotor, wodurch die shRNA exprimiert wird und ein Knockdown von F2 resultiert.

So kommt es bei den verwendeten F2KD-Zellen in der Arbeit unter einer Doxycyclinbehandlung zu einer Depletion von Prothrombin.

## 2.10 Kandidatenauswahl

Als Grundlage für Kandidatenauswahl, wurde ein bereits vorhandener Genexpressionsdatensatz verwendet, in welchem F2KD Tumorzellen, mit und ohne Doxycyclin behandelt, mit Zellen aus B6 Wildtyp Mäusen mit und ohne Doxycyclinbehandlung miteinander verglichen wurden. Aus diesem Datensatz wurden Gene ausgewählt, bei welchen die RNA-Expression bei F2KD Zellen mit Doxycyclinbehandlung im Vergleich zu F2KD Zellen ohne Doxycyclin, B6 Wildtyp Mäusen mit Doxycyclin und B6 Wildtyp Mäusen ohne Doxycyclin signifikant erhöht oder erniedrigt sind. Die Kriterien zur Filterung einer signifikanten Erhöhung oder Erniedrigung wurden über den t-Test, kein Wechsel innerhalb der Kontrollgruppen um +/- 10%, und eines Foldchanges von  $<0,5$  und  $>2$  durchgeführt. Diese gefilterten 573 Gene wurden weiterführend unter Zuhilfenahme von angiogentischen Genontology-Begriffen selektiert und auf 35 Gene reduziert. Anschließend wurde bei den Genen eine Literaturrecherche durchgeführt.

## 2.11 Beschreibung der Datenbanken

### 2.11.1 Gene Ontology (GO)

Gene Ontology ist eine Ontologie, welche einen Wortschatz zur Beschreibung von Genen und ihrer Produkte bereitstellt. Unter den Aspekten der molekularen Funktion, der zellulären Komponente und der biologischen Prozesse können molekulare Begriffe entsprechend benannt werden. Die Anmerkungen („Annotations“), welche den Genen und Genprodukten zugeordnet werden, werden auch als „GO terms“ bezeichnet. Die Kandidatengene wurden mittels Gene Ontology auf eine Assoziation

mit angiogenetischen Faktoren hin untersucht. Hatten Gene eine starke Assoziation mit angiogenetischen Assoziationen wurden diese Gene weiterführend untersucht.

## 2.11.2 STRING

STRING ist eine Datenbank, welche Interaktionen zwischen Proteinen zeigt. Bei angezeigten Interaktionen handelt es sich um experimentell erwiesene beziehungsweise prognostizierte Interaktionen. Die Kandidatengene wurden auf Interaktionen untereinander und mit Thrombin hin untersucht.

## 2.11.3 PubMed

PubMed ist eine Datenbank, auf der wissenschaftliche Publikationen mit Schwerpunkt auf Biomedizin und Lebenswissenschaft gesammelt vorliegen.

## 2.12 Zellkulturmethoden

### 2.12.1 Zellen auftauen

Material: DMEM-Medium, gefrorene Zellen in Kryoröhrchen, Sterilbank, Zellkulturflasche, Mikroskop.

Durchführung:

Zunächst wurde das DMEM aus dem 4°C Kühlschrank ca. 30 Minuten im Wasserbad bei ca. 37 °C aufgewärmt. Die eingefrorenen Zellen in Kryoröhrchen wurden aus dem -80°C Kühlschrank geholt und im 37°C Wasserbad <1 Minute schwenkend vorsichtig aufgetaut. Unter der Sterilbank wurden nun die Zellen und 5 ml Medium mit einer Glaspipette in ein Falconröhrchen (15 ml) gegeben. Das Falconröhrchen wurde bei 300g (RCF) für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand im Falcon wurde abgesaugt und das Pellet blieb bestehen. Es wurden neue 5 ml Medium hinzugegeben und

resuspendiert. Eine große Zellkulturflasche (T175) wurde mit den Angaben beschriftet: Name, Datum, Name der Zelllinie und Zellzahl/Mischverhältnis. Anschließend wurden 20 ml Medium bei einer großen Flask und 10 ml Medium bei einer kleinen Flask hinzugefügt. Das 5 ml Zell-Medium-Gemisch wured dazugegeben und leicht geschwenkt. Unter dem Mikroskop konnten die Zellen nun beurteilt und/oder gezählt werden. Die Zellkulturflasche wurde abschließend in den Inkubator bei 37 °C gestellt.

## 2.12.2 Zellzählung

Die Zellzählung diente der Überprüfung des Wachstums der Zellkulturen.

10 $\mu$ l Zellen wurden in einem Medium mit 40 $\mu$ l Trypanblau (den Ausschluss toter Zellen) vermischt (Faktor 1:5). Aus dem Gemisch wurden 10 $\mu$ l zwischen eine Von-Neubauer-Zellkammer und ihr fixiertes Deckgläschen gegeben und im Anschluss 4 große Quadrate mit einem Volumen 10<sup>-4</sup> ml ausgezählt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl im Medium} = \frac{x}{\text{Anzahl Quadrate}} * \text{Verdünnung Trypanblau} * \text{Kammerfaktor} \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right)$$

\* Volumen Medium (ml)

Eingesetzt:

$$\text{Zellzahl im Medium} = \frac{x}{4} * 5 * 10.000 \left( \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right) * \text{Volumen Medium (ml)}$$

## 2.12.3 Zellen Passagieren

Material: DMEM-Medium, DPBS, Trypsin, Zellkultur in Zellkulturflasche.

Durchführung:

Das bei 4°C gekühlte DPBS, DMEM und Trypsin wurden für ca. eine halbe Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Der Arbeitsplatz wurde mit Ethanol gereinigt. Nach einer halben Stunde Inkubation wurden die Zellen 3x mit DPBS gewaschen: Die Zellkulturflasche wurde mit einer Pasteurpipette abgesaugt und 10 ml DPBS wurden hinzugefügt. Die Zellkulturflasche wurde anschließend geschwenkt und das DPBS abgesaugt. Neues DPBS wurde hinzugefügt und der Vorgang insgesamt dreimal

wiederholt. Anschließend wurden 2,5 ml Trypsin zu den Zellen hinzugefügt und für 5 Minuten in den Inkubator gestellt. In dieser Zeit wurden die neuen Zellkulturflaschen beschriftet: Name, Datum, Name der Zelllinie, Zellzahl/Mischverhältnis. Nach der Inkubationszeit wurden 10 ml DMEM in die Originalzellkulturflasche gegeben, um das Trypsin zu neutralisieren. Die nun sichtbaren Niederschläge wurden durch mehrfache Resuspension mit der Pipette gelöst. 1 ml der Zellsuspension wurden in die neue Zellkulturflaschen gegeben und DMEM-Medium je nach der gewünschten Verdünnung hinzugefügt. Die Zellen wurden nun unter dem Mikroskop beurteilt und anschließend wurde die Zellkulturflasche in den Inkubator gestellt.

### 2.12.5. Zellen Pelletieren und Einfrieren im Kryoröhrchen

Material: DMEM Medium + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin bei immortalisierten Zellen, PBS, Trypsin, Zellkultur in Zellkulturflaschen, weitere leere Zellkulturflaschen, Falconröhrchen.

Durchführung:

Das PBS und das Medium wurden aus dem 4°C Kühlschrank im 37°C Wasserbad für ca. eine halbe Stunde erwärmt. In der Zeit wurde ein kleines Falconröhrchen beschriftet. Das Trypsin wurde kurz vor Beginn ins 37°C Wasserbad gestellt. Die Sterilbank wurde mit Ethanol gereinigt, zusätzlich auch alle Geräte, die benutzt wurden und Gegenstände, die von außerhalb in die Sterilbank reingestellt wurden. Die Zellkultur, die neuen Zellkulturflaschen, Medium und PBS wurden in die Sterilbank gestellt. Das alte Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgesaugt, ohne dabei die Zellen in der Zellkulturflasche zu berühren. Die Zellen wurden mit 10 PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und neues wurde eingefüllt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und jedesmal eine neue Glaspipette verwendet. Anschließend wurden 2,5 ml Trypsin in die Zellkulturflasche gegeben, diese wurde geschwenkt und anschließend für 5 Minuten in den Inkubator gestellt. Nachdem die Zellkulturflaschen aus dem Inkubator geholt wurden, wurde seitlich an die Zellkulturflaschen geklopft, um die Zellen zu lösen. 10 ml Medium wurden eingefüllt, wobei dabei am Zellrasen entlang gespült wurde, um möglichst viele Zellen abzulösen. Die Zellen im Medium

wurden resuspendiert. Mit einer neuen Glaspipette wurde alles in einen 15 ml Falconröhrchen gegeben. Dieser wurde bei 300g für 3 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Falconröhrchen wurde bei -80°C eingefroren. Alternativ wurde nach Absaugen des Überstandes das entstandene Pellet mit 1 ml Freezingmedium resuspendiert. Die Zellen im kälteresistenten Medium wurden in ein Kryoröhrchen überführt und mithilfe eines Gefrierbehälters bei -80°C eingefroren.

## 2.13 RNA Methodik

### 2.13.1 Primer-Generierung

Beim National Centre for Biotechnology Information (NCBI) sucht man unter "Gene" nach dem Gen, für welches man den Primer designen will. Bei "Organismus" gibt man "Mus musculus" an und wählt dann das entsprechende Gen aus. Anschließend geht man auf "RefSeq RNA" und wählt die verifizierte Sequenz. Danach klickt man auf "FASTA", damit die mRNA-Sequenz angezeigt wird. Die mRNA-Sequenz wird bei Primer3 eingefügt. Folgende Parameter werden bei Primer3 eingestellt:

Product Size Ranges: 75-150

Number to Return: 50

Max 3' Stability: 9.0

Max Repeat Mispriming: 12.00

Max Template Mispriming: 12.00

Pair Max Repeat Mispriming: 24.00

Pair Max Template Mispriming: 24.00

Max Tm Difference: 1

Max Self Complementarity: 4

Max 3' Self Complementarity: 0

Max Poly-X: 2

Die anderen Voreinstellungen werden übernommen.

Anschließend wurden die Primer-Sequenzen bei UCSC In-Silico PCR eingefügt, um die gDNA Größe (Basenpaarprodukt) anzuzeigen und daran zu erkennen, ob es sich um flankierende Exone handelt. Flankierende Exone sind notwendig, um eine mögliche gDNA-Amplifikation zu vermeiden. Selbst wenn der Primer an die gDNA bindet, ist ein Intron dazwischen. Daher ist es für die Taq-Polymerase nicht möglich, solch ein langes Produkt unter entsprechend eingestellten Bedingungen zu amplifizieren.

### 2.13.2 RNA-Isolierung mit TriFast

Material: TriFast-Lösung, Chloroform, Isopropanol, eiskaltes 75%iges Ethanol, RNase-freies Wasser, gestopfte Spitzen.

Homogenisierung:

Bei Gewebe:

1ml Trifast wurde pro 50-100 mg Gewebe zugegeben. Ein Power Homogenizer wurde für eine ausreichende Lyse verwendet. Die Probe sollte ein Volumen von über 10% des TriFasts nicht überschreiten.

Bei Zellen aus Monolayer:

1ml TriFast wurde pro 10 cm<sup>2</sup> Zellkultur draufgegeben.

Bei Zellsuspensionen:

Die Zellsuspensionen wurden zuvor zentrifugiert. Der Überschuss wurde abgesaugt und pro 5-10 x 10<sup>6</sup> Zellen wurden 1000 µl TriFast hinzugefügt. Das TriFast mit den gelösten Zellen wurde anschließend auf 1,5 ml oder 2 ml „Eppis“ verteilt.

Phasentrennung:

Das 1,5 ml „Eppi“ wurde bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Anschließend wurden pro 1000  $\mu$ l Suspension 200  $\mu$ l Chloroform hinzugefügt. Die Suspension wurde kurz gevortext, bis die Phasentrennung weg war. Anschließend wurde die Suspension für 3 bis 17 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 12 000 g und 4°C. Anschließend bildeten sich 3 Phasen. Die oberste durchsichtige Phase enthält die RNA, das folgende weißliche Proteinaggregat bildet die Interphase. Die rötliche unterste Phase enthält die DNA. Vorsichtig wurde die oberste Phase abpipettiert, ohne die Interphase zu tangieren. Die RNA wurde in ein 1,5 ml oder 2 ml „Eppi“ gefüllt.

#### RNA-Fällung:

In ein „Eppi“ 1,5 ml oder 2 ml wurden 500  $\mu$ l Isopropanol und 1  $\mu$ l (20  $\mu$ g) Glykogen (RNA-Glykogen) vorgelegt. Die wässrige Phase wurde hinzugegeben, gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Eppi bei 4°C und 12 000 g für 10 Minuten zentrifugiert.

#### Waschen:

Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1 ml eiskaltem Ethanol gewaschen. Um das Pellet zu lösen, wurde das Ethanol auf und ab pipettiert. Anschließend wurde die Suspension bei 4 °C und 12 000g für 10 Minuten zentrifugiert. Das Ethanol wurde abpipettiert und der Waschvorgang wiederholt.

#### RNA-Lösung:

Der Ethanol-Überstand wurde abpipettiert und 20  $\mu$ l RNase-freies Wasser wurde hinzugefügt, in dem sich durch Auf- und Abpipettieren das Pellet löste. Das „Eppi“ wurde geöffnet und bei 50°C und rpm für 5 Minuten geschüttelt, bis das Ethanol verdampft war.

### 2.13.3 Messung RNA-Konzentration

#### Durchführung:

Die RNA wurde auf Eis aufgetaut. Auf dem PC wurde das Programm ND1000 geöffnet und auf "Nucleic Acid" geklickt. Der Hebel wurde geöffnet. Anschließend folgt die Kalibrierung: 1 µl Wasser wurde auf die Auftragfläche gegeben und der Hebel geschlossen. „RNA 40“ wurde eingestellt und auf „OK“ geklickt. Danach wurde der Hebel geöffnet und das Wasser abgetupft. Nach der Säulenaufreinigung wurde 1 µl AE auf die Fläche gegeben. „BLANK“ wurde angeklickt und bei der Sample ID wurde die Beschriftung eingefügt und das Sample abgetupft. Anschließend wurde 1 µl der RNA aufgetragen und „Measure“ geklickt. Das Ergebnis steht nun unten in ηg/µl. Abschließend klickt man oben auf „Show Reports“, woraufhin sich eine Tabelle öffnet. Die Reports wurden geöffnet, woraufhin man unter „Save Reports“ das Ergebnis speichert.

#### 2.13.4 Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Zunächst wurde die RNA (µg/µl) mit so viel RNase freiem H<sub>2</sub>O versetzt, bis es insgesamt 10µl ergab. Anschließend wurden 1µl R6/Oligo dT und 1µl 10mM dNTP's hinzugefügt. Das Gemisch wurde 10 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend einige Minuten auf Eis gelegt. Dem Gemisch wurden 4µl 5x-RT-Buffer, 2µl 0,1 DTT, 1µl Ribolock und 1µl 200 µ/µl RT H- (H minus Reserve Transkriptase) hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dann 50 Minuten bei 42°C inkubiert und abschließend 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Die am Ende entstandenen 20 µl cDNA wurden im gewünschten Mischungsverhältnis in Wasser gelöst.

#### 2.13.5 quantitative PCR

Für die qPCR wurde ein Mix aus S'Greens Blue, cDNA, Forward primer, Reverse primer, H<sub>2</sub>O erstellt. Für ein Plate im 96er-Well ergab sich dabei folgendes Mischungsverhältnis:

2x qPCR S'Green Blue	10,0 µl
Forward primer (10 µM)	0,8 µl

Reverse primer (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
cDNA	5,0 $\mu$ l
Wasser	3,4 $\mu$ l
Ingesamt	20,0 $\mu$ l

Protokoll im qPCR-Gerät:

95°C 2 Minuten

95°C 5 Sekunden 35x Wiederholen

60°C 20 Wiederholungen bis Ende der Verlängerung

65-95°C Erhöhung um 0.5 °C

### 2.13.6 Verdünnungsreihe

Eine Verdünnungsreihe ist notwendig, um die Effizienz des Primers zu überprüfen. In dieser Arbeit wurden Verdünnungen mit den Verhältnissen 1/10, 1/100, 1/1000 und 1/10 000 der Primer verdünnt in H<sub>2</sub>O verwendet und mittels qPCR quantifiziert.

Nach der nachgewiesenen Effizienz des Primers wurden diese für die Experimente „Technische Replikate“ und „Biologische Replikate“ verwendet.

### 2.13.7 Technische Replikate

Aus der RNA des originalen Expressionsdatensatzes wurde cDNA generiert. Anschließend wurde die cDNA im Verhältnis 1:100 verdünnt und die Expression der jeweiligen Gene mittels qPCR gemessen.

### 2.13.8 Biologische Replikate

In die Zellkultur wurden biologische Triplikate von F2KD Zellen aus Fibrosarkomen mit und ohne Doxycyclinbehandlung und von B6 Wildtyp Mäusen mit und ohne Doxycyclinbehandlung gesät.

Für die Generierung der biologischen Triplikate wurden jeweils 1 Millionen F2KD Zellen in drei T175 Zellkulturflaschen mit 10µg Dox gelöst in 1µl DMSO pro ml Medium, jeweils 1 Millionen F2KD Zellen in drei T175 Zellkulturflaschen mit 1ul DMSO pro ml Medium, jeweils 1 Millionen B6 Zellen in drei T175 Zellkulturflaschen mit 10µg Dox gelöst in 1µl DMSO pro ml Medium und jeweils 1 Millionen B6 Zellen in drei T175 Zellkulturflaschen mit 1µl DMSO pro ml Medium T175 Zellkulturflaschen gesät. Alle 24 Stunden wurden die Zellen passagiert und nach 7 Tagen wurde die RNA der Zellen geerntet und mittels Tri-Fast isoliert. Aus der geernteten RNA wurde cDNA generiert, 1 zu 100 verdünnt und die Expression der Gene anschließend mittels qPCR gemessen.

## 2.14 Proteinmethodik

### 2.14.1 Proteinisolation

Die Zellen wurden dreimal mit DPBS+ gewaschen und anschließend mit 2,5 ml Trypsin für 5 Minuten bei 37° inkubiert. Anschließend wurde Medium hinzugefügt und die Zellen im Medium resuspendiert. Das Medium wurde bei 300g für 5 Minuten zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet bildete. Das Medium wurde abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml RIPA Puffer gelöst.

### 2.14.2 Bradford Assay

Beim Bradford Assay wird photometrisch die quantitative Menge an Proteinen gemessen.

Für den Standard wurden 2 µg/µl BSA in 1/20 RIPA gelöst. Anschließend wurde sechs Mal eine jeweils zweifache Verdünnung und ein Standard mit nur 1/20 verdünnten RIPA hergestellt. 10 µl des Standards wurden jeweils in Triplikaten in einer 96-Loch-Titerplatte hinzugefügt.

Die Proben der in RIPA gelösten Proteine wurden 1 zu 20 mit Wasser verdünnt und jeweils 10 $\mu$ l in Triplikaten der Platte hinzugefügt. Anschließend wurden jedem Standard und jeder Probe 200 $\mu$ l 1 zu 5 verdünntes Coomassie Brilliant Blue G250 hinzugefügt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 595nm gemessen.

### 2.14.3 Berechnung Proteinkonzentration

Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde zunächst der Mittelwert der Standards berechnet. Aus dem Mittelwert und den Verdünnungskoeffizienten wurde eine Steigung und ein Achsenabschnitt berechnet. Anschließend wurde die Steigung mit dem photometrisch gemessenen Wert der Probe multipliziert. Das Ergebnis wurde zu dem Wert des Achsenabschnittes addiert und das Ergebnis mit der Zahl der Verdünnung (20) multipliziert. Anschließend wurde aus den Ergebnissen der Triplikate der Proben jeweils ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert zeigte die Konzentration der Proteinprobe in  $\mu$ g/ $\mu$ l an.

### 2.14.4 Western Blot

#### 2.14.4.1 Gelvorbereitung

Das Gel setzt sich aus zwei Teilen zusammen: Aus einem oberen Teil, dem Sammel-Gel, und einem unteren Teil, dem Trenn-Gel. In den vorliegenden Western Blots wurden 15%tige Gele verwendet. Für das Gel wurden 8ml 15%tiges Trenn-Gel und 6ml Sammel-Gel angemischt. Zunächst wurde das Trenn-Gel gegossen, welches bis 1cm unterhalb des Kammes aufgefüllt wurde. Anschließend wurde die Kammer mit 4ml 100%igen Ethanol aufgefüllt und 20 Minuten bei Raumtemperatur für die Polymerisation inkubiert. Daraufhin wurde das Ethanol mit einem Papiertaschentuch entfernt, die Kammer mit 1X TGS Buffer gespült und das Sammel-Gel hinzugefügt. In

das Sammel-Gel wurde der Kamm inseriert und anschließend 30 Minuten bis zum Aushärten des Gels bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 2.14.4.2 Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung wird die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurden 100µg Proteine geladen.

#### 2.14.4.3 SDS-Page

Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C inkubiert, anschließend gevortext, zentrifugiert und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Das Übertragungsgerät wurde mit 1x TGS Buffer befüllt, Blasen wurden entfernt und die Taschen mit den Proben befüllt und beschriftet. Das Gerät lief mit 25 mA pro Gel für ca. 2 Stunden.

#### 2.14.4.4 Übertragung

Die PVDF-Membran wurde für 2 Minuten in >99% Methanol inkubiert und anschließend im Blotting-Puffer erneut inkubiert. 6 Filterpapiere, welche die gleiche Größe wie die Membran haben, wurden ebenfalls im Blotting-Puffer inkubiert. Auf dem Transfergerät wurden 3 Filterpapiere übereinandergelegt, anschließend wurden die Membran und das Gel auf die 3 Filterpapiere gelegt. Anschließend wurden erneut 3 Filterpapiere auf das Gel gelegt und der Deckel des Transfergerätes geschlossen. Das Gerät lief mit 1mA/cm<sup>2</sup> für eine Stunde.

#### 2.14.4.5 Detektion

Nach dem Transfer wurde die Membran 3 Minuten in Milli-Q-Wasser gewaschen und anschließend 5 Minuten in 10%igen Ponceau bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert. Die Membran wurde 5 Minuten in 10%tiger Essigsäure gewaschen, um die gefärbten Proteine anzuzeigen. Die daraus resultierende Anfärbung der Proteine wurde im Cemi-Doc mit der Einstellung „colometric“ gemessen. Anschließend wurde die Membran erneut 3 Minuten in Milli-Q-Wasser gewaschen und daraufhin dreimal 5

Minuten mit TBST gewaschen. Zur Proteindetektion wurde die Membran in 5%tiger Milch in TBST gelöst und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 Minuten mit TBST gewaschen und mit dem primären Antikörper, welcher in 5%tiger Milch in TBST gelöst war, bei vier Grad über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran viermal fünf Minuten mit TBST gewaschen und für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper, gelöst in 5%tiger Milch in TBST bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Proteinbanden wurden anschließend im Chemi-Doc mittels der Signallösung (Mischverhältnis eins zu eins) angezeigt.

Je nach primärem Antikörper wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen und sekundäre Antikörper verwendet.

MMP2: Primäre Antikörperkonzentration 1:1000

Sekundärer Antikörper: Hase, Konzentration 1:10 000

Proteinladung im Western Blot: 25 µg

HSPB1: Primäre Antikörperkonzentration: 1:250

Sekundärer Antikörper: Maus, Konzentration 1:10 000

Proteinladung im Western Blot: 27,2 µg

### 3 Ergebnisse

Hauptziel dieser Arbeit ist es, einen möglichen Zusammenhang zwischen Thrombin und der Tumorangiogenese zu zeigen. Dieser wurde auf RNA-Ebene und auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden zunächst zu untersuchende Kandidatengene ausgewählt. Um die Kandidatengene zu identifizieren, wurde ein im Labor bereits verfügbarer Genexpressionsdatensatz, im folgenden als Originalsequencing Datensatz (RefSeq) bezeichnet, genutzt. Dieser Datensatz zeigt Fibrosarkomzellen des Maustammes F2KD unter Zugabe von Doxycyclin, Fibrosarkomzellen des

Maustammes F2KD ohne Zugabe von Doxycyclin und Fibrosarkomzellen von Wildtypmäusen des Maustammes B6 mit und ohne Zugabe von Doxycyclin. Es wurde untersucht, ob es zu einer signifikanten Expressionänderung der Fibrosarkomzellen des Maustammes F2KD unter Zugabe von Doxycyclin im Vergleich zu den anderen drei Gruppen kommt. Gene, welche einen signifikanten Expressionunterschied zeigten, wurden hinsichtlich ihres Zusammengangs mit Thrombin und Tumorangiogenese gefiltert. Die Literaturrecherche reduzierte die Anzahl der Kandidatengene auf 35 Gene, welche als interessante Kandidatengene zur Untersuchung ihres Zusammenhanges der Tumorangiogenese und evtl thrombinabhängigen Tumorangiogenese gelten.

Um die Kandidatengene hinsichtlich der Expression auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurden zunächst Primer generiert. Die Generierung der Primer und die Messung der Expression auf RNA-Ebene mittels RT-PCR kann im Methodikteil nachgelesen werden. Die Messung der Expression zwei ausgewählter Kandidatengene auf Proteinebene mittels Western Blot, kann ebenfalls dem Methodikteil entnommen werden. Das für die Experimente verwendete Material kann im Materialteil nachgelesen werden.

Zunächst wurden die ausgewählten Kandidatengene unterteilt.

### 3.1 Einteilung der Kandidatengene

Die folgende Tabelle zeigt die untersuchten Kandidatengene, basierend auf der vorgenommenen Literaturrecherche, ob diese pro- oder antiangiogen auf die Tumorangiogenese wirken, auf welchem Chromosom sie liegen, ob ein Zusammenhang zu Thrombin besteht und wie sie im Zusammenhang mit der Tumorangiogenese stehen. Dies umfasst wissenschaftliche Arbeiten, welche auf Pubmed veröffentlicht wurden, ob Interaktionen zwischen den Kandidatengenen und Thrombin bekannt sind oder ob die Kandidatengene die Tumorangiogenese positiv (proangiogen) oder negativ (antiangiogen) beeinflussen. Desweiteren wurden Interaktionen zwischen den Kandidatengenen und Thrombin mittels STRING und GENEONTOLOGY untersucht.

Gen	Kurzbeschreibung	Chromosom	Tumoran giogen	Zusammenhang Thrombin
HSPB1	Das Gen ist für die angiogenetische Balance zuständig (Lee et al. 2012), bei der Tumorangiogenese steigt der Anteil an löslichem HSPB1 als Gegenreaktion zu dem erhöhten VEGF (Lee et al. 2012).	7	-	+
MYC	Das Gen begünstigt die Expression von protoonkogenen Genen wie MMP9 (Pello et al. 2012; Liu et al. 2019), VEGF (Pello et al. 2012; Rapp et al. 2009; Chen et al. 2013), HIF1 $\alpha$ (Pello et al. 2012; Triner und Shah 2016), CCL9 (Kortlever et al. 2017) und TAMs (Tumor-assoziierten Makrophagen) (Lin et al. 2019; Murdoch et al. 2008; Baeriswyl und Christofori 2009).	8	+	+
TGFB2	Das Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Angiogenese (Jachimczak et al. 1993; Jachimczak et al. 1996). Tumorzellen werden durch eine erhöhte Expression von TGFB2 wachstumsstimuliert und es kommt zu einer verstärkten Tumorphiliferation (Friess et al. 1993; Bernstorff et al. 2001). Es inhibiert die Immunzellaktivierung und Antigenpräsentation (Jachimczak et al. 1993).	1	+	+
AGGF1	Das Gen fördert die Endothelzellproliferation und steht in positiver Korrelation mit dem tumoralen VEGF und CD34+ (Wang et al. 2015).	5	+	+
ARID2	Das Gen spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese, besonders bei der Migration und Differenzierung (He et al. 2014). ARID2 gilt in der Tumorgenese als Tumorsuppressor (Das et al. 2017; Manceau et al. 2013; Hodis et al. 2012, 2012).	12	-	+
BMP6	Das Gen beeinflusst den VEGF-Signalweg, wodurch die Proliferation von Krebszellen gestört wird (Pulkkinen et al. 2021). BMP6 kann sowohl als Tumorsuppressor, oder als Promotor der Tumorgenese wirken. Dies ist von der Art des Tumors und der damit verbundenen Veränderung im Signalweg abhängig (Seo et al. 2019; Katagiri und Watabe 2016; Ehata et al. 2013; García Muro et al. 2021).	6	-	+
C1GALT1	Das Gen spielt eine wichtige Rolle bei der O-Glykosylierung (Xia et al. 2004; Fu et al. 2008). Eine veränderte O-Glykosylierung geht mit einer verstärkten Tumorangiogenese einher (Pinho und Reis 2015; Apweiler et al. 1999; Wu et al. 2013). Eine Überexpression des Gens liegt bei multiplen Tumorarten vor (Wu et al. 2013; Sun et al. 2021; Lee et al. 2020).	7	+	unklar

CASP8	Das Gen spielt eine wichtige Rolle während der extrinsischen Apoptose (Tisch et al. 2019). Bei schnell wachsenden Tumoren ist CASP8 daher oft runterreguliert oder fehlt komplett (Hopkins-Donaldson et al. 2000; Teitz et al. 2001; Grotzer et al. 2000; Shivapurkar et al. 2002; Ebinger et al. 2004; Martinez et al. 2007). Eine Verringerung von CASP8 geht in der Regel mit einer malignen Transformation einher (Stupack 2013).	2	-	+
COL18A1	Das Genprodukt bildet das stark antiangiogene Protein Endostatin, welches die Tumorangio-genese und das Tumorstadium hemmt (O'Reilly et al. 1997).	21	-	+
DDX5	Das Gen fördert die Expression endothelialer Wachstumsfaktoren und fördert über den NFAT5-Signalweg die Migration von Tumorzellen (Germann et al. 2012; Kahlina et al. 2004). DDX5 gilt als wichtiger Regulator der Tumorgenese (Nyamao et al. 2019).	17	+	+
DUSP5	Das Gen beeinflusst den Angiogenese-Signalweg durch die Deaktivierung von ERK (Liu et al. 2018b). Wird pERK nicht durch DUSP5 phosphoryliert, kommt es zu einer unkontrollierten Angiogenese und Bildung von Tumoren. DUSP5 wirkt als Tumorsuppressor (Liu et al. 2018b; Yan et al. 2016; Boeckx et al. 2014).	10	-	+
FKRP	Das Gen ist an der posttranslationalen Modifikation von Dystroglykanen beteiligt (Kanagawa et al. 2016). Eine verringerte Expression geht mit einer gestörten Vaskulogenese einher und eine erhöhte Expression mit einer erhöhten Tumorgenese (Wood et al. 2011; The Human Protein Atlas 2023).	19	+	unklar
FKTN	Das Gen ist an der Glykosylierung von $\alpha$ -Dystroglycan beteiligt und supprimiert die Proliferation von Tumorzellen (Yamamoto et al. 2008). Eine verringerte Expression von FKTN geht mit einer pathologisch erhöhten Vaskulogenese einher (Wood et al. 2011).	9	-	unklar
HK2	Das Gen spielt eine wichtige Rolle bei der vermehrten Glykolyse in schnell wachsenden Krebszellen (Latham et al. 2012; Bonuccelli et al. 2010; Baumann et al. 2009; Kato et al. 2005; Xu et al. 2002; Martinez-Outschoorn et al. 2011). HK2 verstärkt unter anderem den Signalweg von VEGF-A und p38-MAPK-Signalweg (Lu et al. 2019).	2	+	+
HOXA7	Das Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Adhäsion während der Angiogenese (Chung et al. 2009), dessen erhöhte Expression in Tumorzellen mit einer erhöhten Tumorstadium einhergeht (Wang et al. 2007; Li et al. 2019; Dang et al. 2021).	7	+	unklar

DICER1	Das Gen agiert als haploinsuffizienter Tumorsuppressor (Kumar et al. 2009). Ein Knockdown von DICER1 fördert die Tumorangiogenese, eine Überexpression führt zu einem verlangsamten Wachstum der Tumorzellen (Hanna et al. 2017; Chen et al. 2014).	14	-	+
LCLAT1	Das Gen aktiviert die 1-Acylglycerol-3-Phosphat-O-Acyltransferase und ist unter anderem in Kolon- und Lungenkarzinomen hochreguliert (Kandasamy et al. 2020). LCLAT1 moduliert die Expression von VEGF (Kandasamy et al. 2020).	2	+	unklar
MANF	Das Gen fördert Angiogenese durch die Hochregulierung von CD34+ und die Aktivierung von VEGF (Gao et al. 2020). Eine erhöhte Expression von MANF geht mit einer erhöhten Tumorpheriferation einher (He et al. 2020; Yu et al. 2021).	3	+	+
MECP2	Das Gen reguliert über den MECP2/SIRT1 Weg angiogene Funktionen von Endothelzellen und wirkt bei verschiedenen Krebsarten als Onkogen (Volkman et al. 2013; Zhao et al. 2017; Pan et al. 2019; Guan et al. 2019; Wang et al. 2020).	X xq28	+	+
MMP2	Das Gen wirkt als Onkogen und fördert in Tumoren unter anderem über den VEGF/ERK1/2-Signalweg die Tumorangiogenese (Tang et al. 2019, Liu et al. 2018d, Huang et al. 2014; Wu et al. 2018; Liu et al. 2018a, 2018a).	16	+	+
P2RX4	Das Gen spielt eine wichtige Rolle in der durch extrazelluläre Vesikel induzierte Angiogenese und Vaskulogenese in Tumoren (Huo und Chen 2019). Eine Überexpression geht in der Regel mit einer erhöhten Tumorpheriferation einher (Palinski et al. 2021).	12	+	unklar
PDE3B	Das Gen ist ein negativer Regulator der Angiogenese, unter anderem durch die Regulierung des CDC42 und PKA-Signalweges (MackKeil et al. 2019).	11	-	+
PTGS2	Das Gen spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Prostaglandinen (Gately und Li 2004). Die proangiogenen Effekte bei der Tumorangiogenese resultieren aus der Produktion von VEGF, die Induktion von Matrixmetalloproteasen, Suppression von Interleukin-12 und Aktivierung epidermaler Wachstumsfaktoren (Gately und Li 2004; Sakurai et al. 2011).	1	+	+
PTK2	Die Aktivierung des Gens geht mit der Stimulierung von Wachstumsfaktoren und Cytokinen einher (Giancotti und Ruoslahti 1999). PTK2, auch durch Stimulierung der Faktoren VEGF und FGF2, aktiviert und fördert die Sekretion von MMP2 und MMP9 (Giancotti und Ruoslahti 1999; Haskell et al. 2003).	8	+	+

SLC1A5	Das Gen spielt eine wichtige Rolle beim Glucose- und Energiestoffwechsel (Scalise et al. 2020). Der metabolische Signalweg ist wichtig für das Überleben von Tumorzellen. In Tumorzellen geht eine erhöhte Expression von SLC1A5 mit einer erhöhten Expression von VEGF-R2 einher, wodurch SLC1A5 eine wichtige Rolle bei der Tumorangiogenese zugesprochen wird (Bjersand et al. 2017).	19	+	+
RTN4	Das Gen fördert die Genexpression von Zytokinen und Chemokinen, die im Zusammenhang mit Angiogenese stehen (Cai et al. 2018). Eine verringerte Expression von RTN4 in Tumorzellen führt zu einer verringerten Tumorphiliferation in vitro und in vivo (Pathak et al. 2018).	2	+	+
SIX1	Das Gen fördert über eine erhöhte Regulation von BEGF und VEGF-C neben der Angiogenese, auch die Proliferation und Metastasierung in Tumoren (Xu et al. 2017; Kingsbury et al. 2019).	14	+	+
TRAF6	Das Gen wirkt bei der Tumorangiogenese als proangiogener Faktor, indem es HIF-1 $\alpha$ erhöht, welches VEGF reguliert und somit die Tumorangiogenese fördert (Keith et al. 2011; Semenza 2003; Wilson und Hay 2011). TRAF6 spielt beim entzündungsinduzierten Tumorzellwachstum eine wichtige Rolle (Sun et al. 2013).	11	+	+
WDR43	Das Gen ist ein positiver Regulator der RNA-Prozessierung und an der Morphogenese der Blutgefäße beteiligt (ZFIN 2023). Ein Knockdown geht in vitro und in vivo mit einer geringeren Tumorzellproliferation einher (Li et al. 2021).	2	+	+
RASA1	Das Gen gilt als Schlüsselprotein der Angiogenese und wirkt unter anderem auf die RAS/MAPK/RAF/MEK Signalwege ein (Di Chen et al. 2019). RASA1 gilt als Tumorsuppressor (Zhang et al. 2020b; Sung et al. 2016).	5	-	+
RRAS	Das Gen agiert als Regulator bei der vaskulären Differenzierung von Blutgefäßen (Ehrhardt et al. 2002). RRAS inhibiert die Tumorangiogenese durch die Verminderung des VEGF-Signalweges in Endothelzellen (Sawada et al. 2015).	19	-	+
SPRED1	Das Gen inhibiert die RAS/MAP- und den RhoA-Signalwege und agiert daher als Tumorsuppressor (Zhang et al. 2020a). SPRED1 ist ein negativer Regulator von VEGF3 in Endothelzellen. So führt eine erhöhte Expression von SPRED1 zu einer verminderten Angiogenese in Tumorzellen (Taniguchi et al. 2007; Pitulescu und Adams 2014; Fish et al. 2008; Ji et al. 2016).	15	-	+
STK4	Das Gen spielt eine wichtige Rolle beim Hippo-Signalweg, welcher durch die	20	-	+

	Einschränkung von Proliferation und Förderung von Apoptose die Tumorsuppression fördert(Boopathy und Hong 2019; Xu et al. 2013; Hoogeboom et al. 2008; Wu et al. 2017).			
TLR4	Das Gen spielt eine wichtige Rolle bei der entzündungsinduzierten Angiogenese (Sato et al. 2008; Ehsan et al. 2013). Der Signalweg stärkt die Immunität der Zellen und wirkt inhibierend auf Tumorzellen (Bauer et al. 2005).	9	-	+
UBIAD1	Das Gen wirkt über eNOS als kardiovaskuläres Antioxidant und wirkt inhibierend über den RAS/ERK Signalweg auf das Zellwachstum (Xu et al. 2018; McGarvey et al. 2001; Fredericks et al. 2013). In mehreren Karzinomen wirkt UBIAD1 als Suppressorgen (Fredericks et al. 2013; McGarvey et al. 2001; McGarvey et al. 2003).	1	-	+
QTRT1	Das Gen entcodet für eine katalysierende Untereinheit der tRNA-Guanintransglycosylasen, welche an der tRNA-Modifikation für bestimmte Aminosäuren beteiligt ist (Johannsson et al. 2018).	19	-	-

*Tabelle 1 Einteilung der Kandidatengene*

Housekeeper: Bei einem Housekeeper handelt es sich um eine Kontrolle, welche die RNA-Ergebnisse aus der RT-PCR normalisiert. Durch die Normalisierung werden experimentelle Variationen wie die Menge des Ausgangsmaterials, die RNA-Extraktion und die Effizienz der reversen Transkriptase berücksichtigt. QTRT1 wurde als Housekeeper ausgewählt, da das Gen in dem vorliegenden Sequencing-Datensatz (RefSeq) keine signifikanten Expressionsänderungen innerhalb der verschiedenen Kontrollgruppen, also den experimentellen Bedingungen zeigt.

### 3.2 Ergebnisse RNA Experimente im Vergleich zum Sequencing-Datensatz

Nach der Einteilung der Kandidatengene, wurden die Ergebnisse der RNA-Experimente mittels RT-PCR mit den Ergebnissen aus dem Originalsequencing Datensatz (RefSeq) verglichen. Es sollte ermittelt werden, ob die Expressionsunterschiede aus dem Sequencing auf RNA-Ebene reproduzierbar sind.

Expressionsunterschiede zwischen Gruppen der Wildtypmäuse B6 unter Zugabe von Doxycyclin und der F2KD Mäuse unter Zugabe von Doxycyclin sind ein Hinweis, dass die Expression der Gene über Prothrombin reguliert sein könnte. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen, wurden für die Messung auf RNA-Ebene sowohl technische Replikate als auch biologische Replikate verwendet.

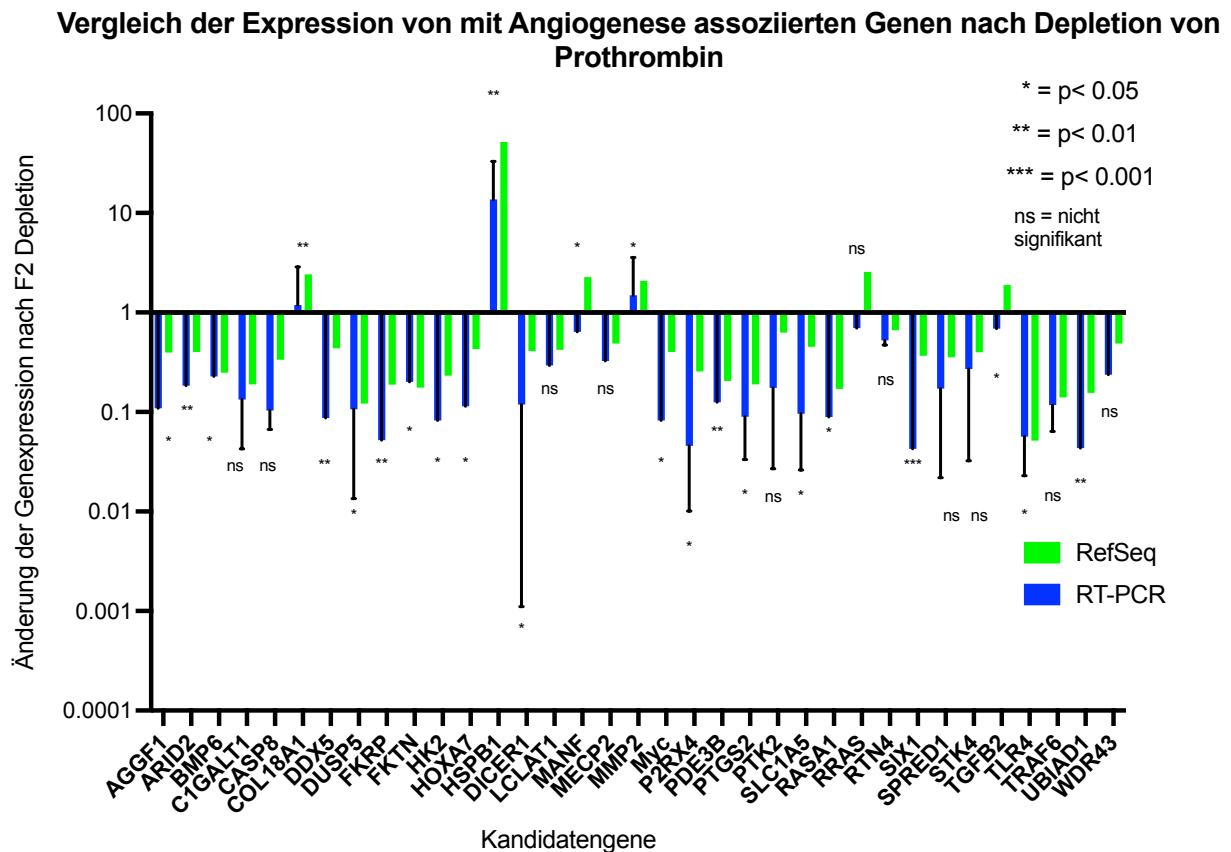


Abbildung 2 Vergleich der Expression mit Angiogenese assoziierter Gene nach Depletion von Prothrombin

In Abbildung 2 wurden die Werte aus den Expressionsmessungen der technischen und biologischen Replikate (RT-PCR) gemittelt und mit dem Mittelwert der Expressionsmessungen aus dem Originalsequencing Datensatz (RefSeq) verglichen. Die blauen Balken zeigen die Mittelwerte aus den zwei RT-PCR Experimenten. Die grünen Balken zeigen den Mittelwert aus dem RefSeq. Die Fehlerbalken zeigen die Mittelwertabweichung. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der RT-PCR-Ergebnisse wurde der Students-T-Test herangezogen. Signifikante Änderungen sind wie folgt hervorgehoben: \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ . Nicht signifikant sind die Ergebnisse, welche mit „ns“ gekennzeichnet sind.

Die Abbildung 2 zeigt die Expressionsunterschiede zwischen den Vergleichsgruppen Sequencing B6+Dox, B6+Dox, Sequencing F2+Dox und F2+ Dox. Es wurden die Daten aus dem Originalgenexpressions-Datenatz (RefSeq) und aus den technischen und biologischen Replikaten verwendet.

In der vergleichenden Analyse (Abbildung 2) wird deutlich, dass bei 24 von 35 Genen die Ergebnisse aus dem RefSeq signifikant reproduzierbar sind. Bei 11 Genen sind die Ergebnisse nicht signifikant reproduzierbar. Jedoch zeigt sich auch bei den nicht signifikant reproduzierbaren Ergebnissen, wie beispielsweise bei den Genen C1GALT1, CASP8, SLC1A5 und TRAF6 der gleiche Trend bezüglich des Expressionsverhaltens im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem RefSeq. Die Abbildung 2 zeigt, dass die Expressionsunterschiede der Gene unter einer Depletion von Prothrombin unterschiedlich hoch sind. Schwankungen bei der Stärke des Expressionsunterschiedes, sieht man besonders bei den Genen TGFB2, RTN4, RRAS, SLC1A5 und MECP2. Im Vergleich ist bei den Genen HSPB1, TLR4 und AGGF1 ein großer Expressionsunterschied zu erkennen.

Da der Großteil der Gene jedoch einen klaren Expressionsunterschied aufweist und der Trend bei den oben genannten Genen, trotz geringerer Expressionsunterschieden gleich ist, werden die Daten als valide interpretiert. So zeigt die Abbildung 2, dass die Ergebnisse aus dem Originalgenexpressions-Datensatz reproduzierbar sind und eine Änderung der Expression dieser Gene unter der Depletion von Prothrombin auf RNA-Ebene stattfindet.

### 3.2.1 Einteilung der Kandidatengene anhand ihres Expressionsverhaltens

Um die Kandidatengene anhand ihres Expressionsverhaltens bei einer Depletion von Prothrombin zu studieren, wurden die Kandidatengene danach eingeteilt, ob sie bei einer Depletion von Prothrombin erhöht oder vermindert exprimiert werden. Wie aus Diagramm 2 zu entnehmen ist, führt eine Depletion von Prothrombin bei einem Großteil der Kandidatengene zu einer verminderten Expression.

## Expressionsverhalten der Gene

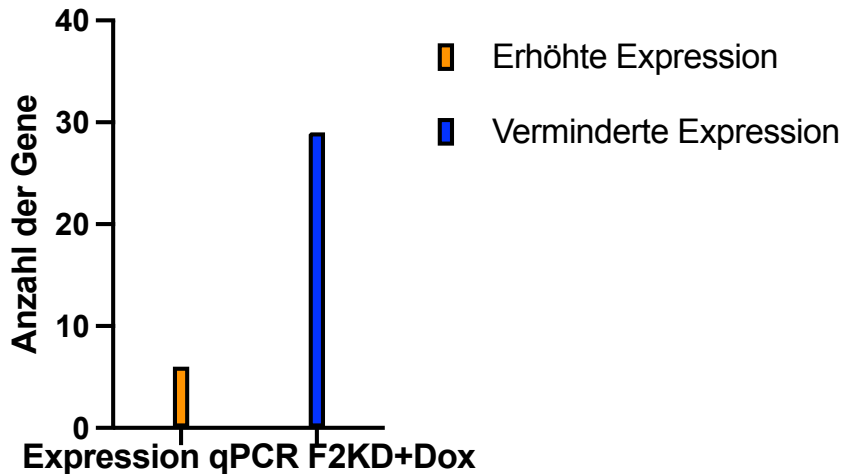


Abbildung 3 Expressionsverhalten der Gene

Im Diagramm wird auf der X-Achse die Expression der Kandidatengene in erhöhte und erniedrigte Expression unterteilt. Mit Expression ist der erhöhte oder erniedrigte CT-Wert der F2KD Zellen aus der RT-PCR gemeint, welche mit Doxycyclin behandelt wurden, im Vergleich zu den F2KD Zellen, welche nicht mit Doxycyclin behandelt wurden. Die Y-Achse stellt die Anzahl der Gene dar.

Die Abbildung 3 zeigt eine Aufteilung der 35 untersuchten Gene in erhöhte und verminderte Expression. Die Auswertung zeigt, dass 29 der 35 (82,9%) untersuchten Gene der Fibrosarkomzellen unter einem Knockdown von Prothrombin vermindert exprimiert werden. Zu einer erhöhten Expression kommt es bei 6 der untersuchten Gene (17,1%). Die Mehrzahl der untersuchten Gene scheint also nach Depletion von Prothrombin vermindert exprimiert zu sein.

### 3.2.2 Einteilung der Kandidatengene anhand ihrer Angiogenität

Wie zuvor beschrieben, wurden 35 Kandidatengene aus dem Genexpressionsdatensatz ermittelt. Diese zeigen einen signifikanten Expressionsunterschied und werden auch in der Literatur mit der Tumorangiogenese in Verbindung gebracht. In der folgenden Abbildung 4 wurden die Kandidatengene anhand ihrer tumorangiogenen Eigenschaft unterteilt. Die Kandidatengene wurden in proangiogen und antiangiogen unterteilt. Ob Gene als proangiogen oder antiangiogen eingeteilt werden, wurde durch eine Literaturrecherche ermittelt. Die Ergebnisse dieser Literaturrecherche können der Tabelle 1 entnommen werden. Aus der

Abbildung 4 ist zu entnehmen, dass die Mehrzahl der Kandidatengene als proangiogen gilt.

### Anzahl proangiogener und antiangiogener Gene

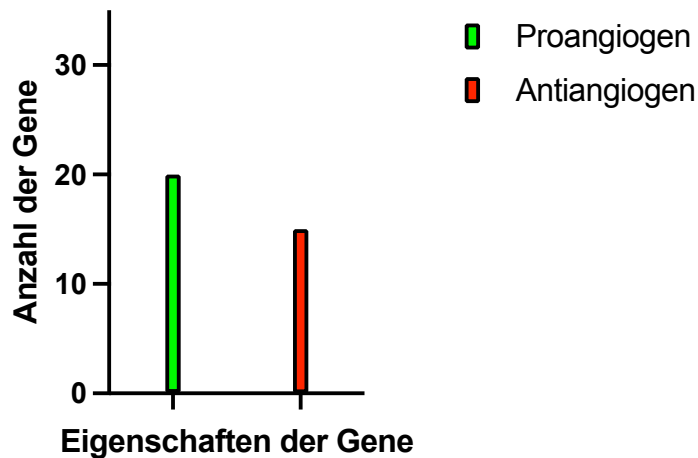


Abbildung 4 Anzahl proangiogener und antiangiogener Gene

Im Diagramm werden die Kandidatengene in ihren Eigenschaften unterteilt. Als proangiogen gelten Gene, welche einen proangiogenen Effekt auf die Tumorangio-genese haben. Als antiangiogen werden Gene bezeichnet, welche einen antiangiogenen Effekt auf die Tumorangio-genese haben. Die Y-Achse stellt die Anzahl proangiogener und antiangiogener Gene dar.

Die Abbildung 4 zeigt, dass von den 35 Kandidatengenen 20 (57,1%) der Gene als proangiogen gelten. Als antiangiogen gelten 15 der 35 Gene (42,9%). Dies zeigt, dass die Mehrheit der 35 Kandidatengene proangiogene Eigenschaften aufweist. Wenn man die Ergebnisse aus den Abbildungen 2 und 3 miteinander vergleicht, zeigt sich, dass die meisten Gene unabhängig davon, ob sie als proangiogen oder antiangiogen gelten, unter einer Depletion von Prothrombin vermindert exprimiert werden. Dies ist insofern interessant, da man eigentlich davon ausgehen würde, dass antiangiogene Gene, unter einer Depletion von Prothrombin, welchem proangiogene Eigenschaften zugesprochen werden, eine erhöhte Expression aufweisen. Im Folgenden werden daher die einzelnen Gene in ihrem Expressionsverhalten im Zusammenhang mit ihren proangiogenen oder antiangiogenen Eigenschaften unterteilt.

### 3.2.3 Expressionsdaten der angiogenen Kandidatengene

Wie zuvor beschrieben, wurden die 35 Kandidatengene anhand einer Literaturrecherche als proangiogen und antiangiogen eingeteilt. Als proangiogen werden Gene bezeichnet, die sich positiv auf die Angiogenese in Tumoren auswirken. Als antiangiogen gelten Gene, die einen negativen Einfluss auf die Tumorangio-genese haben. Die Einteilung der Gene ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Die proangiogenen Gene, welche bei der Gesamtzahl der Gene, wie zuvor in der Abbildung 4 dargestellt, mit 57,1% die Mehrheit der Kandidatengene ausmachen, sind im Diagramm der Abbildung 5 anhand ihres Expressionsverhaltens aufgeteilt. Die proangiogenen Gene wurden unterteilt, ob diese unter einer Depletion von Prothrombin erhöht oder erniedrigt exprimiert werden. Dafür wurden die beiden Vergleichsgruppen F2KD+Dox und B6+Dox ausgewählt. Es wird die Expression Gruppe F2KD+Dox im Verhältnis zur Gruppe B6+Dox betrachtet.

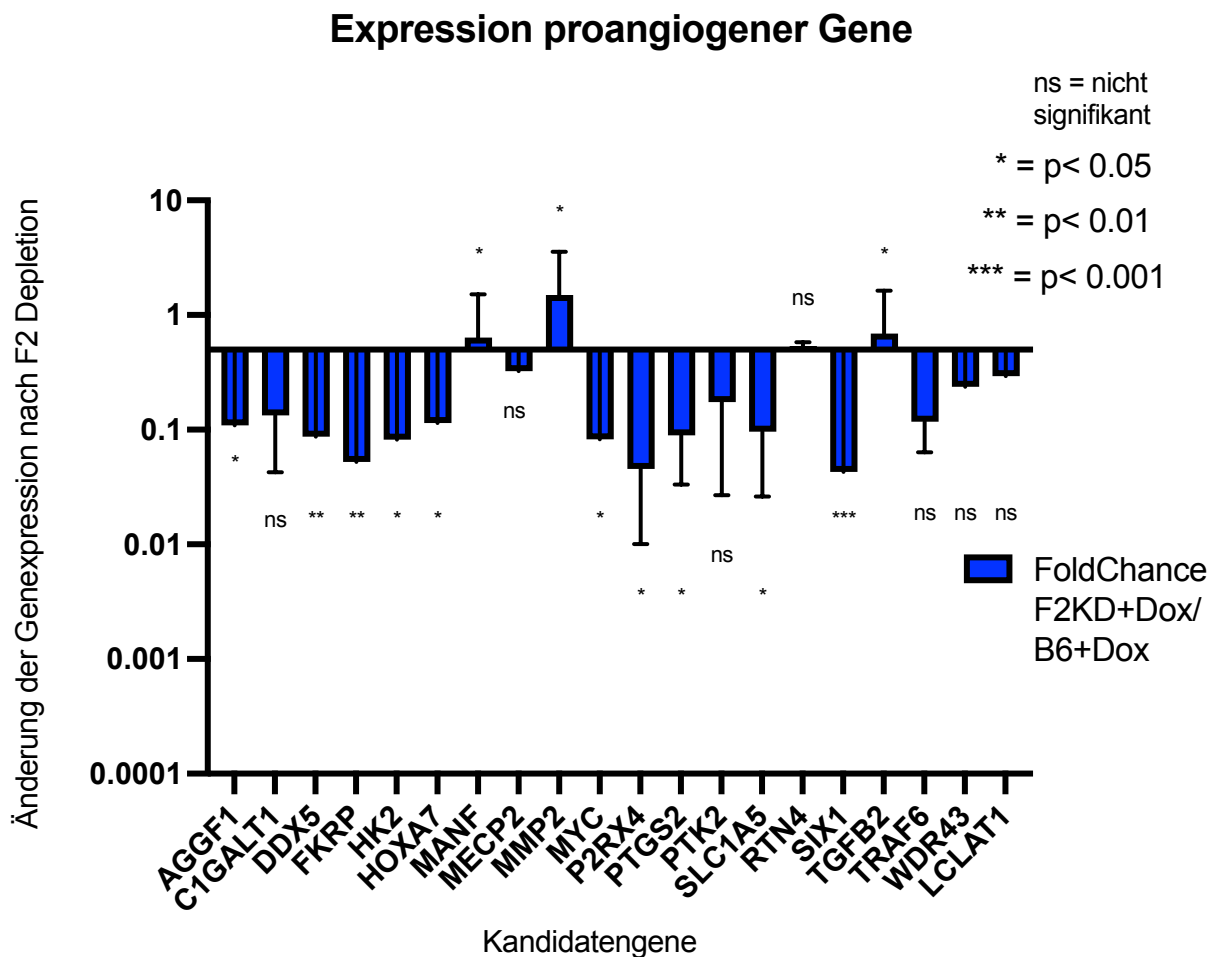


Abbildung 5 Expression proangiogener Gene

In dem Diagramm werden auf der X-Achse die Kandidatengene, welche laut Literaturrecherche als proangiogen gelten, dargestellt. Die Y-Achse zeigt anhand einer logarithmischen Skala den FoldChange der Gruppen F2KD+Dox und B6+Dox. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus den zwei RT-PCR Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Mittelwertabweichung. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der RT-PCR-Ergebnisse wurde der Students-T-Test herangezogen. Signifikante Änderungen sind wie folgt hervorgehoben: \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ . Nicht signifikant sind die Ergebnisse, welche mit „ns“ gekennzeichnet sind.

Der Abbildung 5 ist zu entnehmen, dass 17 von 20 (85%) der proangiogenen Gene unter einer Depletion von Prothrombin runterreguliert sind. Die drei Gene MANF, MMP2 und TGFB2 sind unter einer Depletion von Prothrombin hochreguliert (15%). Dass die proangiogene Gene MANF, MMP2 und TGFB2 bei einer verminderten Prothrombinexpression im Tumorgewebe hochreguliert werden, macht sie zu interessanten Kandidaten. Durch die Annahme, dass eine erhöhte Prothrombinexpression mit einer erhöhten Tumorangiogenese einhergeht, würde man bei einer Depletion von Prothrombin von einer verminderten Expression ausgehen. MANF fördert die Angiogenese durch die Hochregulierung von CD34+ und die Aktivierung von VEGF (Gao et al. 2020). TGFB2 wird thrombinabhängig gespalten, wirkt wachstumsstimulierend auf Tumorzellen und blockiert Antitumoraktivitäten, wie die Antigenpräsentation (Friess et al. 1993; Bernstorff et al. 2001; Jachimczak et al. 1993). MMP2 fördert in Tumoren auch durch Hypoxie induziert die Tumorangiogenese über den VEGF/ERK1/2-Signalweg (Tang et al. 2019, Liu et al. 2018d, Huang et al. 2014; Wu et al. 2018; Liu et al. 2018a, 2018a).

Bei den drei Genen MANF, MMP2 und TGFB2 ist bekannt, dass sie entweder Thrombin- oder VEGF-abhängig reguliert werden. Gemeinsam haben die Gene TGFB2 und MANF, dass sie beide Einflüsse auf die Antigenpräsentation nehmen. Der Zusammenhang zwischen der Angiogenese und Entzündungsreaktionen ist ein stark untersuchter Gegenstand in der aktuellen Forschung (Jeong et al. 2021).

### 3.2.4 Expressionsdaten der antiangiogenen Kandidatengene

Nachfolgend wurden in der Abbildung 6 die 15 Kandidatengene, welche laut Literaturrecherche als antiangiogen eingeteilt sind (siehe Tabelle 1), anhand ihres Expressionsverhaltens dargestellt. Die Expressionen der Gruppen F2KD2+Dox und B6+Dox werden miteinander verglichen, wobei der Fokus auf der Gruppe F2KD+Dox liegt, wie diese sich zu der Gruppe B6+Dox verhält.

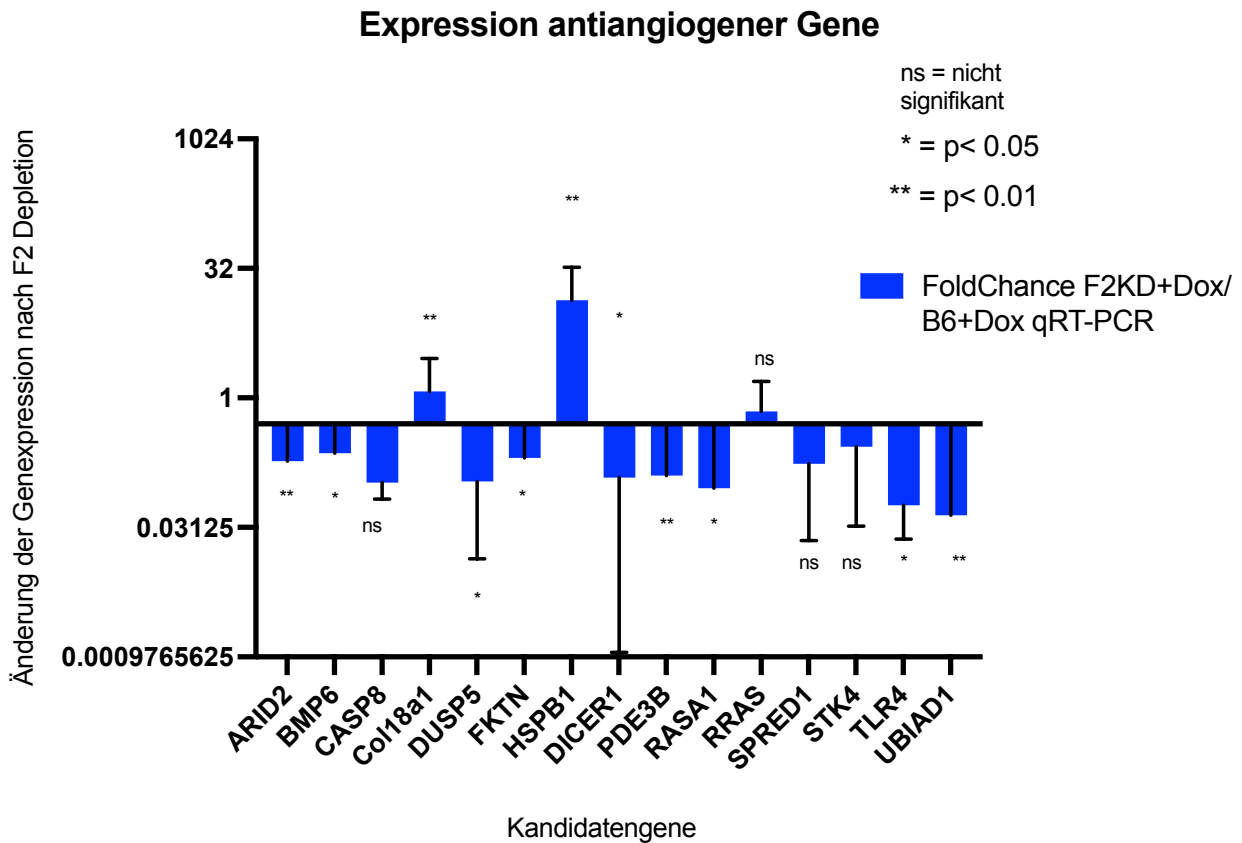


Abbildung 6 Expression antiangiogener Gene

In dem Diagramm werden auf der X-Achse die Kandidatengene, welche laut Literaturrecherche als antiangiogen gelten, dargestellt. Die Y-Achse zeigt anhand einer logarithmischen Skala den FoldChange der Gruppen F2KD+Dox und B6+Dox. Die Balken zeigen die Mittelwerte aus den zwei RT-PCR Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die Mittelwertabweichung. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz der RT-PCR-Ergebnisse wurde der Students-T-Test herangezogen. Signifikante Änderungen sind wie folgt hervorgehoben: \*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ , \*\*\*= $p < 0,001$ . Nicht signifikant sind die Ergebnisse, welche mit „ns“ gekennzeichnet sind.

Bei den antiangiogenen Genen sind 12 von 15 Genen (80%) unter einer Depletion von Prothrombin runterreguliert. Hochreguliert sind unter einer Depletion von Prothrombin 3 der 15 Gene (20%). Dass Thrombin proangiogen und antiangiogen auf die Tumorangio-genese wirkt ist Gegenstand mehrerer Studien (Chan et al. 2003; Möhle et al. 1997; Ma et al. 2001). Die Studienlage zu Prothrombin ist jedoch noch relativ unklar. Dass antiangiogene Gene unter einer Depletion von Prothrombin hochreguliert sind, unterstützt die Annahme, dass sich Prothrombin proangiogen auf die Tumorangio-genese auswirken könnte. Die Abbildung 6 zeigt jedoch, dass nur 20% der Gene hochreguliert sind und 80% runterreguliert. Dass unter einer Prothrombindepletion neben proangiogenen Genen auch antiangiogene Gene in ihrer

Expression gemindert sind, ist ein Hinweis, dass Prothrombin sowohl auf pro- als auch antiangiogene Prozesse Einfluss hat.

Bei den antiangiogenen Genen, welche unter einer Depletion von Prothrombin erhöht exprimiert werden, handelt es sich um die Gene COL18A1, HSPB1 und RRAS.

Der lösliche Anteil von HSPB1 wird von Endothelzellen freigesetzt und steigt als Gegenreaktion zu dem erhöhten VEGF. VEGF steuert die Phosphorylierung von intrazellulärem HSPB1, wodurch es zu einer inhibierten Sekretion und Bindung an Endothelzellen kommt. Ein erniedrigter HSPB1 Spiegel fördert die VEGF induzierte Angiogenese (Lee et al. 2012).

Col18a1 codiert für Endostatin, welches stark angiogenetisch wirkt und von Blutplättchen als Antwort auf erhöhte Thrombinexpressionen freigesetzt wird und inhibiert VEGF (Sipola et al. 2009).

RRAS inhibiert die Tumorangiogenese durch die Verminderung des VEGF-Signalweges in Endothelzellen (Sawada et al. 2015).

Gemeinsam haben die drei Gene COL18A1, HSPB1 und RRAS, dass alle die Angiogenese über die Regulierung von VEGF vermindern können.

### 3.3 Ergebnisse Western Blots

Als nächstes wurden exemplarisch für 2 der 35 Kandidatengene, die Gene MMP2 und HSPB1 mittels Western Blot überprüft, ob sich die Regulation, welche auf RNA-Ebene nachgewiesen wurde, auch auf Proteinebene stattfindet.

#### 3.3.1 Expression MMP2 im Westernblot

Im Folgenden ist der Western Blot für das Gen MMP2 dargestellt.

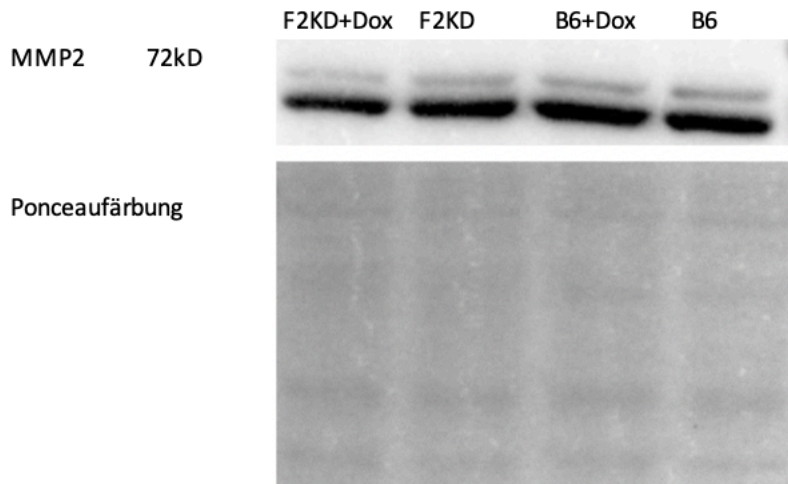


Abbildung 7 Western Blot MMP2

Gezeigt sind 4 verschiedene Proteinladungen in einem Westernblot mit der dazugehörigen Ladungskontrolle.

Es wurden F2KD-Fibrosarkomzellen bei einer Doxycyclinkonzentration von 10µg/ml im Vergleich zu F2KD-Fibrosarkomzellen ohne Doxycyclinbehandlung, B6 Wildtypmäuse mit 10µl/ml Doxycyclinbehandlung und ohne Doxycyclinbehandlung miteinander verglichen. Der vorliegende Western Blot hat eine primäre Antikörperverdünnung des Gens MMP2 von 1:1000 und einer sekundären Antikörperverdünnung von 1:10 000. Unter den Banden ist die Ladungskontrolle mittels einer Ponceaufärbung dargestellt. Sie soll eine gleichmäßige Proteinladung zeigen.

Der vorliegende Western Blot zeigt einen Nachweis des Proteins MMP2. Es wurden 4 Proteinladungen vorgenommen. Bei den untersuchten Zellen handelt es um F2KD-Fibrosarkomzellen mit einer Doxycyclinkonzentration von 10µg/ml im Vergleich zu F2KD-Fibrosarkomzellen ohne Doxycyclinbehandlung, B6 Wildtypmäuse mit 10µl/ml Doxycyclinbehandlung und ohne Doxycyclinbehandlung.

Die Ponceaufärbung als Ladungskontrolle zeigt, dass das Gel gleichmäßig beladen wurde.

Es bilden sich Banden bei einem erwarteten Molekulargewicht von 72kDa. Die Banden zeigen innerhalb der Gruppen keinen Unterschied in ihrer Stärke.

Das Ergebnis aus dem Western Blot von MMP2 unterscheidet sich von den Ergebnissen von MMP2 aus den RT-PCR Daten. Während es bei MMP2, in Abbildung 2 dargestellt, zu einer veränderten Expression zu den Kontrollgruppen F2KD+Dox und B+Dox auf RNA-Ebene kommt, sieht man keinen Expressionsunterschied bei den Western Blots auf Proteinebene.

Ausgehend von den Ergebnissen aus den Sequencing-Daten und den RT-PCR-Daten, würde man davon ausgehen, dass die Bande F2KD+Dox stärker als die der Vergleichsgruppen ist. Vergleicht man die Dicke der Bande F2KD+Dox mit den Banden F2KD-Dox, B6+Dox und B6-Dox, erscheint die Bande sogar eher schwächer

im Vergleich, was auf eine verminderte Expression von MMP2 unter einer Depletion von Prothrombin auf Proteinebene sprechen würde. In diesem Fall stünden die Ergebnisse aus RT-PCR und Western Blot im Widerspruch zueinander. Es würde bedeuten, dass unter einer Depletion von Prothrombin eine erhöhte Expression von MMP2 auf RNA-Ebene stattfinden würde und eine verminderte Expression von MMP2 auf Proteinebene.

### 3.3.2 Expression HSPB1 im Westernblot

Als nächstes wurde die Expression von HSPB1A und HSPB1 studiert.

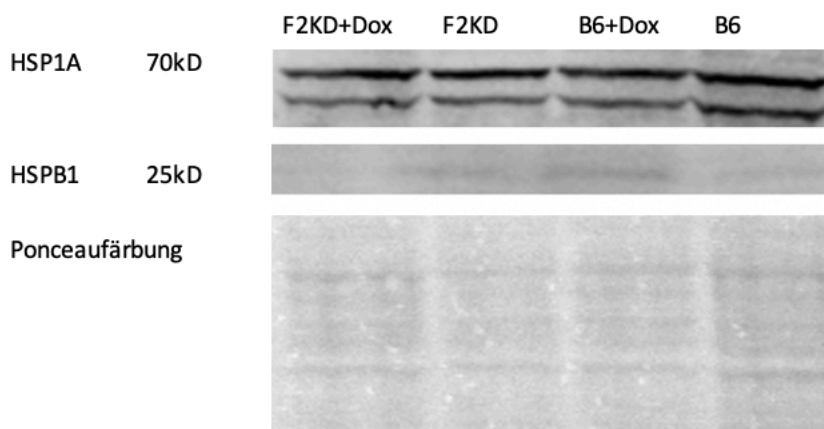


Abbildung 8 Western Blot HSPB1

Die Abbildung zeigt 4 verschiedene Proteinladungen in einem Westernblot mit der dazugehörigen Ladungskontrolle.

Es wurden F2KD-Fibrosarkomzellen bei einer Doxycyclinkonzentration von 10µg/ml im Vergleich zu F2KD-Fibrosarkomzellen ohne Doxycyclinbehandlung, B6 Wildtypmäuse mit 10µl/ml Doxycyclinbehandlung und ohne Doxycyclinbehandlung miteinander verglichen. Der vorliegende Western Blot hat eine primäre Antikörperverdünnung des Gens HSPB1 von 1:250 und einer sekundären Antikörperverdünnung von 1:10 000. Unter den Banden ist die Ladungskontrolle mittels einer Ponceaufärbung dargestellt. Sie soll eine gleichmäßige Proteinladung zeigen.

Der vorliegende Western Blot zeigt einen Nachweis des Proteins HSPB1. Es wurden 4 Proteinladungen vorgenommen. Bei den untersuchten Zellen handelt es um F2KD-Fibrosarkomzellen mit einer Doxycyclinkonzentration von 10µg/ml im Vergleich zu F2KD-Fibrosarkomzellen ohne Doxycyclinbehandlung, B6 Wildtypmäuse mit 10µl/ml Doxycyclinbehandlung und ohne Doxycyclinbehandlung.

Die Ponceaufärbung als Ladungskontrolle zeigt, dass das Gel gleichmäßig beladen wurde.

Es bilden sich schwache Banden bei einem erwarteten Molekulargewicht von 27 kDa und starke Banden bei 70kDa, wobei es sich dabei um HSPB1A handeln könnte,

ebenfalls ein Mitglied der Heatshockproteine. Interaktionen der beiden Gene miteinander sind bekannt (Périard et al. 2012; Ogbodo et al. 2023). Die Banden zeigen innerhalb der Gruppen keinen Unterschied in ihrer Stärke.

Das Ergebnis aus dem Western Blot von HSPB1 unterscheidet sich von den Ergebnissen von HSPB1 aus den RT-PCR und Sequencing Daten. Während es bei HSPB1, in Abbildung 2 dargestellt, zu einer erhöhten Expression im Vergleich zu den Kontrollgruppen F2KD+Dox und B+Dox auf RNA-Ebene kommt, sieht man keinen Expressionsunterschied bei den Western Blots auf Proteinebene.

Das bedeutet, dass es bei dem vorliegenden Experiment unter einer Depletion von Prothrombin auf RNA-Ebene zu einer erhöhten Expression von HSPB1 in Fibrosarkomzellen kommt, dieser Expressionsunterschied jedoch nicht auf Proteinebene stattfindet.

## 4 Diskussion

Thrombin nimmt neben der Angiogenese (Tsopanoglou und Maragoudakis 2004) auch auf viele andere Prozesse wie embryonale Entwicklung, Arteriosklerose, angeborene Immunität, akute und chronische entzündliche Prozesse, in der Neuropathologie und Tumorbologie Einfluss (Sun et al. 1998b; Mullins et al. 2009; Joyce und Pollard 2009; Nierodzik und Karpatkin 2006; Turgeon und Houenou 1997; Borissoff et al. 2009).

Im nachfolgenden Kapitel wird versucht die Ergebnisse dieser Arbeit im Hinblick auf eine thrombinabhängige Tumorangiogenese einzuordnen. Als besonders interessant gelten die Kandidatengenene, welche trotz einer Depletion von Prothrombin erhöht exprimiert werden. Je nachdem, ob es sich bei den Genen um proangiogene oder antiangiogene Gene handelt, können somit Rückschlüsse auf Thrombin hinsichtlich dessen angiogenen und antiangiogenen Eigenschaften geschlossen werden.

Der Großteil der untersuchten Gene steht im Zusammenhang mit Thrombin oder VEGF. Ebenfalls ist ein Großteil der Gene sowohl bei den proangiogenen als auch bei den antiangiogenen Kandidaten bei einer Depletion von Prothrombin runterreguliert.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass Gene, welche mit der Tumorangiogenese assoziiert werden, nach einer Depletion von Prothrombin in ihrer RNA-Expression verändert werden. Diese RNA-Expressionsänderung der Gene liegt sowohl in einer verminderten als auch in einer erhöhten Expression vor. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Thrombin einen Einfluss auf die Tumorangiogenese nimmt. Dass neben proangiogenen Genen auch antiangiogene Gene durch eine Depletion von Prothrombin hoch- und runterreguliert werden, ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass Thrombin neben proangiogenen auch antiangiogene Eigenschaften zugeschrieben werden können.

Die gemessenen Expressionsänderungen der Kandidatengene aus dem Genexpressionsdatensatz konnten in dieser Arbeit auf RNA-Ebene mittels RT-PCR reproduziert werden (siehe Abbildung 2).

Bei der pathologischen Tumorangiogenese handelt es sich um einen Prozess, bei dem je nach Tumorart viele verschiedene Signalwege, teilweise abhängig, teilweise unabhängig voneinander, ablaufen. Bei dieser Arbeit wurden Fibrosarkomzellen verwendet. So geben die Ergebnisse dieser Arbeit einen Einblick auf das Expressionsverhalten ausgewählter Kandidatengene unter einer Depletion von Prothrombin bei der Tumorangiogenese. Die Ergebnisse sind daher im Vergleich mit anderen Tumorarten vor diesem Hintergrund zu berücksichtigen.

Dass Thrombin sowohl proangiogene, als auch antiangiogene Eigenschaften besitzt, war in der Vergangenheit Gegenstand mehrerer Forschungsarbeiten (Chan et al. 2003; Möhle et al. 1997; Ma et al. 2001).

Auch unter physiologischen Prozessen wie in der Gerinnungskaskade hat Thrombin eine duale Funktion. Einerseits wirkt es antikoagulant, indem es das Protein C spaltet (Esmon 2003), wodurch die Gerinnungskaskade inhibiert wird. Auf der anderen Seite wirkt es durch die Aktivierung der Blutgerinnung, proangiogen.

Dass Thrombin sowohl pro- als auch antiangiogene Eigenschaften zugesprochen werden könnten, macht es als Target bei der Tumorthherapie besonders interessant. Es würde bedeuten, dass bei der potenziellen Behandlung von Tumoren, welche durch eine Verringerung der Tumorangiogenese durch eine Depletion von Prothrombin erreicht werden soll, ebenfalls ein Fokus auf Genprodukte gelegt werden muss, welche durch eine Depletion von Prothrombin die Tumorangiogenese fördern.

Das bedeutet, dass eine sehr spezifische Inhibition von Genprodukten zur Verringerung der Tumorangiogenese erfolgen muss.

#### 4.1 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des antiangiogenen HSPB1

Das Genkürzel HSPB1 steht für "heat shock protein family B (small) member1" und codiert für HSPB20, einem Mitglied der kleinen heat-shock-protein-Familie. Dieses Protein translokiert unter Stress vom Cytoplasma in den Nukleus und sorgt dort als Chaperon für die richtige Faltung anderer Proteine. Neben dem Einfluss auf die Differenzierung vieler Zelltypen wird eine Expression dieses Proteins mit einer klinisch schlechten Tumorprognose, einer erhöhten Tumorzellproliferation, der Metastasierung und einem Schutz der Tumorzellen vor Apoptose in Verbindung gebracht (Evans et al. 2008).

Lösliches HSPB1, welches primär von Endothelzellen freigesetzt wird, interagiert direkt mit VEGF und hat eine Schlüsselrolle in der Regulation der angiogenetischen Balance (Lee et al. 2012). Die VEGF-gesteuerte Phosphorylierung von intrazellulärem HSPB1 inhibiert die Sekretion von HSPB1 und dessen Bindung an Endothelzellen (Lee et al. 2012). In Endothelzellkulturen aus Tumorzellen mit erniedrigtem HSPB1 unterstützt dies die VEGF induzierte Angiogenese (Lee et al. 2012). Sarkomzellen aus einem Mausmodell, in dem HSPB1 neutralisiert wurde, zeigten ebenfalls ein erhöhtes Tumorwachstum (Lee et al. 2012). Dies zeigt die antiangiogenen Eigenschaften von löslichem HSPB1. Auf der anderen Seite zeigte eine Überexpression von HSPB1 mittels eines adenoviralen Gentransfers eine Verringerung der Lungenmetastasen des CT26-Kolonkarzinoms in vivo (Lee et al. 2012) und eine Neutralisation von HSPB1 fördert in vivo Wundheilung (Lee et al. 2012). So wird neben einer pathologischen auch bei einer physiologischen Angiogenese von einer Interaktion von HSPB1 und VEGF ausgegangen (Lee et al. 2012).

Serum-HSPB1 wird als prognostischer Tumormarker verwendet. Tumorpatienten weisen erhöhte HSPB1-Serumwerte auf (Liao et al. 2009; Huang et al. 2010; Schmitt et al. 2007). Obwohl Tumorzellen bei einer Überexpression von HSPB1 eine erhöhte Radio- und Chemoresistenz aufzeigen (Lee et al. 2005b; Lee et al. 2005a), ist die Rolle von HSPB1 bei der Tumorangiogenese noch nicht vollständig geklärt. Die

Phosphorylierung des HSPB1-Serins 82 durch die PKC vermittelte PKD-Aktivierung durch VEGF fördert die endotheliale Migration und Tubulogenese, was die wichtige Rolle von HSPB1 in der VEGF-abhängigen Angiogenese unterstreicht (Lee et al. 2012).

Lösliches HSPB1 interagiert direkt mit VEGF und inhibiert dadurch die Endothelzell -proliferation und -tubeformation. In Endothelzellen aus Tumoren, welche VEGF sezernieren, ist die Sekretion von HSPB1 verringert (Lee et al. 2012). Beim Wundheilungsprozess bei Mäusen wurde neben einer verringerten Sekretion von HSPB1 eine erhöhte Sekretion von VEGF festgestellt (Lee et al. 2012). Dies weist auf eine Reduktion von HSPB1 durch eine Phosphorylierung des intrazellulären HSPB1 durch die Endothelzellen hin. Es wird davon ausgegangen, dass lösliches HSPB1 VEGF durch eine direkte Interaktion inhibiert (Lee et al. 2012). Eine physiologische Reduktion der HSPB1-Sekretion führt bei einer Aktivierung von VEGF zu einer fortschreitenden Angiogenese (Lee et al. 2012).

Während der Tumorprogression steigt die Sekretion von HSPB1 (Lee et al. 2012). Zu den Schutzmechanismen des Körpers, welche die Tumorangiogenese inhibieren, gehören endogene Inhibitoren wie Thrombospondin-1 und Endostatin (Lee et al. 2012). Dies führt zur Verhinderung eines angiogenen Schalters, bei welchem die proangiogenen Faktoren stärker als die antiangiogenen Faktoren wirken. Dabei kommt es bei Tumoren von einer avaskulären Hyperplasie zu einem wachsenden vaskularisierten Tumor (Baeriswyl und Christofori 2009). Durch die Verhinderung des angiogenen Schalters kommt es nicht zu einer Umwandlung in einen angiogenen Phänotyp (Lee et al. 2012).

Zusammenfassend sorgt das von Endothelzellen sekretierte HSPB1 für eine angiogenetische Balance durch die Bindung an VEGF, während bei der physiologischen Angiogenese eine Inhibition von HSPB1 zu einer erhöhten Angiogenese unter VEGF führt (Lee et al. 2012). Bei einer pathologischen Angiogenese, wie bei Tumorwachstum und Metastasierung, steigt der Anteil an löslichem HSPB1 als Gegenreaktion auf das steigende VEGF. Dieser Anstieg kann die erhöhte Produktion von VEGF der Tumorzellen jedoch nicht kompensieren, was wiederum zu einem Tumorwachstum führt. Obwohl VEGF die Sekretion von HSPB1 verringert, steigt der HSPB1-Spiegel (Lee et al. 2012). Dies ist darauf zurückzuführen, dass andere Faktoren wie Matrixmetalloproteasen die Extrazellulärmatrix von

Endothelzellen verändern und dadurch die Sekretion von HSPB1 gefördert wird (Lee et al. 2012).

Die Abbildung 6 zeigt, dass unter einer Depletion von Prothrombin die Expression von HSPB1 erhöht ist. Dass die Expression von HSPB1 unter einem Knockdown von Prothrombin erhöht ist, könnte auf eine dadurch resultierende verminderte Produktion von VEGF zurückgeführt werden, wodurch eine verminderte Inhibition von HSPB1 durch VEGF stattfindet.

## 4.2 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des antiangiogenen COL18A1

Das Gen Col18a1 codiert für das Kollagen18a1, welches durch Spaltungen am C-terminalen Ende das stark antiangiogene Protein Endostatin bildet (O'Reilly et al. 1997). Endostatin wirkt stark antiangiogen und inhibiert die Tumorangio-genese und das Tumorstadium (O'Reilly et al. 1997). Eine thrombinabhängige Freisetzung von Col18a1 wird durch einen PAR4-Antagonisten blockiert (Ma et al. 2001).

Dass COL18A1 bei Fibrosarkomzellen unter einer Depletion von Prothrombin erhöht exprimiert wird, lässt vermuten, dass es neben dem thrombinabhängigen Mechanismus, bei dem Endostatin freigesetzt wird, einen weiteren Signalweg gibt, der prothrombinabhängig zu einer verringerten Expression von COL18A1 führt.

## 4.3 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des antiangiogenen RRAS

RRAS agiert als Regulator bei der vaskulären Differenzierung von Blutgefäßen (Ehrhardt et al. 2002). RRAS antagonisiert den H-RAS Signalweg (Ramocki et al. 1997). RRAS gilt wegen der Nähe zu den anderen RAS Genen als transformierendes Onkogen (Ehrhardt et al. 2002). RRAS und HRAS wirken entgegengesetzt auf die Zelldifferenzierung (Ramocki et al. 1997). Während RRAS die Differenzierung und Fusion von Fibroblasten begünstigt, inhibiert HRAS diesen Prozess (Ramocki et al. 1997). Es wird davon ausgegangen, dass die Balance zwischen den beiden Genen

entscheidend für das Wachstum und die Differenzierung ist (Ramocki et al. 1997). RRAS-Knockout-Mäuse zeigen eine erhöhte Angiogenese in Tumoren, während RRAS bei forcierter Genexpression als Suppressor der Tumorangiogenese wirkt (Komatsu und Ruoslahti 2005).

In kultivierten Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass RRAS die Internalisation von VEGFR2 unterdrückt (Sawada et al. 2015). Die Stummstellung von RRAS führt zu einer erhöhten VEGFR2 Phosphorylierung (Sawada et al. 2015). RRAS inhibiert die Tumorangiogenese durch die Verminderung des VEGF Signalweges in Endothelzellen (Sawada et al. 2015).

Dass RRAS in Fibrosarkomzellen bei einer Depletion von Prothrombin vermehrt exprimiert wird, gibt einen Hinweis auf mögliche Mechanismen, welche unter Prothrombin Einfluss auf die Expression des antiangiogenen RRAS nehmen.

#### 4.4 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des angiogenen MMP2

MMP2 gehört zur Familie der Matrixmetalloproteasen. Es ist ein zinkabhängiges Enzym, welches durch die Spaltung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und Molekülen der Signaltransduktion in vielen Signalwegen wie beispielsweise der Vaskularisierung, Angiogenese und Metastasierung involviert ist (Godefroy et al. 2011; Brooks et al. 1998; Itoh et al. 1998; Kessenbrock et al. 2010; Liotta et al. 1980; Westermarck und Kähäri 1999).

Eine durch Hypoxie induzierte erhöhte Expression von MMP2 geht mit einer verstärkten Angiogenese und Proliferation von Zellen einher (Liu et al. 2018c).

In Exosomen induziert MMP2 die Angiogenese von Endothelzellen über den VEGF/ERK1/2-Signalweg (Tang et al. 2019).

Auch bei der pathologischen Angiogenese in Tumoren wirkt MMP2 über die Freisetzung von VEGF proangiogen (Belotti et al. 2003).

Eine erhöhte Expression von MMP2 korreliert mit einer erhöhten Tumorangiogenese und Tumorproliferation (Huang et al. 2014; Wu et al. 2018; Liu et al. 2018a, 2018a). Auch in Melanomen korreliert eine erhöhte Expression von MMP2 über den TLR2/TLR4-Signalweg mit einer erhöhten Proliferation, während eine verringerte

Expression mit einem verringerten Tumorwachstum einhergeht (Muniz-Bongers et al. 2021). In Diagramm 4 ist eine vermehrte Expression von MMP2 unter einer Depletion von Prothrombin erkennbar. Da MMP2 VEGF-abhängig exprimiert wird, müsste man bei einer Depletion von Prothrombin ebenfalls von einer Verringerung des MMP2 ausgehen. Dass MMP2 bei einer Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen jedoch erhöht exprimiert wurde, gibt einen Hinweis auf mögliche antiangiogene prothrombinabhängige Signalwege.

#### 4.5 Die Depletion von Prothrombin Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des angiogenen MANF

Das codierte Protein von MANF wird sezerniert und liegt im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Apparat (Kovaleva et al. 2023).

MANF begünstigt die zerebrale Angiogenese nach einem Schlaganfall unter anderem durch die Hochregulierung von CD34 und die Aktivierung des VEGF Signalweges (Gao et al. 2020).

Eine erhöhte Expression von MANF in Leberzellkarzinomen geht mit einer erhöhten Tumorexpression einher (He et al. 2020). Auch bei Cholangiosarkomen geht eine erhöhte MANF-Expression mit einer verringerten Überlebensrate einher (Yu et al. 2021). Die Abbildung 5 zeigt, dass unter einer Depletion von Prothrombin MANF erhöht exprimiert wird. Da MANF proangiogene Eigenschaften aufweist und den VEGF Signalweg aktiviert, wäre man bei einer Depletion von Prothrombin zunächst ebenfalls von einer verminderten Expression von MANF ausgegangen. Dass MANF trotz einer Depletion des Prothrombins in Fibrosarkomzellen erhöht exprimiert wird, gibt einen Hinweis auf prothrombinabhängige antiangiogene Signalwege. Diese möglichen antiangiogenen prothrombinabhängigen Mechanismen machen MANF zu einem interessanten Gegenstand zukünftiger Forschungen im Bezug auf mögliche antiangiogene prothrombinabhängige Mechanismen.

## 4.6 Die Depletion von Prothrombin in Fibrosarkomzellen führt zu einer erhöhten Expression des angiogenen TGFB2

TGFB2 ist eine Isoform von TGFB. TGFB ist ein Cytokin, welches neben dem Immunsystem, Zellfunktionen, die Zellmorphogenese und die Zellproliferation reguliert (Massagué 1998). In normalen Zellen epithelialen Ursprungs und in ausgeprägten Tumorzellen epithelialen Ursprungs supprimiert TGFB die Tumorphiliferation (Massagué 1998; Massagué et al. 2000). Bei Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie Fibroblasten und in undifferenzierten epithelialen Tumorzellen, reagieren die Tumorzellen nicht mehr auf die antiproliferative Wirkung des TGFBs und werden eher durch dieses im Wachstum, stimuliert (Moustakas et al. 2002; Pasche 2001; Akhurst und Derynck 2001; Eppert et al. 1996; Jennings und Pietenpol 1998; Kekow und Wiedemann 1995; Kim et al. 1998; Markowitz et al. 1995; Sun et al. 1998a). Erhöhte TGF-Spiegel beeinflussen parakrin die zelluläre Umgebung wie die Extrazellulärmatrix und Blutgefäßbildung (Moustakas et al. 2002; Akhurst und Balmain 1999). Eine Blockade von TGF im Tumorgewebe sorgt für eine Reduzierung des Tumorstadiums, der Tumordinvasion, der Metastasen, der Transition der epithelialen Zellen zu mesenchymalen Zellen, der Angiogenese und zu einer Umkehrung der Immunsuppression (Jachimczak et al. 1993; Jachimczak et al. 1996).

TGFB2 ist vor allem in malignen Gliomen stark exprimiert. Hohe TGFB2-Spiegel gehen mit dem immundefizienten Status von den erkrankten Patienten einher (Kjellman et al. 2000; Bodmer et al. 1989; Maxwell et al. 1992). Ein supprimiertes Immunsystem sorgt bei Tumorstadien für eine starke Tumorstadienprogression und geht mit einer schlechten Prognose einher (Weller und Fontana 1995; Wojtowicz-Praga 1997). TGFB2 inhibiert die Lymphozytenproliferation, die Immunzellaktivierung und blockiert Antitumorstadienaktivitäten wie z.B die Antigenpräsentation (Jachimczak et al. 1993). Auch beim Pankreaskrebs spielt TGFB2 eine zentrale Rolle bei der Progression des Tumors (Friess et al. 1993; Bernstorff et al. 2001). Eine erhöhte TGFB2-Expression geht mit einem höheren Tumorstadium und Progression des Pankreastumors einher (Friess et al. 1993). In Melanomzellen von entfernten Melanommetastasen konnte eine erhöhter TGFB2-Wert im Plasma festgestellt werden (Krasagakis et al. 1998) Schlingensiepen et al. 2006).

TGFB reguliert die Angiogenese über zwei Smad-Signalwege, welche die endotheliale Zellproliferation und Zellmigration und die endotheliale Zelldifferenzierung und Zellreifung induzieren (Batlle et al. 2019; Goumans et al. 2003; Goumans et al. 2002). Direkte Interaktionen von Prothrombin und TGFB2 sind bisher nicht bekannt, wohingegen Interaktionen von Thrombin TGFB bereits erforscht sind (Chang et al. 2017). Durch den PAR1-Rezeptor wird die TGFB1-Aktivierung und Smad3-Phosphorylierung agonisiert (Chang et al. 2017). Es wird davon ausgegangen, dass Thrombin über den ROCK-Signalweg die TGFB1-Aktivierung integrinabhängig induziert (Chang et al. 2017).

Die Abbildung 5 zeigt, dass es unter einer Depletion von Prothrombin zu einer erhöhten RNA-Expression von TGFB2 kommt. Da TGFB2, wie zuvor beschrieben, als proangiogen gilt, müsste man unter einer Depletion von Prothrombin mit einer verringerten Expression von TGFB2 ausgehen. Dass es unter einer Depletion von Prothrombin jedoch zu einer erhöhten Expression von TGFB2 kommt, lässt möglicherweise auf einen prothrombinabhängigen antiangiogenen Signalweg schließen. Allerdings müsste hierfür die Expressionsänderung auch auf Proteinebene bestätigt werden.

## 4.7 Einteilung von Genen in proangiogen und antiangiogen

Gene können im Hinblick auf die Tumorangio-genese nicht pauschal in pro- und antiangiogen eingeteilt werden. Ob ein Gen im Hinblick auf die Tumorangio-genese pro- oder antiangiogen wirkt, hängt von den Signalwegen der Tumoren ab, welche in verschiedenen Tumoren unterschiedlich ausgeprägt sind, bzw. wie vom Tumor auf die Signalwege Einfluss genommen wird.

Es gibt Hinweise darauf, dass beispielsweise das Kandidatengen BMP6 bei verschiedenen Tumorarten sowohl pro-, als auch antiangiogen wirkt (Seo et al. 2019; Katagiri und Watabe 2016; Ehata et al. 2013; García Muro et al. 2021).

Das Gen BMP6 codiert für einen sezernierten Liganden der TGF-beta-Superfamilie. Durch die Bindung an TGF-beta Rezeptoren kommt es zu einer Aktivierung der SMAD-Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression beeinflussen (Katagiri und Watabe 2016).

Durch die Regulierung von VEGFR2 durch BMP6 kommt es zu einer Beeinflussung des VEGF-Signalweges, wodurch die Proliferation von Krebszellen gestört wird. BMP6 ist in vivo proangiogen und fördert die Neubildung von Endothelzellen (Pulkkinen et al. 2021).

Die Abbildung 6 zeigt, dass es unter einer Depletion von Prothrombin zu einer verminderten RNA-Expression von BMP6 kommt. Dies lässt auf einen prothrombinabhängigen Signalweg von BMP6 schließen. Durch die sowohl proangiogenen als auch antiangiogenen Eigenschaften im Hinblick auf die Tumorangio-genese von BMP6 gibt dies einen Hinweis auf mögliche proangiogene als auch antiangiogene Eigenschaften von Prothrombin.

## 4.8 Die duale Rolle des Prothrombins im Hinblick auf die Tumorangio-genese

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Depletion von Prothrombin sowohl proangiogene als auch anti-angiogene Gene in ihrem Expressionsverhalten auf RNA-Ebene beeinflusst (Abbildung 5 und 6). Es kommt bei proangiogenen und antiangiogenen Genen zu verminderten Expressionen unter einer Depletion von Prothrombin, und vereinzelt zu erhöhten Expressionen. Unter der Prämisse, dass Prothrombin und Thrombin im Hinblick auf die Tumorangio-genese als proangiogen gelten (Tsopanoglou et al. 1993; Maragoudakis et al. 2002; Matsubara et al. 2012), wäre man davon ausgegangen, dass unter einer Depletion von Prothrombin angiogen geltende Gene herunterreguliert sind. Die Abbildung 5 zeigt jedoch, dass die Gene MANF, MMP2 und TGFB2, welche, wie zuvor erwähnt als proangiogen im Hinblick auf die Tumorangio-genese gelten, entgegen der Erwartungen erhöht exprimiert werden. Dies ist zum einen ein Hinweis, dass die Gene MANF, MMP2 und TGFB2 prothrombinabhängig reguliert werden und zum anderem ein Hinweis auf antiangiogene prothrombinabhängige Mechanismen.

Bei den Genen, welchen eine antiangiogene Rolle bei der Tumorangio-genese zugeschrieben wird, würde man unter der Prämisse, dass Thrombin und Prothrombin im Hinblick auf die Tumorangio-genese als proangiogen gelten, mit einer Erhöhung der Expression unter einer Depletion von Prothrombin rechnen. Von den 15

antiangiogenen Kandidatengenen sind jedoch nur die drei Gene COL8A1, HSPB1 und RRAS erhöht exprimiert. Die restlichen 12 Kandidatengene sind unter einer Depletion von Prothrombin vermindert exprimiert, wobei bei dem Gen Bmp6, wie zuvor beschrieben, keine eindeutige Einteilung in proangiogen oder antiangiogen im Hinblick auf die Tumorigenese vorgenommen werden kann. Da ein Großteil der antiangiogenen Gene entgegen der Erwartungen unter einer Depletion von Prothrombin vermindert exprimiert wird, lässt dies neben der Vermutung, dass diese Gene prothrombinabhängig reguliert werden, auf keine eindeutige proangiogene Rolle des Prothrombins schließen.

Wie zuvor beschrieben, ist das angiogene Verhalten von Genen nicht nur abhängig davon, ob es sich um eine physiologische oder pathologische Angiogenese wie beispielsweise bei der Tumorigenese handelt, sondern auch im Hinblick auf die Art des Tumors und den damit verbundenen Signalwegen (Di Cera 2008). Da Thrombin unter physiologische Bedingungen pro- und antiangiogen auf Signalwege wirken kann (Di Cera 2008), deuten die hier gewonnenen Daten darauf hin, dass Thrombin auch im Kontext der pathologischen Angiogenese eine duale Rolle einnehmen könnte.

## 4.9 Die Ergebnisse auf RNA Ebene stimmen nicht mit den Ergebnissen auf Proteinebene überein

Im Folgenden werden die unterschiedlichen Ergebnisse aus der RT-PCR und den Western Blots miteinander verglichen. Besonders ist hier die Limitation der Studie im Hinblick auf den Proteinnachweis gelegt. Die zwei Gene MMP2 und HSPB1 wurden mittels Western Blots auf Proteinebene untersucht, um die Expression der Gene auf RNA und Proteinebene miteinander zu vergleichen. Die Westernblots beider Gene (Abbildung 7 und 8) zeigen keinen Expressionsunterschied bei den F2KD Zellen mit Doxycyclin, das zeigt der Vergleich mit den Kontrollgruppen F2KD Zellen ohne Doxycyclin, B6 mit Doxycyclin und B6 ohne Doxycyclin. Dieses Ergebnis kann mehrere Gründe haben. Einerseits technische Fehler wie unsauberes Arbeiten oder ein Nichtfunktionieren des Antikörpers. Um technische Fehler auszuschließen, wurde bei den Western Blots jeweils eine Verdünnungsreihe hinzugefügt. Die Western Blots

zeigen außerdem gleichmäßige Ladungen und die Banden sind bei dem prognostiziertem Molekulargewicht des Gens am stärksten abgebildet, daher sind technische Fehler beim Versuchsaufbau unwahrscheinlich.

Allerdings bedeutet der nicht abgebildete Expressionsunterschied auf den Western Blots nicht, dass keine Expressionsänderung auf Proteinebene stattfindet. Zunächst wurden exemplarisch nur zwei der 35 Kandidatengene auf Proteinebene untersucht. Eine Betrachtung der übrigen Kandidatengene auf Proteinebene sollte in weiteren Experimenten durchgeführt werden. Bei HSPB1 ist wie in Abbildung 2 zu entnehmen einer starker Expressionsunterschied gemessen worden. Bei MMP2 findet zwar ebenfalls ein Expressionsunterschied statt, jedoch ist dieser weniger signifikant. Bei beiden Genen handelt es sich um Kandidaten, welche unter einer Depletion von Prothrombin auf RNA-Ebene erhöht exprimiert wurden. Der Versuchsaufbau müsste mit höheren und niedrigeren Doxycyclinkonzentrationen wiederholt werden. Es müssten außerdem längere Expositionszeiten der Zellen mit Doxycyclin getestet werden, um auch längere Halbwertszeiten der Proteine zu berücksichtigen. Um funktionelle Schlüsse zur prothrombinabhängigen Tumorangio-genese der Gene zu ziehen ist ein funktioneller Assay notwendig. Für einen alternativen in vivo Versuch würde sich ein Matrigel Assay unter einer weiteren Einbringung einer siRNA eignen, bei denen bei Aktivierung spezifische Gene herunterreguliert werden und dann die Expression dieser gemessen wird. Als weiterer in vivo Versuch würde sich der CAM-Angiogenese-Assay anbieten (Ribatti 2017), um eine Erhöhung oder Verringerung der Angiogenese bei Behandlung der Membran mittels einer siRNA, wo gewünschte Genprodukte verringert oder erhöht exprimiert werden.

So können die Ergebnisse der qPCR auf RNA-Ebene als Basis für weitergehende Experimente genutzt werden, die mögliche prothrombinabhängige Signalwege bei der Tumorangio-genese zeigen.

## 5 Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit, neben der Reproduktion der Ergebnisse eines bereits vorhandenen Gendatensatzes mittels Sequencing auf RNA- und Proteinebene, auch eine Beurteilung dieser Ergebnisse vorgenommen. Dass Thrombin als Schlüsselrolle in vielen physiologischen Prozessen auch im Hinblick auf pathologische Prozesse eine wichtige Rolle einnimmt (Rittirsch et al. 2008; Borissoff et al. 2009; Turgeon und Houenou 1997, 1997, 1997; Nierodzik und Karpatkin 2006; Joyce und Pollard 2009), ist unbestritten. Interessant sind die Hinweise auf eine mögliche duale Rolle des Thrombins hinsichtlich seiner angiogenen Eigenschaften, die diese Arbeit gewährt. Die Theorie, dass Thrombin sowohl pro- als angiogen auf pathologische Prozesse wie die Tumorangio-genese wirken kann, ist wichtig für die zukünftige Forschung an Angiogenesehemmern, wie sie bereits in der Tumorthherapie angewendet werden (Kubota 2012).

## 6 Literaturverzeichnis

- Akhavan, S.; Mannucci, P. M.; Lak, M.; Mancuso, G.; Mazzucconi, M. G.; Rocino, A. et al. (2000): Identification and three-dimensional structural analysis of nine novel mutations in patients with prothrombin deficiency. In: *Thrombosis and haemostasis* 84 (6), S. 989–997.
- Akhavan, S.; Rocha, E.; Zeinali, S.; Mannucci, P. M. (1999): Gly319 -- arg substitution in the dysfunctional prothrombin Segovia. In: *British journal of haematology* 105 (3), S. 667–669. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01423.x.
- Akhurst, R. J.; Balmain, A. (1999): Genetic events and the role of TGF beta in epithelial tumour progression. In: *The Journal of pathology* 187 (1), S. 82–90. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:1<82::AID-PATH248>3.0.CO;2-8.
- Akhurst, Rosemary J.; Derynck, Rik (2001): TGF-  $\beta$  signaling in cancer – a double-edged sword. In: *Trends in Cell Biology* 11 (11), S44-S51. DOI: 10.1016/S0962-8924(01)02130-4.
- ALGIRE, G. H.; LEGALLAIS, F. Y.; ANDERSON, B. F. (1954): Vascular reactions of normal and malignant tissues in Vivo. VI. The role of hypotension in the action of components of podophyllin on transplanted sarcomas. In: *Journal of the National Cancer Institute* 14 (4), S. 879–893.
- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. (1999): On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. In: *Biochimica et biophysica acta* 1473 (1), S. 4–8. DOI: 10.1016/s0304-4165(99)00165-8.
- Baeriswyl, Vanessa; Christofori, Gerhard (2009): The angiogenic switch in carcinogenesis. In: *Seminars in cancer biology* 19 (5), S. 329–337. DOI: 10.1016/j.semcancer.2009.05.003.
- Bajzar, L.; Morser, J.; Nesheim, M. (1996): TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (28), S. 16603–16608. DOI: 10.1074/jbc.271.28.16603.
- Bär, T. (1980): The vascular system of the cerebral cortex. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg (59).
- Bar-Shavit, R.; Kahn, A.; Wilner, G. D.; Fenton, J. W. (1983): Monocyte chemotaxis: stimulation by specific exosite region in thrombin. In: *Science (New York, N.Y.)* 220 (4598), S. 728–731. DOI: 10.1126/science.6836310.
- Batlle, Raquel; Andrés, Eva; Gonzalez, Lorena; Llonch, Elisabet; Igea, Ana; Gutierrez-Prat, Núria et al. (2019): Regulation of tumor angiogenesis and mesenchymal-endothelial transition by p38 $\alpha$  through TGF- $\beta$  and JNK signaling. In: *Nature communications* 10 (1), S. 3071. DOI: 10.1038/s41467-019-10946-y.
- Bauer, Alison K.; Dixon, Darlene; DeGraff, Laura M.; Cho, Hye-Youn; Walker, Christopher R.; Malkinson, Alvin M.; Kleeberger, Steven R. (2005): Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis. In: *Journal of the National Cancer Institute* 97 (23), S. 1778–1781. DOI: 10.1093/jnci/dji403.
- BAUER, H.; FLANAGAN, J. F.; SHELDON, W. H. (1956): The effects of metabolic alterations on experimental *Rhizopus oryzae* (mucormycosis) infection. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 29 (1), S. 23–32.

- Baumann, Fusun; Leukel, Petra; Doerfelt, Anett; Beier, Christoph P.; Dettmer, Katja; Oefner, Peter J. et al. (2009): Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. In: *Neuro-oncology* 11 (4), S. 368–380. DOI: 10.1215/15228517-2008-106.
- Belotti, Dorina; Paganoni, Paola; Manenti, Luigi; Garofalo, Angela; Marchini, Sergio; Taraboletti, Giulia; Giavazzi, Raffaella (2003): Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. In: *Cancer research* 63 (17), S. 5224–5229.
- Bernstorff, W. von; Voss, M.; Freichel, S.; Schmid, A.; Vogel, I.; Jöhnk, C. et al. (2001): Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7 (3 Suppl), 925s-932s.
- Bjersand, Kathrine; Seidal, Tomas; Sundström-Poromaa, Inger; Åkerud, Helena; Skirnisdottir, Ingiridur (2017): The clinical and prognostic correlation of HRNPM and SLC1A5 in pathogenesis and prognosis in epithelial ovarian cancer. In: *PloS one* 12 (6). DOI: 10.1371/journal.pone.0179363.
- Bode, W.; Turk, D.; Karshikov, A. (1992): The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 1 (4), S. 426–471. DOI: 10.1002/pro.5560010402.
- Bode, Wolfram (2006): Structure and interaction modes of thrombin. In: *Blood cells, molecules & diseases* 36 (2), S. 122–130. DOI: 10.1016/j.bcmd.2005.12.027.
- Bodmer, S.; Strommer, K.; Frei, K.; Siepl, C.; Tribolet, N. de; Heid, I.; Fontana, A. (1989): Immunosuppression and transforming growth factor-beta in glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-beta 2. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 143 (10), S. 3222–3229.
- Boeckx, Carolien; Beeck, Ken op de; an Wouters; Deschoolmeester, Vanessa; Limame, Ridha; Zwaenepoel, Karen et al. (2014): Overcoming cetuximab resistance in HNSCC: the role of AURKB and DUSP proteins. In: *Cancer letters* 354 (2), S. 365–377. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.08.039.
- Bonuccelli, Gloria; Tsigos, Aristotelis; Whitaker-Menezes, Diana; Pavlides, Stephanos; Pestell, Richard G.; Chiavarina, Barbara et al. (2010): Ketones and lactate "fuel" tumor growth and metastasis: Evidence that epithelial cancer cells use oxidative mitochondrial metabolism. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (17), S. 3506–3514. DOI: 10.4161/cc.9.17.12731.
- Boopathy, Gandhi T. K.; Hong, Wanjin (2019): Role of Hippo Pathway-YAP/TAZ Signaling in Angiogenesis. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 7. DOI: 10.3389/fcell.2019.00049.
- Borissoff, Julian Ilcheff; Spronk, Henri M. H.; Heeneman, Sylvia; Cate, Hugo ten (2009): Is thrombin a key player in the 'coagulation-atherogenesis' maze? In: *Cardiovascular research* 82 (3), S. 392–403. DOI: 10.1093/cvr/cvp066.

- Bouma, B. N.; Borne, P. A. von dem; Meijers, J. C. (1998): Factor XI and protection of the fibrin clot against lysis--a role for the intrinsic pathway of coagulation in fibrinolysis. In: *Thrombosis and haemostasis* 80 (1), S. 24–27.
- Brem, S.; Brem, H.; Folkman, J.; Finkelstein, D.; Patz, A. (1976): Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. In: *Cancer research* 36 (8), S. 2807–2812.
- Brooks, P. C.; Silletti, S.; Schalscha, T. L. von; Friedlander, M.; Cheresh, D. A. (1998): Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. In: *Cell* 92 (3), S. 391–400. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80931-9.
- Brown, L. F.; Detmar, M.; Claffey, K.; Nagy, J. A.; Feng, D.; Dvorak, A. M.; Dvorak, H. F. (1997): Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. In: *EXS* 79, S. 233–269. DOI: 10.1007/978-3-0348-9006-9\_10.
- Cai, Hao; Saiyin, Hexige; Liu, Xing; Han, Dingding; Ji, Guoqing; Qin, Bo et al. (2018): Nogo-B promotes tumor angiogenesis and provides a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. In: *Molecular oncology* 12 (12), S. 2042–2054. DOI: 10.1002/1878-0261.12358.
- Cain, D.; Hutson, S. M.; Wallin, R. (1997): Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (46), S. 29068–29075. DOI: 10.1074/jbc.272.46.29068.
- Carmeliet, P.; Ferreira, V.; Breier, G.; Pollefeyt, S.; Kieckens, L.; Gertsenstein, M. et al. (1996): Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. In: *Nature* 380 (6573), S. 435–439. DOI: 10.1038/380435a0.
- Chan, Barden; Merchan, Jaime R.; Kale, Sujata; Sukhatme, Vikas P. (2003): Antiangiogenic property of human thrombin. In: *Microvascular Research* 66 (1), S. 1–14. DOI: 10.1016/S0026-2862(03)00037-2.
- Chang, Jenny Zwei-Chieng; Hsieh, Yu-Ping; Lin, Wen-Hsin; Chen, Hsin-Ming; Kuo, Mark Yen-Ping (2017): Activation of transforming growth factor- $\beta$ 1 by thrombin via integrins  $\alpha\beta$ 1,  $\alpha\beta$ 3, and  $\alpha\beta$ 5 in buccal fibroblasts: Suppression by epigallocatechin-3-gallate. In: *Head & neck* 39 (7), S. 1436–1445. DOI: 10.1002/hed.24791.
- Chen, Cheng; Cai, Shaoxin; Wang, Guihua; Cao, Xiaonian; Yang, Xi; Luo, Xuelai et al. (2013): c-Myc enhances colon cancer cell-mediated angiogenesis through the regulation of HIF-1 $\alpha$ . In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 430 (2), S. 505–511. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.006.
- Chen, Sidi; Xue, Yuan; Wu, Xuebing; Le, Cong; Bhutkar, Arjun; Bell, Eric L. et al. (2014): Global microRNA depletion suppresses tumor angiogenesis. In: *Genes & development* 28 (10), S. 1054–1067. DOI: 10.1101/gad.239681.114.
- Chung, Namhyun; Jee, Bo Keun; Chae, Song Wha; Jeon, Yang-Whan; Lee, Kweon Haeng; Rha, Hyoung Kyun (2009): HOX gene analysis of endothelial cell differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In: *Molecular biology reports* 36 (2), S. 227–235. DOI: 10.1007/s11033-007-9171-6.
- Cohen, Jonathan (2002): The immunopathogenesis of sepsis. In: *Nature* 420 (6917), S. 885–891. DOI: 10.1038/nature01326.

- Colotta, F.; Sciacca, F. L.; Sironi, M.; Luini, W.; Rabiet, M. J.; Mantovani, A. (1994): Expression of monocyte chemotactic protein-1 by monocytes and endothelial cells exposed to thrombin. In: *The American Journal of Pathology* 144 (5), S. 975–985.
- Coughlin, S. R. (2000): Thrombin signalling and protease-activated receptors. In: *Nature* 407 (6801), S. 258–264. DOI: 10.1038/35025229.
- Cox, Christopher M.; Poole, Thomas J. (2000): Angioblast differentiation is influenced by the local environment: FGF-2 induces angioblasts and patterns vessel formation in the quail embryo. In: *Dev. Dyn.* 218 (2), S. 371–382. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(200006)218:2<371::AID-DVDY10>3.0.CO;2-Z.
- Cramer, Thomas J.; Griffin, John H.; Gale, Andrew J. (2010): Factor V is an anticoagulant cofactor for activated protein C during inactivation of factor Va. In: *Pathophysiology of haemostasis and thrombosis* 37 (1), S. 17–23. DOI: 10.1159/000315141.
- Cristofaro, Raimondo de; Akhavan, Sepideh; Altomare, Cosimo; Carotti, Andrea; Peyvandi, Flora; Mannucci, Pier Mannuccio (2004): A natural prothrombin mutant reveals an unexpected influence of A-chain structure on the activity of human alpha-thrombin. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (13), S. 13035–13043. DOI: 10.1074/jbc.M312430200.
- Dahlbäck, Björn (2000): Blood coagulation. In: *Lancet (London, England)* 355 (9215), S. 1627–1632. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)02225-X.
- Dang, Yunzhi; Yu, Jiao; Zhao, Shuhong; Cao, Ximing; Wang, Qing (2021): HOXA7 Promotes Metastasis in KRAS Mutant Colorectal Cancer by Regulating Myeloid-derived Suppressor Cells.
- Daniel, T. O.; Gibbs, V. C.; Milfay, D. F.; Garovoy, M. R.; Williams, L. T. (1986): Thrombin stimulates c-sis gene expression in microvascular endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (21), S. 9579–9582.
- Dardik, R.; Savion, N.; Kaufmann, Y.; Varon, D. (1998): Thrombin promotes platelet-mediated melanoma cell adhesion to endothelial cells under flow conditions: role of platelet glycoproteins P-selectin and GPIIb-IIIa. In: *British journal of cancer* 77 (12), S. 2069–2075. DOI: 10.1038/bjc.1998.349.
- Das, Lakshmi Prabha; Pitty, Raghuram Hari; Asokan, Kannan; C L, Krithika; M S, Anandi; Ramanathan, Arvind (2017): Analysis of ARID2 Gene Mutation in Oral Squamous Cell Carcinoma. In: *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 18 (10), S. 2679–2681. DOI: 10.22034/APJCP.2017.18.10.2679.
- Dasgupta, Swapan Kumar; Thiagarajan, Perumal (2007): Inhibition of thrombin activity by prothrombin activation fragment 1.2. In: *Journal of thrombosis and thrombolysis* 24 (2), S. 157–162. DOI: 10.1007/s11239-007-0018-8.
- Davie, Earl W.; Kulman, John D. (2006): An overview of the structure and function of thrombin. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 32 Suppl 1, S. 3–15. DOI: 10.1055/s-2006-939550.
- Del Rosso, Mario; Fibbi, Gabriella; Pucci, Marco; D'Alessio, Silvia; Del Rosso, Angela; Magnelli, Lucia; Chiarugi, Vincenzo (2002): Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. In: *Clinical & experimental metastasis* 19 (3), S. 193–207. DOI: 10.1023/a:1015531321445.

- Di Cera, Enrico (2003): Thrombin interactions. In: *Chest* 124 (3 Suppl), 11S-7S. DOI: 10.1378/chest.124.3\_suppl.11s.
- Di Cera, Enrico (2008): Thrombin. In: *Molecular aspects of medicine* 29 (4), S. 203–254. DOI: 10.1016/j.mam.2008.01.001.
- Di Cera, Enrico; Page, Michael J.; Bah, Alajji; Bush-Pelc, Leslie A.; Garvey, Laura C. (2007): Thrombin allosterity. In: *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 9 (11), S. 1291–1306. DOI: 10.1039/b616819a.
- Di Chen; Teng, Joyce M.; North, Paula E.; Lapinski, Philip E.; King, Philip D. (2019): RASA1-dependent cellular export of collagen IV controls blood and lymphatic vascular development. In: *The Journal of clinical investigation* 129 (9), S. 3545–3561. DOI: 10.1172/JCI124917.
- DiBella, E. E.; Maurer, M. C.; Scheraga, H. A. (1995): Expression and folding of recombinant bovine prothrombin-2 and its activation to thrombin. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (1), S. 163–169. DOI: 10.1074/jbc.270.1.163.
- Dihanich, Melitta; Kaser, Matthew; Reinhard, Eva; Cunningham, Dennis; Monard, Denis (1991): Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. In: *Neuron* 6 (4), S. 575–581. DOI: 10.1016/0896-6273(91)90060-D.
- Dimitropoulou, C.; Malkusch, W.; Fait, E.; Maragoudakis, M. E.; Konerding, M. A. (1998): The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. In: *Angiogenesis* 2 (3), S. 255–263. DOI: 10.1023/A:1009210918738.
- Donisi, Domenico; Asquini, Rita; d'Alessandro, Antonio; Assanto, Gaetano (2009): Distributed feedback grating in liquid crystal waveguide: a novel approach. In: *Optics express* 17 (7), S. 5251–5256. DOI: 177420.
- Ebinger, Martin; Senf, Leonore; Wachowski, Olga; Scheurlen, Wolfram (2004): Promoter methylation pattern of caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-cadherin in medulloblastoma. In: *Pathology oncology research : POR* 10 (1), S. 17–21. DOI: 10.1007/BF02893403.
- Ehata, Shogo; Yokoyama, Yuichiro; Takahashi, Kei; Miyazono, Kohei (2013): Bi-directional roles of bone morphogenetic proteins in cancer: another molecular Jekyll and Hyde? In: *Pathology international* 63 (6), S. 287–296. DOI: 10.1111/pin.12067.
- Ehrhardt, Annette; Ehrhardt, Götz R. A.; Guo, Xuecui; Schrader, John W. (2002): Ras and relatives--job sharing and networking keep an old family together. In: *Experimental hematology* 30 (10), S. 1089–1106. DOI: 10.1016/s0301-472x(02)00904-9.
- Ehsan, Naureen; Murad, Sheeba; Ashiq, Tamour; Mansoor, Muhammad Uzair; Gul, Summer; Khalid, Samra; Younas, Muhammad (2013): Significant correlation of TLR4 expression with the clinicopathological features of invasive ductal carcinoma of the breast. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 34 (2), S. 1053–1059. DOI: 10.1007/s13277-013-0645-y.
- Eppert, Kolja; Scherer, Stephen W.; Ozcelik, Hilmi; Pirone, Rosa; Hoodless, Pamela; Kim, Hyeja et al. (1996): MADR2 Maps to 18q21 and Encodes a TGF $\beta$ -Regulated MAD-Related Protein That Is Functionally Mutated in Colorectal Carcinoma. In: *Cell* 86 (4), S. 543–552. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80128-2.

- Esmon, C. T.; Owen, W. G. (1981): Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (4), S. 2249–2252. DOI: 10.1073/pnas.78.4.2249.
- Esmon, C. T.; Xu, J.; Gu, J. M.; Qu, D.; Laszik, Z.; Ferrell, G. et al. (1999): Endothelial protein C receptor. In: *Thrombosis and haemostasis* 82 (2), S. 251–258.
- Esmon, Charles T. (2003): The protein C pathway. In: *Chest* 124 (3 Suppl), 26S-32S. DOI: 10.1378/chest.124.3\_suppl.26s.
- Evans, Ian M.; Britton, Gary; Zachary, Ian C. (2008): Vascular endothelial growth factor induces heat shock protein (HSP) 27 serine 82 phosphorylation and endothelial tubulogenesis via protein kinase D and independent of p38 kinase. In: *Cellular signalling* 20 (7), S. 1375–1384. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.03.002.
- Even-Ram, S.; Uziely, B.; Cohen, P.; Grisaru-Granovsky, S.; Maoz, M.; Ginzburg, Y. et al. (1998): Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. In: *Nature medicine* 4 (8), S. 909–914. DOI: 10.1038/nm0898-909.
- Even-Ram, S. C.; Maoz, M.; Pokroy, E.; Reich, R.; Katz, B. Z.; Gutwein, P. et al. (2001): Tumor cell invasion is promoted by activation of protease activated receptor-1 in cooperation with the alpha v beta 5 integrin. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (14), S. 10952–10962. DOI: 10.1074/jbc.M007027200.
- Fasco, M. J.; Principe, L. M. (1980): Vitamin K1 hydroquinone formation catalyzed by a microsomal reductase system. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 97 (4), S. 1487–1492. DOI: 10.1016/s0006-291x(80)80033-7.
- Feigin, Irwin; Allen, Lucretia B.; Lipkin, Lewis; Gross, Sidney W. (1958): The endothelial hyperplasia of the cerebral blood vessels with brain tumors, and its sarcomatous transformation. In: *Cancer* 11 (2), S. 264–277. DOI: 10.1002/1097-0142(195803/04)11:2<264::AID-CNCR2820110207>3.0.CO;2-D.
- Feinberg, Richard N. (Hg.) (1991): The development of the vascular system ; 4 tables. Basel, München, Paris, London, New York, New Delhi, Bangkok, Singapore, Tokyo, Sydney: Karger (Issues in biomedicine, 14).
- Ferrara, N.; Carver-Moore, K.; Chen, H.; Dowd, M.; Lu, L.; O'Shea, K. S. et al. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. In: *Nature* 380 (6573), S. 439–442. DOI: 10.1038/380439a0.
- Fish, Jason E.; Santoro, Massimo M.; Morton, Sarah U.; Yu, Sangho; Yeh, Ru-Fang; Wythe, Joshua D. et al. (2008): miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. In: *Developmental cell* 15 (2), S. 272–284. DOI: 10.1016/j.devcel.2008.07.008.
- Flamme, Ingo; Frölich, Thomas; Risau, Werner (1997): Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. In: *J. Cell. Physiol.* 173 (2), S. 206–210. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199711)173:2<206::AID-JCP22>3.0.CO;2-C.
- Folkman, J. (1971): Tumor angiogenesis: therapeutic implications. In: *The New England journal of medicine* 285 (21), S. 1182–1186. DOI: 10.1056/NEJM197111182852108.
- Folkman, J.; Haudenschild, C. (1980): Angiogenesis in vitro. In: *Nature* 288 (5791), S. 551–556. DOI: 10.1038/288551a0.

- Folkman, Judah (1985): Tumor Angiogenesis. In: George Klein und Sidney Wienhouse (Hg.): *Advances in cancer research*, Bd. 43. Burlington: Elsevier (*Advances in Cancer Research*, v.43), S. 175–203.
- Folkman, Judah; Long, David M.; Becker, Frederick F. (1963): Growth and metastasis of tumor in organ culture. In: *Cancer* 16 (4), S. 453–467. DOI: 10.1002/1097-0142(196304)16:4<453::AID-CNCR2820160407>3.0.CO;2-Y.
- Foster, D. C.; Rudinski, M. S.; Schach, B. G.; Berkner, K. L.; Kumar, A. A.; Hagen, F. S. et al. (1987): Propeptide of human protein C is necessary for gamma-carboxylation. In: *Biochemistry* 26 (22), S. 7003–7011. DOI: 10.1021/bi00396a022.
- Fredericks, William J.; Yin, Hankun; Lal, Priti; Puthiyaveetil, Raghunath; Malkowicz, Stephen B.; Fredericks, Nathaniel J. et al. (2013): Ectopic expression of the TERE1 (UBIAD1) protein inhibits growth of renal clear cell carcinoma cells: altered metabolic phenotype associated with reactive oxygen species, nitric oxide and SXR target genes involved in cholesterol and lipid metabolism. In: *International journal of oncology* 43 (2), S. 638–652. DOI: 10.3892/ijo.2013.1985.
- Friesel, R. E.; Maciag, T. (1995): Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (10), S. 919–925. DOI: 10.1096/fasebj.9.10.7542215.
- Friess, Helmut; Yamanaka, Yoichiro; Büchler, Markus; Ebert, Matthias; Beger, Hans G.; Gold, Leslie I.; Korc, Murray (1993): Enhanced expression of transforming growth factor  $\beta$  isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. In: *Gastroenterology* 105 (6), S. 1846–1856. DOI: 10.1016/0016-5085(93)91084-U.
- Fu, Jianxin; Gerhardt, Holger; McDaniel, J. Michael; Xia, Baoyun; Liu, Xiaowei; Ivanciu, Lacramioara et al. (2008): Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (11), S. 3725–3737. DOI: 10.1172/JCI36077.
- Fulcher, C. A.; Gardiner, J. E.; Griffin, J. H.; Zimmerman, T. S. (1984): Proteolytic inactivation of human factor VIII procoagulant protein by activated human protein C and its analogy with factor V. In: *Blood* 63 (2), S. 486–489.
- Gailani, D.; Broze, G. J. (1991): Factor XI activation in a revised model of blood coagulation. In: *Science (New York, N.Y.)* 253 (5022), S. 909–912. DOI: 10.1126/science.1652157.
- Gale, Andrew J. (2011): Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. In: *Toxicologic pathology* 39 (1), S. 273–280. DOI: 10.1177/0192623310389474.
- Gao, Baobing; Deng, Jing; Zhang, Xiaogang; Sun, Houchao; Jia, Gongwei; Li, Jiani et al. (2020): Effects of mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor on cerebral angiogenesis in a rat model of cerebral ischemia. In: *Neuroscience letters* 715, S. 134657. DOI: 10.1016/j.neulet.2019.134657.
- García Muro, Andrea Marlene; García Ruvalcaba, Azaria; La Rizo de Torre, Lourdes Del Carmen; Sánchez López, Josefina Yoaly (2021): Role of the BMP6 protein in breast cancer and other types of cancer. In: *Growth factors (Chur, Switzerland)* 39 (1-6), S. 1–13. DOI: 10.1080/08977194.2021.1994964.

- Gately, Stephen; Li, William W. (2004): Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. In: *Seminars in oncology* 31 (2 Suppl 7), S. 2–11. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2004.03.040.
- Germann, S.; Gratadou, L.; Zonta, E.; Dardenne, E.; Gaudineau, B.; Fougère, M. et al. (2012): Dual role of the ddx5/ddx17 RNA helicases in the control of the pro-migratory NFAT5 transcription factor. In: *Oncogene* 31 (42), S. 4536–4549. DOI: 10.1038/onc.2011.618.
- Gettins, Peter G. W. (2002): Serpin structure, mechanism, and function. In: *Chemical reviews* 102 (12), S. 4751–4804. DOI: 10.1021/cr010170.
- Giancotti, F. G.; Ruoslahti, E. (1999): Integrin signaling. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5430), S. 1028–1032. DOI: 10.1126/science.285.5430.1028.
- Gimbrone, M. A.; Aster, R. H.; Cotran, R. S.; Corkery, J.; Jandl, J. H.; Folkman, J. (1969): Preservation of vascular integrity in organs perfused in vitro with a platelet-rich medium. In: *Nature* 222 (5188), S. 33–36. DOI: 10.1038/222033a0.
- Godefroy, Emmanuelle; Manches, Olivier; Dréno, Brigitte; Hochman, Tsvia; Rolnitzky, Linda; Labarrière, Nathalie et al. (2011): Matrix metalloproteinase-2 conditions human dendritic cells to prime inflammatory T(H)2 cells via an IL-12- and OX40L-dependent pathway. In: *Cancer cell* 19 (3), S. 333–346. DOI: 10.1016/j.ccr.2011.01.037.
- Goodall, C. M.; Feldman, R.; Sanders, A. G.; Shubik, P. (1965): Vascular patterns of four transplantable tumors in the hamster (*Mesocricetus auratus*). In: *Angiology* 16 (10), S. 622–625. DOI: 10.1177/000331976501601008.
- Goumans, Marie José; Valdimarsdottir, Gudrun; Itoh, Susumu; Lebrin, Franck; Larsson, Jonas; Mummery, Christine et al. (2003): Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. In: *Molecular cell* 12 (4), S. 817–828. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00386-1.
- Goumans, Marie-José; Valdimarsdottir, Gudrun; Itoh, Susumu; Rosendahl, Alexander; Sideras, Paschalis; Dijke, Peter ten (2002): Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. In: *The EMBO journal* 21 (7), S. 1743–1753. DOI: 10.1093/emboj/21.7.1743.
- Griffin, J. H. (1995): Blood coagulation. The thrombin paradox. In: *Nature* 378 (6555), S. 337–338. DOI: 10.1038/378337a0.
- Grotzer, M. A.; Eggert, A.; Zuzak, T. J.; Janss, A. J.; Marwaha, S.; Wiewrodt, B. R. et al. (2000): Resistance to TRAIL-induced apoptosis in primitive neuroectodermal brain tumor cells correlates with a loss of caspase-8 expression. In: *Oncogene* 19 (40), S. 4604–4610. DOI: 10.1038/sj.onc.1203816.
- Guan, Yonghui; Guan, Xiaoyue; An, Hengqing; Baihetiya, Azhati; Wang, Wenguang; Shao, Weimin et al. (2019): Epigenetic silencing of miR-137 induces resistance to bicalutamide by targeting TRIM24 in prostate cancer cells. In: *American journal of translational research* 11 (5), S. 3226–3237.
- Guinto, E. R.; Esmon, C. T. (1984): Loss of prothrombin and of factor Xa-factor Va interactions upon inactivation of factor Va by activated protein C. In: *The Journal of biological chemistry* 259 (22), S. 13986–13992.

- Hageman, Thomas C.; Endres, Gerard F.; Scheraga, Harold A. (1975): Mechanism of action of thrombin on fibrinogen on the role of the a chain of bovine thrombin in specificity and in differentiating between thrombin and trypsin. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 171 (1), S. 327–336. DOI: 10.1016/0003-9861(75)90039-9.
- Hanahan, Douglas; Folkman, Judah (1996): Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. In: *Cell* 86 (3), S. 353–364. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- Hanasaki, Kohji; Arita, Hitoshi (1988): Characterization of thromboxane A<sub>2</sub>/ prostaglandin H<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub>) receptors of rat platelets and their interaction with TXA<sub>2</sub>/PGH<sub>2</sub> receptor antagonists. In: *Biochemical pharmacology* 37 (20), S. 3923–3929. DOI: 10.1016/0006-2952(88)90075-5.
- Hanna, Jason A.; Drummond, Catherine J.; Garcia, Matthew R.; Go, Jonathan C.; Finkelstein, David; Rehg, Jerold E.; Hatley, Mark E. (2017): Biallelic Dicer1 loss mediated by aP2-Cre drives angiosarcoma. In: *Cancer research* 77 (22), S. 6109–6118. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1262.
- Hansson, K.; Stenflo, J. (2005): Post-translational modifications in proteins involved in blood coagulation. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3 (12), S. 2633–2648. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01478.x.
- Haralabopoulos, G. C.; Grant, D. S.; Kleinman, H. K.; Maragoudakis, M. E. (1997): Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. In: *The American journal of physiology* 273 (1 Pt 1), C239-45. DOI: 10.1152/ajpcell.1997.273.1.C239.
- Haskell, Henry; Natarajan, Meera; Hecker, Timothy P.; Ding, Qiang; Stewart, Jerry; Grammer, J. Robert; Gladson, Candace L. (2003): Focal adhesion kinase is expressed in the angiogenic blood vessels of malignant astrocytic tumors in vivo and promotes capillary tube formation of brain microvascular endothelial cells. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9 (6), S. 2157–2165.
- Hattori, R.; Hamilton, K. K.; Fugate, R. D.; McEver, R. P.; Sims, P. J. (1989): Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (14), S. 7768–7771.
- He, Jingyi; Li, Guangbing; Liu, Xihan; Ma, Liye; Zhang, Peng; Zhang, Jiayao et al. (2020): Diagnostic and Prognostic Values of MANF Expression in Hepatocellular Carcinoma. In: *BioMed research international* 2020, S. 1936385. DOI: 10.1155/2020/1936385.
- He, Lingjuan; Tian, Xueying; Zhang, Hui; Hu, Tianyuan; Huang, Xiuzhen; Zhang, Libo et al. (2014): BAF200 is required for heart morphogenesis and coronary artery development. In: *PloS one* 9 (10), e109493. DOI: 10.1371/journal.pone.0109493.
- Hematology. Basic Principles and Practice (1995).
- Hillen, H. F. (2000): Thrombosis in cancer patients. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 11 Suppl 3, S. 273–276. DOI: 10.1093/annonc/11.suppl\_3.273.

- Hodis, Eran; Watson, Ian R.; Kryukov, Gregory V.; Arold, Stefan T.; Imielinski, Marcin; Theurillat, Jean-Philippe et al. (2012): A landscape of driver mutations in melanoma. In: *Cell* 150 (2), S. 251–263. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.024.
- Holmgren, L.; O'Reilly, M. S.; Folkman, J. (1995): Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. In: *Nature medicine* 1 (2), S. 149–153. DOI: 10.1038/nm0295-149.
- Hoogeboom, Diana; Essers, Marieke A. G.; Polderman, Paulien E.; Voets, Erik; Smits, Lydia M. M.; Burgering, Boudewijn M. Th (2008): Interaction of FOXO with beta-catenin inhibits beta-catenin/T cell factor activity. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (14), S. 9224–9230. DOI: 10.1074/jbc.M706638200.
- Hopkins-Donaldson, S.; Bodmer, J. L.; Bours, K. B.; Brognara, C. B.; Tschopp, J.; Gross, N. (2000): Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. In: *Cancer research* 60 (16), S. 4315–4319.
- Huang, Qiaojia; Lan, Fenghua; Wang, Xiaoting; Yu, Yinghao; Ouyang, Xuenong; Zheng, Feng et al. (2014): IL-1 $\beta$ -induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9. In: *Molecular cancer* 13, S. 18. DOI: 10.1186/1476-4598-13-18.
- Huang, Qiaojia; Ye, Jianxin; Huang, Qingling; Chen, Wannan; Wang, Lin; Lin, Wansong et al. (2010): Heat shock protein 27 is over-expressed in tumor tissues and increased in sera of patients with gastric adenocarcinoma. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 48 (2), S. 263–269. DOI: 10.1515/CCLM.2010.043.
- Huo, Jun-Feng; Chen, Xiao-Bing (2019): P2X4R silence suppresses glioma cell growth through BDNF/TrkB/ATF4 signaling pathway. In: *Journal of cellular biochemistry* 120 (4), S. 6322–6329. DOI: 10.1002/jcb.27919.
- Ishihara, H.; Connolly, A. J.; Zeng, D.; Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Timmons, C. et al. (1997): Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. In: *Nature* 386 (6624), S. 502–506. DOI: 10.1038/386502a0.
- Itoh, T.; Tanioka, M.; Yoshida, H.; Yoshioka, T.; Nishimoto, H.; Itohara, S. (1998): Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. In: *Cancer research* 58 (5), S. 1048–1051.
- Jachimczak, P.; Bogdahn, U.; Schneider, J.; Behl, C.; Meixensberger, J.; Apfel, R. et al. (1993): The effect of transforming growth factor-beta 2-specific phosphorothioate-anti-sense oligodeoxynucleotides in reversing cellular immunosuppression in malignant glioma. In: *Journal of neurosurgery* 78 (6), S. 944–951. DOI: 10.3171/jns.1993.78.6.0944.
- Jachimczak, P.; Hessdörfer, B.; Fabel-Schulte, K.; Wismeth, C.; Brysch, W.; Schlingensiefen, K. H. et al. (1996): Transforming growth factor-beta-mediated autocrine growth regulation of gliomas as detected with phosphorothioate antisense oligonucleotides. In: *International journal of cancer* 65 (3), S. 332–337. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19960126)65:3<332::AID-IJC10>3.0.CO;2-C.
- Jennings, M. T.; Pietsenpol, J. A. (1998): The role of transforming growth factor beta in glioma progression. In: *Journal of neuro-oncology* 36 (2), S. 123–140. DOI: 10.1023/a:1005863419880.

- Jeong, Ji-Hak; Ojha, Uttam; Lee, You Mie (2021): Pathological angiogenesis and inflammation in tissues. In: *Archives of pharmacal research* 44 (1), S. 1–15. DOI: 10.1007/s12272-020-01287-2.
- Ji, Jian-Song; Xu, Min; Song, Jing-Jing; Zhao, Zhong-Wei; Chen, Min-Jiang; Chen, Wei-Qian et al. (2016): Inhibition of microRNA-126 promotes the expression of Spred1 to inhibit angiogenesis in hepatocellular carcinoma after transcatheter arterial chemoembolization: in vivo study. In: *OncoTargets and therapy* 9, S. 4357–4367. DOI: 10.2147/OTT.S106513.
- Johannsson, Sven; Neumann, Piotr; Ficner, Ralf (2018): Crystal Structure of the Human tRNA Guanine Transglycosylase Catalytic Subunit QTRT1. In: *Biomolecules* 8 (3). DOI: 10.3390/biom8030081.
- Joyce, Johanna A.; Pollard, Jeffrey W. (2009): Microenvironmental regulation of metastasis. In: *Nature reviews. Cancer* 9 (4), S. 239–252. DOI: 10.1038/nrc2618.
- Kahlina, Kornelija; Goren, Itamar; Pfeilschifter, Josef; Frank, Stefan (2004): p68 DEAD box RNA helicase expression in keratinocytes. Regulation, nucleolar localization, and functional connection to proliferation and vascular endothelial growth factor gene expression. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (43), S. 44872–44882. DOI: 10.1074/jbc.M402467200.
- Kahn, M. L.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Bigornia, V.; Zeng, D.; Moff, S. et al. (1998): A dual thrombin receptor system for platelet activation. In: *Nature* 394 (6694), S. 690–694. DOI: 10.1038/29325.
- Kanagawa, Motoi; Kobayashi, Kazuhiro; Tajiri, Michiko; Manya, Hiroshi; Kuga, Atsushi; Yamaguchi, Yoshiki et al. (2016): Identification of a Post-translational Modification with Ribitol-Phosphate and Its Defect in Muscular Dystrophy. In: *Cell reports* 14 (9), S. 2209–2223. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.02.017.
- Kandasamy, Gayathri; Danilovtseva, Elena N.; Annenkov, Vadim V.; Krishnan, Uma Maheswari (2020): Poly(1-vinylimidazole) polyplexes as novel therapeutic gene carriers for lung cancer therapy. In: *Beilstein journal of nanotechnology* 11, S. 354–369. DOI: 10.3762/bjnano.11.26.
- Katagiri, Takenobu; Watabe, Tetsuro (2016): Bone Morphogenetic Proteins. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (6). DOI: 10.1101/cshperspect.a021899.
- Kato, Yasumasa; Lambert, Charles A.; Colige, Alain C.; Mineur, Pierre; Noël, Agnès; Frankenne, Francis et al. (2005): Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (12), S. 10938–10944. DOI: 10.1074/jbc.M411313200.
- Kehrel, B.; Wierwille, S.; Clemetson, K. J.; Anders, O.; Steiner, M.; Knight, C. G. et al. (1998): Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. In: *Blood* 91 (2), S. 491–499.
- Keith, Brian; Johnson, Randall S.; Simon, M. Celeste (2011): HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. In: *Nature reviews. Cancer* 12 (1), S. 9–22. DOI: 10.1038/nrc3183.

- Kekow, J.; Wiedemann, G. (1995): Transforming growth-factor-Beta - a cytokine with multiple actions in oncology and potential clinical-applications (review). In: *International journal of oncology* 7 (1), S. 177–182. DOI: 10.3892/ijo.7.1.177.
- Kessenbrock, Kai; Plaks, Vicki; Werb, Zena (2010): Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. In: *Cell* 141 (1), S. 52–67. DOI: 10.1016/j.cell.2010.03.015.
- Kim, I. Y.; Ahn, H. J.; Lang, S.; Oefelein, M. G.; Oyasu, R.; Kozlowski, J. M.; Lee, C. (1998): Loss of expression of transforming growth factor-beta receptors is associated with poor prognosis in prostate cancer patients. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 4 (7), S. 1625–1630.
- Kim, Tae Hyong; Ahn, Sookyung; Kim, Jaebeum; Kim, Ilhan; Yang, Mei Zi; Lee, Jong Eun; Kim, Soung Soo (2006): Recombinant human prothrombin kringle-2 inhibits B16F10 melanoma metastasis through inhibition of neovascularization and reduction of matrix metalloproteinase expression. In: *Clinical & experimental metastasis* 23 (7-8), S. 391–399. DOI: 10.1007/s10585-006-9048-4.
- Kim, Tae Hyong; Oh, Seunghyun; Kim, Soung Soo (2005): Recombinant human prothrombin kringle-2 induces bovine capillary endothelial cell cycle arrest at G0-G1 phase through inhibition of cyclin D1/CDK4 complex: modulation of reactive oxygen species generation and up-regulation of cyclin-dependent kinase inhibitors. In: *Angiogenesis* 8 (4), S. 307–314. DOI: 10.1007/s10456-005-9020-y.
- Kingsbury, Tami J.; Kim, Minjung; Civin, Curt I. (2019): Regulation of cancer stem cell properties by SIX1, a member of the PAX-SIX-EYA-DACH network. In: *Advances in cancer research* 141, S. 1–42. DOI: 10.1016/bs.acr.2018.12.001.
- Kirchhofer, Daniel; Nemerson, Yale (1996): Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. In: *Current opinion in biotechnology* 7 (4), S. 386–391. DOI: 10.1016/s0958-1669(96)80112-1.
- Kjellman, C.; Olofsson, S. P.; Hansson, O.; Schantz, T. von; Lindvall, M.; Nilsson, I. et al. (2000): Expression of TGF-beta isoforms, TGF-beta receptors, and SMAD molecules at different stages of human glioma. In: *International journal of cancer* 89 (3), S. 251–258. DOI: 10.1002/1097-0215(20000520)89:3<251::aid-ijc7>3.0.co;2-5.
- Klepfish, A.; Greco, M. A.; Karpatkin, S. (1993): Thrombin stimulates melanoma tumor-cell binding to endothelial cells and subendothelial matrix. In: *International journal of cancer* 53 (6), S. 978–982. DOI: 10.1002/ijc.2910530620.
- Komatsu, Masanobu; Ruoslahti, Erkki (2005): R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. In: *Nature medicine* 11 (12), S. 1346–1350. DOI: 10.1038/nm1324.
- Korc, M.; Friesel, R. E. (2009): The role of fibroblast growth factors in tumor growth. In: *Current cancer drug targets* 9 (5), S. 639–651. DOI: 10.2174/156800909789057006.
- Kortlever, Roderik M.; Sodik, Nicole M.; Wilson, Catherine H.; Burkhart, Deborah L.; Pellegrinet, Luca; Brown Swigart, Lamorna et al. (2017): Myc Cooperates with Ras by Programming Inflammation and Immune Suppression. In: *Cell* 171 (6), 1301-1315.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.013.

- Kovaleva, Vera; Yu, Li-Ying; Ivanova, Larisa; Shpironok, Olesya; Nam, Jinhan; Eesmaa, Ave et al. (2023): MANF regulates neuronal survival and UPR through its ER-located receptor IRE1 $\alpha$ . In: *Cell reports* 42 (2), S. 112066. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112066.
- Krasagakis, K.; Thölke, D.; Farthmann, B.; Eberle, J.; Mansmann, U.; Orfanos, C. E. (1998): Elevated plasma levels of transforming growth factor (TGF)-beta1 and TGF-beta2 in patients with disseminated malignant melanoma. In: *British journal of cancer* 77 (9), S. 1492–1494. DOI: 10.1038/bjc.1998.245.
- Krem, M. M.; Di Cera, E. (2001): Molecular markers of serine protease evolution. In: *The EMBO journal* 20 (12), S. 3036–3045. DOI: 10.1093/emboj/20.12.3036.
- Krem, Maxwell M.; Di Cera, Enrico (2002): Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. In: *Trends in biochemical sciences* 27 (2), S. 67–74. DOI: 10.1016/s0968-0004(01)02007-2.
- Kubota, Yoshiaki (2012): Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. In: *The Keio journal of medicine* 61 (2), S. 47–56. DOI: 10.2302/kjm.61.47.
- Kumar, Madhu S.; Pester, Ryan E.; Chen, Cindy Y.; Lane, Keara; Chin, Christine; Lu, Jun et al. (2009): Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. In: *Genes & development* 23 (23), S. 2700–2704. DOI: 10.1101/gad.1848209.
- Lane, David A.; Philippou, Helen; Huntington, James A. (2005): Directing thrombin. In: *Blood* 106 (8), S. 2605–2612. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1710.
- LaPelusa, Andrew; Dave, Heeransh D. (2021): StatPearls. Physiology, Hemostasis. Treasure Island (FL).
- Latham, Tom; Mackay, Logan; Sproul, Duncan; Karim, Muhammed; Culley, Jayne; Harrison, David J. et al. (2012): Lactate, a product of glycolytic metabolism, inhibits histone deacetylase activity and promotes changes in gene expression. In: *Nucleic acids research* 40 (11), S. 4794–4803. DOI: 10.1093/nar/gks066.
- Lee, Po-Chu; Chen, Syue-Ting; Kuo, Ting-Chun; Lin, Tzu-Chi; Lin, Mei-Chun; Huang, John et al. (2020): C1GALT1 is associated with poor survival and promotes soluble Ephrin A1-mediated cell migration through activation of EPHA2 in gastric cancer. In: *Oncogene* 39 (13), S. 2724–2740. DOI: 10.1038/s41388-020-1178-7.
- Lee, T. H.; Rhim, T.; Kim, S. S. (1998): Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated capillary endothelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (44), S. 28805–28812. DOI: 10.1074/jbc.273.44.28805.
- Lee, Yoon-Jin; Lee, Dae-Hoon; Cho, Chul-Koo; Bae, Sangwoo; Jhon, Gil-Ja; Lee, Su-Jae et al. (2005a): HSP25 inhibits protein kinase C delta-mediated cell death through direct interaction. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (18), S. 18108–18119. DOI: 10.1074/jbc.M501131200.
- Lee, Yoon-Jin; Lee, Dae-Hoon; Cho, Chul-Koo; Chung, Hee-Yong; Bae, Sangwoo; Jhon, Gil-Ja et al. (2005b): HSP25 inhibits radiation-induced apoptosis through reduction of PKCdelta-mediated ROS production. In: *Oncogene* 24 (23), S. 3715–3725. DOI: 10.1038/sj.onc.1208440.

Lee, Yoon-Jin; Lee, Hae-Jun; Choi, Seo-Hyun; Jin, Yeung Bae; An, Ho Jung; Kang, Jin-Hyoung et al. (2012): Soluble HSPB1 regulates VEGF-mediated angiogenesis through their direct interaction. In: *Angiogenesis* 15 (2), S. 229–242. DOI: 10.1007/s10456-012-9255-3.

Leem, Eunju; Jeong, Kyoung Hoon; Won, So-Yoon; Shin, Won-Ho; Kim, Sang Ryong (2016): Prothrombin Kringle-2: A Potential Inflammatory Pathogen in the Parkinsonian Dopaminergic System. In: *Experimental neurobiology* 25 (4), S. 147–155. DOI: 10.5607/en.2016.25.4.147.

Lefkowitz, J. B.; Haver, T.; Clarke, S.; Jacobson, L.; Weller, A.; Nuss, R. et al. (2000): The prothrombin Denver patient has two different prothrombin point mutations resulting in Glu-300--Lys and Glu-309--Lys substitutions. In: *British journal of haematology* 108 (1), S. 182–187. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.01810.x.

Li, Bo; Huang, Qilai; Wei, Gong-Hong (2019): The Role of HOX Transcription Factors in Cancer Predisposition and Progression. In: *Cancers* 11 (4). DOI: 10.3390/cancers11040528.

Li, Zijian; Feng, Min; Zhang, Jie; Wang, Xingzhou; Xu, En; Wang, Chao et al. (2021): WD40 repeat 43 mediates cell survival, proliferation, migration and invasion via vimentin in colorectal cancer. In: *Cancer cell international* 21 (1), S. 418. DOI: 10.1186/s12935-021-02109-1.

Liao, Wei-Chih; Wu, Ming-Shiang; Wang, Hsiu-Po; Tien, Yu-Wen; Lin, Jaw-Town (2009): Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. In: *Pancreas* 38 (4), S. 422–426. DOI: 10.1097/MPA.0b013e318198281d.

Lin, Yuxin; Xu, Jianxin; Lan, Huiyin (2019): Tumor-associated macrophages in tumor metastasis: biological roles and clinical therapeutic applications. In: *Journal of hematology & oncology* 12 (1), S. 76. DOI: 10.1186/s13045-019-0760-3.

Liotta, L. A.; Tryggvason, K.; Garbisa, S.; Hart, I.; Foltz, C. M.; Shafie, S. (1980): Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. In: *Nature* 284 (5751), S. 67–68. DOI: 10.1038/284067a0.

Liu, Chang; Li, Ying; Hu, Shasha; Chen, Yao; Gao, Li; Liu, Dajiang et al. (2018a): Clinical significance of matrix metalloproteinase-2 in endometrial cancer: A systematic review and meta-analysis. In: *Medicine* 97 (29), e10994. DOI: 10.1097/MD.0000000000010994.

Liu, Lin; Ye, Yu; Zhu, Xiumei (2019): MMP-9 secreted by tumor associated macrophages promoted gastric cancer metastasis through a PI3K/AKT/Snail pathway. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 117, S. 109096. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109096.

Liu, Tiejun; Sun, Huizhi; Liu, Shiqi; Yang, Zhao; Li, Linqi; Yao, Nan et al. (2018b): The suppression of DUSP5 expression correlates with paclitaxel resistance and poor prognosis in basal-like breast cancer. In: *International journal of medical sciences* 15 (7), S. 738–747. DOI: 10.7150/ijms.24981.

Liu, Ying; Zhang, Hongyue; Yan, Lixin; Du, Wei; Zhang, Min; Chen, He et al. (2018c): MMP-2 and MMP-9 contribute to the angiogenic effect produced by hypoxia/15-HETE in pulmonary endothelial cells. In: *Journal of molecular and cellular cardiology* 121, S. 36–50. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.06.006.

- Lorand, L.; Downey, J.; Gotoh, T.; Jacobsen, A.; Tokura, S. (1968): The transpeptidase system which crosslinks fibrin by  $\gamma$ -glutamyl- $\epsilon$ -lysine bonds. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31 (2), S. 222–230. DOI: 10.1016/0006-291X(68)90734-1.
- Lu, Jingjing; Liang, Xiaofang; Gao, Ying; Fu, Guili; Shen, Qin (2019): Hexokinase2 controls angiogenesis in melanoma by promoting aerobic glycolysis and activating the p38-MAPK signaling. In: *Journal of cellular biochemistry* 120 (12), S. 19721–19729. DOI: 10.1002/jcb.29278.
- Luo, Bing-Hao; Springer, Timothy A. (2006): Integrin structures and conformational signaling. In: *Current opinion in cell biology* 18 (5), S. 579–586. DOI: 10.1016/j.ceb.2006.08.005.
- Ma, L.; Hollenberg, M. D.; Wallace, J. L. (2001): Thrombin-induced platelet endostatin release is blocked by a proteinase activated receptor-4 (PAR4) antagonist. In: *British journal of pharmacology* 134 (4), S. 701–704. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704312.
- MacKeil, Jodi L.; Brzezinska, Paulina; Burke-Kleinman, Jonah; Theilmann, Anne L.; Nicol, Christopher J. B.; Ormiston, Mark L.; Maurice, Donald H. (2019): Phosphodiesterase 3B (PDE3B) antagonizes the anti-angiogenic actions of PKA in human and murine endothelial cells. In: *Cellular signalling* 62, S. 109342. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.06.007.
- MacNicol, A. D.; Nadian, A. K.; Townsend, M. G. (1984): Inhibition by warfarin of liver microsomal vitamin K-reductase in warfarin-resistant and susceptible rats. In: *Biochemical pharmacology* 33 (8), S. 1331–1336. DOI: 10.1016/0006-2952(84)90188-6.
- Manceau, Gilles; Letouzé, Eric; Guichard, Cécile; Didelot, Audrey; Cazes, Aurelie; Corté, Hélène et al. (2013): Recurrent inactivating mutations of ARID2 in non-small cell lung carcinoma. In: *International journal of cancer* 132 (9), S. 2217–2221. DOI: 10.1002/ijc.27900.
- Mann, Kenneth G. (1976): [13] Prothrombin. In: Part B: Proteolytic Enzymes, Bd. 45: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 123–156.
- Mann, Kenneth G. (2003): Thrombin formation. In: *Chest* 124 (3 Suppl), 4S-10S. DOI: 10.1378/chest.124.3\_suppl.4s.
- Maragoudakis, M. E.; Tsopanoglou, N. E.; Andriopoulou, P. (2002): Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. In: *Biochemical Society transactions* 30 (2), S. 173–177.
- Markowitz, S.; Wang, J.; Myeroff, L.; Parsons, R.; Sun, L.; Lutterbaugh, J. et al. (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5215), S. 1336–1338. DOI: 10.1126/science.7761852.
- Martinez, Ramon; Setien, Fernando; Voelter, Christiane; Casado, Sara; Quesada, Maria P.; Schackert, Gabriele; Esteller, Manel (2007): CpG island promoter hypermethylation of the pro-apoptotic gene caspase-8 is a common hallmark of relapsed glioblastoma multiforme. In: *Carcinogenesis* 28 (6), S. 1264–1268. DOI: 10.1093/carcin/bgm014.
- Martinez-Outschoorn, Ubaldo E.; Prisco, Marco; Ertel, Adam; Tsirogos, Aristotelis; Lin, Zhao; Pavlides, Stephanos et al. (2011): Ketones and lactate increase cancer cell "stemness," driving recurrence, metastasis and poor clinical outcome in breast cancer: achieving personalized medicine via Metabolo-Genomics. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (8), S. 1271–1286. DOI: 10.4161/cc.10.8.15330.

Massagué, J. (1998): TGF-beta signal transduction. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 753–791. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.753.

Massagué, Joan; Blain, Stacy W.; Lo, Roger S. (2000): TGF $\beta$  Signaling in Growth Control, Cancer, and Heritable Disorders. In: *Cell* 103 (2), S. 295–309. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00121-5.

Matsubara, Minoru; Shiraha, Hidenori; Kataoka, Jyunro; Iwamuro, Masaya; Horiguchi, Shigeru; Nishina, Shin-ichi et al. (2012): Des- $\gamma$ -carboxyl prothrombin is associated with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. In: *Journal of gastroenterology and hepatology* 27 (10), S. 1602–1608. DOI: 10.1111/j.1440-1746.2012.07173.x.

Maxwell, M.; Galanopoulos, T.; Neville-Golden, J.; Antoniades, H. N. (1992): Effect of the expression of transforming growth factor-beta 2 in primary human glioblastomas on immunosuppression and loss of immune surveillance. In: *Journal of neurosurgery* 76 (5), S. 799–804. DOI: 10.3171/jns.1992.76.5.0799.

McGarvey, T. W.; Nguyen, T.; Tomaszewski, J. E.; Monson, F. C.; Malkowicz, S. B. (2001): Isolation and characterization of the TERE1 gene, a gene down-regulated in transitional cell carcinoma of the bladder. In: *Oncogene* 20 (9), S. 1042–1051. DOI: 10.1038/sj.onc.1204143.

McGarvey, Terence W.; Nguyen, Trang; Puthiyaveettil, Raghunath; Tomaszewski, John E.; Malkowicz, S. Bruce (2003): TERE1, a novel gene affecting growth regulation in prostate carcinoma. In: *The Prostate* 54 (2), S. 144–155. DOI: 10.1002/pros.10174.

Mills, D. C. (1996): ADP receptors on platelets. In: *Thrombosis and haemostasis* 76 (6), S. 835–856.

Mizuochi, T.; Fujii, J.; Kisiel, W.; Kobata, A. (1981): Studies on the structures of the carbohydrate moiety of human prothrombin. In: *Journal of biochemistry* 90 (4), S. 1023–1031. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133554.

Möhle, R.; Green, D.; Moore, M. A.; Nachman, R. L.; Rafii, S. (1997): Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (2), S. 663–668. DOI: 10.1073/pnas.94.2.663.

Moustakas, Aristidis; Pardali, Katerina; Gaal, Annamaria; Heldin, Carl-Henrik (2002): Mechanisms of TGF- $\beta$  signaling in regulation of cell growth and differentiation. In: *Immunology Letters* 82 (1-2), S. 85–91. DOI: 10.1016/S0165-2478(02)00023-8.

Müller-Berghaus, G. (2004): Physiologie des Hämostasesystems. In: Christian Mueller-Eckhardt und Volker Kiefel (Hg.): *Transfusionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 49–78.

Mullins, Eric S.; Kombrinck, Keith W.; Talmage, Kathryn E.; Shaw, Maureen A.; Witte, David P.; Ullman, Joni M. et al. (2009): Genetic elimination of prothrombin in adult mice is not compatible with survival and results in spontaneous hemorrhagic events in both heart and brain. In: *Blood* 113 (3), S. 696–704. DOI: 10.1182/blood-2008-07-169003.

Muniz-Bongers, Luciana R.; McClain, Christopher B.; Saxena, Mansi; Bongers, Gerold; Merad, Miriam; Bhardwaj, Nina (2021): MMP2 and TLRs modulate immune responses in the tumor microenvironment. In: *JCI insight* 6 (12). DOI: 10.1172/jci.insight.144913.

- Murdoch, Craig; Muthana, Munitta; Coffelt, Seth B.; Lewis, Claire E. (2008): The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. In: *Nature reviews. Cancer* 8 (8), S. 618–631. DOI: 10.1038/nrc2444.
- Nakanishi-Matsui, M.; Zheng, Y. W.; Sulciner, D. J.; Weiss, E. J.; Ludeman, M. J.; Coughlin, S. R. (2000): PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. In: *Nature* 404 (6778), S. 609–613. DOI: 10.1038/35007085.
- Nash, G. F.; Walsh, D. C.; Kakkar, A. K. (2001): The role of the coagulation system in tumour angiogenesis. In: *The Lancet. Oncology* 2 (10), S. 608–613. DOI: 10.1016/s1470-2045(01)00518-6.
- Nelsestuen, G. L.; Zytovicz, T. H.; Howard, J. B. (1974): The mode of action of vitamin K. Identification of gamma-carboxyglutamic acid as a component of prothrombin. In: *The Journal of biological chemistry* 249 (19), S. 6347–6350.
- Nierodzik, M. L.; Kajumo, F.; Karpatkin, S. (1992): Effect of thrombin treatment of tumor cells on adhesion of tumor cells to platelets in vitro and tumor metastasis in vivo. In: *Cancer research* 52 (12), S. 3267–3272.
- Nierodzik, M. L.; Klepfish, A.; Karpatkin, S. (1995): Role of platelets, thrombin, integrin IIb-IIIa, fibronectin and von Willebrand factor on tumor adhesion in vitro and metastasis in vivo. In: *Thrombosis and haemostasis* 74 (1), S. 282–290.
- Nierodzik, Mary Lynn; Karpatkin, Simon (2006): Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. In: *Cancer cell* 10 (5), S. 355–362. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.10.002.
- Nieswandt, B.; Brakebusch, C.; Bergmeier, W.; Schulte, V.; Bouvard, D.; Mokhtari-Nejad, R. et al. (2001): Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. In: *The EMBO journal* 20 (9), S. 2120–2130. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2120.
- Nilsson, B.; Horne, M. K.; Gralnick, H. R. (1983): The carbohydrate of human thrombin: structural analysis of glycoprotein oligosaccharides by mass spectrometry. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 224 (1), S. 127–133. DOI: 10.1016/0003-9861(83)90196-0.
- Nyamao, Rose Magoma; Wu, Jing; Yu, Li; Xiao, Xiao; Zhang, Feng-Min (2019): Roles of DDX5 in the tumorigenesis, proliferation, differentiation, metastasis and pathway regulation of human malignancies. In: *Biochimica et biophysica acta. Reviews on cancer* 1871 (1), S. 85–98. DOI: 10.1016/j.bbcan.2018.11.003.
- Ogbodo, Emmanuel; Michelangeli, Francesco; Williams, John H. H. (2023): Exogenous heat shock proteins HSPA1A and HSPB1 regulate TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10 secretion from monocytic cells. In: *FEBS open bio* 13 (10), S. 1922–1940. DOI: 10.1002/2211-5463.13695.
- Olson, S. (2002): Heparin Activates Antithrombin Anticoagulant Function by Generating New Interaction Sites (Exosites) for Blood Clotting Proteinases. In: *Trends in Cardiovascular Medicine* 12 (8), S. 331–338. DOI: 10.1016/S1050-1738(02)00183-4.
- O'Reilly, M. S.; Boehm, T.; Shing, Y.; Fukai, N.; Vasios, G.; Lane, W. S. et al. (1997): Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. In: *Cell* 88 (2), S. 277–285. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81848-6.

- Page, M. J.; Di Cera, E. (2008): Serine peptidases: classification, structure and function. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65 (7-8), S. 1220–1236. DOI: 10.1007/s00018-008-7565-9.
- Palinski, Wulf; Monti, Maria; Camerlingo, Rosa; Iacobucci, Ilaria; Bocella, Serena; Pinto, Federica et al. (2021): Lysosome purinergic receptor P2X4 regulates neoangiogenesis induced by microvesicles from sarcoma patients. In: *Cell death & disease* 12 (9), S. 797. DOI: 10.1038/s41419-021-04069-w.
- Pan, Z-X; Zhang, X-Y; Chen, S-R; Li, C-Z (2019): Upregulated exosomal miR-221/222 promotes cervical cancer via repressing methyl-CpG-binding domain protein 2. In: *European review for medical and pharmacological sciences* 23 (9), S. 3645–3653. DOI: 10.26355/eurev\_201905\_17788.
- Pardanaud, L.; Luton, D.; Prigent, M.; Bourcheix, L. M.; Catala, M.; Dieterlen-Lievre, F. (1996): Two distinct endothelial lineages in ontogeny, one of them related to hemopoiesis. In: *Development (Cambridge, England)* 122 (5), S. 1363–1371.
- Pardanaud, L.; Yassine, F.; Dieterlen-Lievre, F. (1989): Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. In: *Development (Cambridge, England)* 105 (3), S. 473–485.
- Pasche, B. (2001): Role of transforming growth factor beta in cancer. In: *Journal of cellular physiology* 186 (2), S. 153–168. DOI: 10.1002/1097-4652(200002)186:2<153::AID-JCP1016>3.0.CO;2-J.
- Pathak, Gopal P.; Shah, Rashmi; Kennedy, Barry E.; Murphy, J. Patrick; Clements, Derek; Konda, Prathyusha et al. (2018): RTN4 Knockdown Dysregulates the AKT Pathway, Destabilizes the Cytoskeleton, and Enhances Paclitaxel-Induced Cytotoxicity in Cancers. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26 (8), S. 2019–2033. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.05.026.
- Pello, Oscar M.; Pizzol, Maria de; Mirolo, Massimiliano; Soucek, Laura; Zammataro, Luca; Amabile, Angelo et al. (2012): Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. In: *Blood* 119 (2), S. 411–421. DOI: 10.1182/blood-2011-02-339911.
- Périard, Julien D.; Ruell, Patricia; Caillaud, Corinne; Thompson, Martin W. (2012): Plasma Hsp72 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) expression under heat stress: influence of exercise intensity. In: *Cell stress & chaperones* 17 (3), S. 375–383. DOI: 10.1007/s12192-011-0313-3.
- Pineda, Agustin O.; Carrell, Christopher J.; Bush, Leslie A.; Prasad, Swati; Caccia, Sonia; Chen, Zhi-Wei et al. (2004): Molecular dissection of Na<sup>+</sup> binding to thrombin. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (30), S. 31842–31853. DOI: 10.1074/jbc.M401756200.
- Pinho, Salomé S.; Reis, Celso A. (2015): Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (9), S. 540–555. DOI: 10.1038/nrc3982.
- Pitulescu, Mara E.; Adams, Ralf H. (2014): Regulation of signaling interactions and receptor endocytosis in growing blood vessels. In: *Cell adhesion & migration* 8 (4), S. 366–377. DOI: 10.4161/19336918.2014.970010.

- Pulkkinen, H. H.; Kiema, M.; Lappalainen, J. P.; Toropainen, A.; Beter, M.; Tirronen, A. et al. (2021): BMP6/TAZ-Hippo signaling modulates angiogenesis and endothelial cell response to VEGF. In: *Angiogenesis* 24 (1), S. 129–144. DOI: 10.1007/s10456-020-09748-4.
- Ramocki, M. B.; Johnson, S. E.; White, M. A.; Ashendel, C. L.; Konieczny, S. F.; Taparowsky, E. J. (1997): Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. In: *Molecular and cellular biology* 17 (7), S. 3547–3555. DOI: 10.1128/MCB.17.7.3547.
- Rapp, Ulf R.; Korn, Christian; Ceteci, Fatih; Karreman, Christiaan; Luetkenhaus, Katharina; Serafin, Valentina et al. (2009): MYC is a metastasis gene for non-small-cell lung cancer. In: *PloS one* 4 (6), e6029. DOI: 10.1371/journal.pone.0006029.
- Ren, P.; Stark, P. Y.; Johnson, R. L.; Bell, R. G. (1977): Mechanism of action of anticoagulants: correlation between the inhibition of prothrombin synthesis and the regeneration of vitamin K1 from vitamin K1 epoxide. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 201 (3), S. 541–546.
- Rhim, T. Y.; Park, C. S.; Kim, E.; Kim, S. S. (1998): Human prothrombin fragment 1 and 2 inhibit bFGF-induced BCE cell growth. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 252 (2), S. 513–516. DOI: 10.1006/bbrc.1998.9682.
- Ribatti, Domenico (2017): The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. In: *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 70, S. 97–101. DOI: 10.1016/j.reprotox.2016.11.004.
- Ribatti, Domenico; Nico, Beatrice; Crivellato, Enrico (2015): The development of the vascular system: a historical overview. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1214, S. 1–14. DOI: 10.1007/978-1-4939-1462-3\_1.
- Rickles, F. R.; Edwards, R. L. (1983): Activation of blood coagulation in cancer: Trousseau's syndrome revisited. In: *Blood* 62 (1), S. 14–31.
- Risau, W. (1997): Mechanisms of angiogenesis. In: *Nature* 386 (6626), S. 671–674. DOI: 10.1038/386671a0.
- Rittirsch, Daniel; Flierl, Michael A.; Ward, Peter A. (2008): Harmful molecular mechanisms in sepsis. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (10), S. 776–787. DOI: 10.1038/nri2402.
- Ruggeri, Zaverio M. (2007): The role of von Willebrand factor in thrombus formation. In: *Thrombosis research* 120 Suppl 1, S5-9. DOI: 10.1016/j.thromres.2007.03.011.
- Sakurai, Toshihiro; Suzuki, Kenta; Yoshie, Mikihiro; Hashimoto, Keisuke; Tachikawa, Eiichi; Tamura, Kazuhiro (2011): Stimulation of tube formation mediated through the prostaglandin EP2 receptor in rat luteal endothelial cells. In: *The Journal of endocrinology* 209 (1), S. 33–43. DOI: 10.1530/JOE-10-0357.
- Sambrano, G. R.; Weiss, E. J.; Zheng, Y. W.; Huang, W.; Coughlin, S. R. (2001): Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. In: *Nature* 413 (6851), S. 74–78. DOI: 10.1038/35092573.
- Satoh, Mamoru; Ishikawa, Yuh; Minami, Yoshitaka; Takahashi, Yuji; Nakamura, Motoyuki (2008): Role of Toll like receptor signaling pathway in ischemic coronary artery disease. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13, S. 6708–6715. DOI: 10.2741/3183.

- Sawada, Junko; Li, Fangfei; Komatsu, Masanobu (2015): R-Ras protein inhibits autophosphorylation of vascular endothelial growth factor receptor 2 in endothelial cells and suppresses receptor activation in tumor vasculature. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (13), S. 8133–8145. DOI: 10.1074/jbc.M114.591511.
- Scalise, Mariafrancesca; Mazza, Tiziano; Pappacoda, Gilda; Pochini, Lorena; Cosco, Jessica; Rovella, Filomena; Indiveri, Cesare (2020): The Human SLC1A5 Neutral Amino Acid Transporter Catalyzes a pH-Dependent Glutamate/Glutamine Antiport, as Well. In: *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8, S. 603. DOI: 10.3389/fcell.2020.00603.
- Scatena, Marta; Liaw, Lucy; Giachelli, Cecilia M. (2007): Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27 (11), S. 2302–2309. DOI: 10.1161/ATVBAHA.107.144824.
- Schlingensiepen, Karl-Hermann; Schlingensiepen, Reimar; Steinbrecher, Andreas; Hau, Peter; Bogdahn, Ulrich; Fischer-Blass, Birgit; Jachimczak, Piotr (2006): ç. In: *Cytokine & growth factor reviews* 17 (1-2), S. 129–139. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.09.002.
- Schmitt, E.; Gehrman, M.; Brunet, M.; Multhoff, G.; Garrido, C. (2007): Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. In: *Journal of leukocyte biology* 81 (1), S. 15–27. DOI: 10.1189/jlb.0306167.
- Schulze, H.; Shivdasani, R. A. (2005): Mechanisms of thrombopoiesis. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 3 (8), S. 1717–1724. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2005.01426.x.
- Semenza, Gregg L. (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. In: *Nature reviews. Cancer* 3 (10), S. 721–732. DOI: 10.1038/nrc1187.
- Senger, D. R.; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Harvey, V. S.; Dvorak, H. F. (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. In: *Science (New York, N.Y.)* 219 (4587), S. 983–985. DOI: 10.1126/science.6823562.
- Seo, Dongyeob; Jung, Su Myung; Park, Jin Seok; Lee, Jaewon; Ha, Jihoon; Kim, Minbeom; Park, Seok Hee (2019): The deubiquitinating enzyme PSMD14 facilitates tumor growth and chemoresistance through stabilizing the ALK2 receptor in the initiation of BMP6 signaling pathway. In: *EBioMedicine* 49, S. 55–71. DOI: 10.1016/j.ebiom.2019.10.039.
- Shen, L.; Dahlbäck, B. (1994): Factor V and protein S as synergistic cofactors to activated protein C in degradation of factor VIIIa. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (29), S. 18735–18738.
- Shikamoto, Yasuo; Morita, Takashi (1999): Expression of factor X in both the rat brain and cells of the central nervous system. In: *FEBS Letters* 463 (3), S. 387–389. DOI: 10.1016/S0014-5793(99)01657-9.
- Shivapurkar, Narayan; Toyooka, Shinichi; Eby, Michael T.; Huang, Chun Xian; Sathyanarayana, Ubaradka G.; Cunningham, H. Thomas et al. (2002): Differential inactivation of caspase-8 in lung cancers. In: *Cancer Biology & Therapy* 1 (1), S. 65–69. DOI: 10.4161/cbt.1.1.45.

- Sipola, Annina; Seppinen, Lotta; Pihlajaniemi, Taina; Tuukkanen, Juha (2009): Endostatin affects osteoblast behavior in vitro, but collagen XVIII/endostatin is not essential for skeletal development in vivo. In: *Calcified tissue international* 85 (5), S. 412–420. DOI: 10.1007/s00223-009-9287-x.
- Stark, Henning; Buldt, Joachim; Müller, Michael; Klenke, Arno; Limpert, Jens (2021): 1 kW, 10 mJ, 120 fs coherently combined fiber CPA laser system. In: *Optics letters* 46 (5), S. 969–972. DOI: 447725.
- Stenflo, J. (1974): Vitamin K and the biosynthesis of prothrombin. IV. Isolation of peptides containing prosthetic groups from normal prothrombin and the corresponding peptides from dicoumarol-induced prothrombin. In: *The Journal of biological chemistry* 249 (17), S. 5527–5535.
- Stenflo, J.; Fernlund, P.; Egan, W.; Roepstorff, P. (1974): Vitamin K dependent modifications of glutamic acid residues in prothrombin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (7), S. 2730–2733. DOI: 10.1073/pnas.71.7.2730.
- Stupack, Dwayne G. (2013): Caspase-8 as a therapeutic target in cancer. In: *Cancer letters* 332 (2), S. 133–140. DOI: 10.1016/j.canlet.2010.07.022.
- Sun, Heng; Li, Xue-Bing; Meng, Ya; Fan, Li; Li, Min; Fang, Jing (2013): TRAF6 upregulates expression of HIF-1 $\alpha$  and promotes tumor angiogenesis. In: *Cancer research* 73 (15), S. 4950–4959. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0370.
- Sun, P.; Dong, P.; Dai, K.; Hannon, G. J.; Beach, D. (1998a): p53-independent role of MDM2 in TGF-beta1 resistance. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5397), S. 2270–2272. DOI: 10.1126/science.282.5397.2270.
- Sun, W. Y.; Burkart, M. C.; Holahan, J. R.; Degen, S. J. (2000): Prothrombin San Antonio: a single amino acid substitution at a factor Xa activation site (Arg320 to His) results in dysprothrombinemia. In: *Blood* 95 (2), S. 711–714.
- Sun, W. Y.; Witte, D. P.; Degen, J. L.; Colbert, M. C.; Burkart, M. C.; Holmbäck, K. et al. (1998b): Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13), S. 7597–7602. DOI: 10.1073/pnas.95.13.7597.
- Sun, Xiaojie; Zhan, Mengru; Sun, Xun; Liu, Wanqi; Meng, Xiangwei (2021): C1GALT1 in health and disease. In: *Oncology letters* 22 (2), S. 589. DOI: 10.3892/ol.2021.12850.
- Sung, Hyeran; Kanchi, Krishna L.; Wang, Xue; Hill, Kristen S.; Messina, Jane L.; Lee, Ji-Hyun et al. (2016): Inactivation of RASA1 promotes melanoma tumorigenesis via R-Ras activation. In: *Oncotarget* 7 (17), S. 23885–23896. DOI: 10.18632/oncotarget.8127.
- Taneda, H.; Andoh, K.; Nishioka, J.; Takeya, H.; Suzuki, K. (1994): Blood coagulation factor Xa interacts with a linear sequence of the kringle 2 domain of prothrombin. In: *Journal of biochemistry* 116 (3), S. 589–597. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124565.
- Tang, Han; He, Yiqun; Li, Linli; Mao, Wei; Chen, Xujun; Ni, Haofei et al. (2019): Exosomal MMP2 derived from mature osteoblasts promotes angiogenesis of endothelial cells via VEGF/Erk1/2 signaling pathway. In: *Experimental cell research* 383 (2), S. 111541. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.111541.

Taniguchi, Koji; Kohno, Ri-Ichiro; Ayada, Toranoshin; Kato, Reiko; Ichiyama, Kenji; Morisada, Tohru et al. (2007): Spreads are essential for embryonic lymphangiogenesis by regulating vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling. In: *Molecular and cellular biology* 27 (12), S. 4541–4550. DOI: 10.1128/MCB.01600-06.

Tannock, I. F. (1968): The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. In: *British journal of cancer* 22 (2), S. 258–273. DOI: 10.1038/bjc.1968.34.

Taylor, F. B.; 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. In: *Blood* 97 (6), S. 1685–1688. DOI: 10.1182/blood.v97.6.1685.

Teitz, T.; Lahti, J. M.; Kidd, V. J. (2001): Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 79 (8), S. 428–436. DOI: 10.1007/s001090100233.

The Human Protein Atlas (2023): FKRPF. Online verfügbar unter <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000181027-FKRPF/pathology/pancreatic+cancer>, zuletzt aktualisiert am 27.02.2023.

Tisch, Nathalie; Freire-Valls, Aida; Yebes, Rosario; Paredes, Isidora; La Porta, Silvia; Wang, Xiaohong et al. (2019): Caspase-8 modulates physiological and pathological angiogenesis during retina development. In: *The Journal of clinical investigation* 129 (12), S. 5092–5107. DOI: 10.1172/JCI122767.

Tollefsen, Douglas M. (2007): Heparin cofactor II modulates the response to vascular injury. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 27 (3), S. 454–460. DOI: 10.1161/01.ATV.0000256471.22437.88.

Triner, Daniel; Shah, Yatrik M. (2016): Hypoxia-inducible factors: a central link between inflammation and cancer. In: *The Journal of clinical investigation* 126 (10), S. 3689–3698. DOI: 10.1172/JCI84430.

Tsopanoglou, N. E.; Maragoudakis, M. E. (1999): On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (34), S. 23969–23976. DOI: 10.1074/jbc.274.34.23969.

Tsopanoglou, N. E.; Pipili-Synetos, E.; Maragoudakis, M. E. (1993): Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. In: *The American journal of physiology* 264 (5 Pt 1), C1302-7. DOI: 10.1152/ajpcell.1993.264.5.C1302.

Tsopanoglou, Nikos E.; Maragoudakis, Michael E. (2004): Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 30 (1), S. 63–69. DOI: 10.1055/s-2004-822971.

Turgeon, V. L.; Houenou, L. J. (1997): The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. In: *Brain research. Brain research reviews* 25 (1), S. 85–95. DOI: 10.1016/s0165-0173(97)00015-5.

Vlodavsky, Israel; Christofori, Gerhard (1999): Fibroblast Growth Factors in Tumor Progression and Angiogenesis. In: Beverly A. Teicher (Hg.): *Antiangiogenic Agents in Cancer Therapy*. Totowa, NJ: Humana Press, S. 93–118.

Volkman, Ingo; Kumarswamy, Regalla; Pfaff, Nils; Fiedler, Jan; Dangwal, Seema; Holzmann, Angelika et al. (2013): MicroRNA-mediated epigenetic silencing of sirtuin1 contributes to impaired angiogenic responses. In: *Circulation research* 113 (8), S. 997–1003. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301702.

Vu, T. K.; Wheaton, V. I.; Hung, D. T.; Charo, I.; Coughlin, S. R. (1991a): Domains specifying thrombin-receptor interaction. In: *Nature* 353 (6345), S. 674–677. DOI: 10.1038/353674a0.

Vu, Thien-Khai H.; Hung, David T.; Wheaton, Virginia I.; Coughlin, Shaun R. (1991b): Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. In: *Cell* 64 (6), S. 1057–1068. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90261-v.

Walker, F. J. (1980): Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. In: *The Journal of biological chemistry* 255 (12), S. 5521–5524.

Wang, Gang G.; Cai, Ling; Pasillas, Martina P.; Kamps, Mark P. (2007): NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. In: *Nature cell biology* 9 (7), S. 804–812. DOI: 10.1038/ncb1608.

Wang, Huizhi; Li, Jie; He, Junbo; Liu, Yawen; Feng, Wen; Zhou, Hailang et al. (2020): Methyl-CpG-binding protein 2 drives the Furin/TGF- $\beta$ 1/Smad axis to promote epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. In: *Oncogenesis* 9 (8), S. 76. DOI: 10.1038/s41389-020-00258-y.

Wang, Wei; Li, Guang-Yao; Zhu, Jian-Yu; Huang, Da-Bing; Zhou, Hang-Cheng; Zhong, Wen; Ji, Chu-Shu (2015): Overexpression of AGGF1 is correlated with angiogenesis and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. In: *Medical oncology (Northwood, London, England)* 32 (4), S. 131. DOI: 10.1007/s12032-015-0574-2.

Weidner, N.; Carroll, P. R.; Flax, J.; Blumenfeld, W.; Folkman, J. (1993): Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. In: *The American Journal of Pathology* 143 (2), S. 401–409.

Weidner, N.; Semple, J. P.; Welch, W. R.; Folkman, J. (1991): Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. In: *The New England journal of medicine* 324 (1), S. 1–8. DOI: 10.1056/NEJM199101033240101.

Weller, M.; Fontana, A. (1995): The failure of current immunotherapy for malignant glioma. Tumor-derived TGF-beta, T-cell apoptosis, and the immune privilege of the brain. In: *Brain research. Brain research reviews* 21 (2), S. 128–151. DOI: 10.1016/0165-0173(95)00010-0.

Wells, C. M.; Di Cera, E. (1992): Thrombin is a Na(+)-activated enzyme. In: *Biochemistry* 31 (47), S. 11721–11730. DOI: 10.1021/bi00162a008.

Westermarck, J.; Kähäri, V. M. (1999): Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (8), S. 781–792.

Wilson, William R.; Hay, Michael P. (2011): Targeting hypoxia in cancer therapy. In: *Nature reviews. Cancer* 11 (6), S. 393–410. DOI: 10.1038/nrc3064.

Wojtowicz-Praga, S. (1997): Reversal of tumor-induced immunosuppression: a new approach to cancer therapy. In: *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 20 (3), S. 165–177.

- Wojtukiewicz, M. Z.; Tang, D. G.; Ben-Josef, E.; Renaud, C.; Walz, D. A.; Honn, K. V. (1995): Solid tumor cells express functional "tethered ligand" thrombin receptor. In: *Cancer research* 55 (3), S. 698–704.
- Wojtukiewicz, M. Z.; Tang, D. G.; Ciarelli, J. J.; Nelson, K. K.; Walz, D. A.; Diglio, C. A. et al. (1993): Thrombin increases the metastatic potential of tumor cells. In: *International journal of cancer* 54 (5), S. 793–806. DOI: 10.1002/ijc.2910540514.
- Wood, Alasdair J.; Müller, Juliane S.; Jepson, Catherine D.; Laval, Steve H.; Lochmüller, Hanns; Bushby, Kate et al. (2011): Abnormal vascular development in zebrafish models for fukutin and FKRPF deficiency. In: *Human molecular genetics* 20 (24), S. 4879–4890. DOI: 10.1093/hmg/ddr426.
- Wu, Dong-Ming; Deng, Shi-Hua; Liu, Teng; Han, Rong; Zhang, Ting; Xu, Ying (2018): TGF- $\beta$ -mediated exosomal Inc-MMP2-2 regulates migration and invasion of lung cancer cells to the vasculature by promoting MMP2 expression. In: *Cancer medicine* 7 (10), S. 5118–5129. DOI: 10.1002/cam4.1758.
- Wu, Jian; Yang, Xiaohong; Lu, Hongfei; Liu, Liqiao; Xu, Baohua; Zheng, Shuangyan et al. (2017): Inhibitory effect and mechanism of exogenous mammalian sterile 20-like kinase 1 on the growth of human colorectal cancer. In: *Oncology letters* 13 (4), S. 2656–2664. DOI: 10.3892/ol.2017.5786.
- Wu, S. M.; Cheung, W. F.; Frazier, D.; Stafford, D. W. (1991): Cloning and expression of the cDNA for human gamma-glutamyl carboxylase. In: *Science (New York, N.Y.)* 254 (5038), S. 1634–1636. DOI: 10.1126/science.1749935.
- Wu, Yao-Ming; Liu, Chiung-Hui; Huang, Miao-Juei; Lai, Hong-Shiee; Lee, Po-Huang; Hu, Rey-Heng; Huang, Min-Chuan (2013): C1GALT1 enhances proliferation of hepatocellular carcinoma cells via modulating MET glycosylation and dimerization. In: *Cancer research* 73 (17), S. 5580–5590. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0869.
- Xia, Lijun; Ju, Tongzhong; Westmuckett, Andrew; An, Guangyu; Ivanciu, Lacramioara; McDaniel, J. Michael et al. (2004): Defective angiogenesis and fatal embryonic hemorrhage in mice lacking core 1-derived O-glycans. In: *The Journal of cell biology* 164 (3), S. 451–459. DOI: 10.1083/jcb.200311112.
- Xiao, Tsan; Takagi, Junichi; Collier, Barry S.; Wang, Jia-Huai; Springer, Timothy A. (2004): Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. In: *Nature* 432 (7013), S. 59–67. DOI: 10.1038/nature02976.
- Xu, C. M.; Liu, W. W.; Liu, C. J.; Wen, C.; Lu, H. F.; Wan, F. S. (2013): Mst1 overexpression inhibited the growth of human non-small cell lung cancer in vitro and in vivo. In: *Cancer gene therapy* 20 (8), S. 453–460. DOI: 10.1038/cgt.2013.40.
- Xu, Hanwen; Zhang, Yu; Peña, Maria M.; Pirisi, Lucia; Creek, Kim E. (2017): Six1 promotes colorectal cancer growth and metastasis by stimulating angiogenesis and recruiting tumor-associated macrophages. In: *Carcinogenesis* 38 (3), S. 281–292. DOI: 10.1093/carcin/bgw121.
- Xu, Lei; Fukumura, Dai; Jain, Rakesh K. (2002): Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway: mechanism of low pH-induced VEGF. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (13), S. 11368–11374. DOI: 10.1074/jbc.M108347200.

- Xu, W. F.; Andersen, H.; Whitmore, T. E.; Presnell, S. R.; Yee, D. P.; Ching, A. et al. (1998): Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12), S. 6642–6646. DOI: 10.1073/pnas.95.12.6642.
- Xu, Zhiliang; Duan, Fengsen; Lu, Hui; Abdulkadhim Dragh, Maytham; Xia, Yanzhi; Liang, Huageng; Hong, Ling (2018): UBIAD1 suppresses the proliferation of bladder carcinoma cells by regulating H-Ras intracellular trafficking via interaction with the C-terminal domain of H-Ras. In: *Cell death & disease* 9 (12), S. 1170. DOI: 10.1038/s41419-018-1215-4.
- Yamamoto, Tomoko; Kato, Yoichiro; Shibata, Noriyuki; Sawada, Tatsuo; Osawa, Makiko; Kobayashi, Makio (2008): A role of fukutin, a gene responsible for Fukuyama type congenital muscular dystrophy, in cancer cells: a possible role to suppress cell proliferation. In: *International journal of experimental pathology* 89 (5), S. 332–341. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2008.00599.x.
- Yan, Xuebing; Liu, Liguang; Li, Hao; Huang, Linsheng; Yin, Mingming; Pan, Cheng et al. (2016): Dual specificity phosphatase 5 is a novel prognostic indicator for patients with advanced colorectal cancer. In: *American journal of cancer research* 6 (10), S. 2323–2333.
- Yu, Yang; Liu, Dan-yang; Chen, Xue-shen; Zhu, Ling; Wan, Li-hong (2021): MANF: A Novel Endoplasmic Reticulum Stress Response Protein—The Role in Neurological and Metabolic Disorders. In: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2021. DOI: 10.1155/2021/6467679.
- ZFIN (2023): WDR43. Online verfügbar unter <https://zfin.org/ZDB-GENE-021231-3>, zuletzt aktualisiert am 20.02.2023.
- Zhang, Rui; Zhang, Yan; Lu, Xianglan; Xu, Weihong; Wang, He; Mo, Wenbin et al. (2020a): SPRED1 Is Downregulated and a Prognostic Biomarker in Adult Acute Myeloid Leukemia. In: *Frontiers in oncology* 10, S. 204. DOI: 10.3389/fonc.2020.00204.
- Zhang, Yanhua; Li, Yue; Wang, Quanyue; Su, Bo; Xu, Hui; Sun, Yang et al. (2020b): Role of RASA1 in cancer: A review and update (Review). In: *Oncology reports* 44 (6), S. 2386–2396. DOI: 10.3892/or.2020.7807.
- Zhao, L. Y.; Tong, D. D.; Xue, M.; Ma, H. L.; Liu, S. Y.; Yang, J. et al. (2017): MeCP2, a target of miR-638, facilitates gastric cancer cell proliferation through activation of the MEK1/2–ERK1/2 signaling pathway by upregulating GIT1. In: *Oncogenesis* 6 (7), e368-. DOI: 10.1038/oncsis.2017.60.
- Zucker, Stanley; Mirza, Humayun; Conner, Cathleen E.; Lorenz, Ann F.; Drews, Michelle H.; Bahou, Wadie F.; Jesty, Jolyon (1998): Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: Conversion of prothrombin to thrombin results in progelatininase activation and cell proliferation. In: *Int. J. Cancer* 75 (5), S. 780–786. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0215(19980302)75:5<780::AID-IJC19>3.0.CO;2-A.
- Zucker-Franklin, D. (1996): Megakaryocyte and platelet structure in thrombocytopoiesis: the effect of cytokines. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 14 Suppl 1, S. 1–17. DOI: 10.1002/stem.5530140702.

## 7 Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer, der mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe mitzuarbeiten und meine Promotion zu erarbeiten. Ich danke ihm für seine starke Unterstützung, ständigen unermühtlichen Rat und nette Zusammenarbeit.

Desweiteren danke ich der gesamten Arbeitsgruppe vom CTH, für die tolle Unterstützung und Atmosphäre.

Abschließend danke ich meiner Familie, meinen Freunden Dr. Ina Fuhrmann, Dr. Florian Heiner Illy und Nil Roura Martín für die immerwährende Motivation und Unterstützung.



