

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

Auswirkungen von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in Fibrosarkomen auf  
Blutgerinnung, Tumorwachstum und Angiogenese

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

Vorgelegt von

Ludwig Thomas Eder  
aus Augsburg

Mainz, 2024

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

Tag der Promotion: 04. April 2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung / Ziel der Dissertation</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Tumorbiologie</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Karzinogenese.....	2
1.1.2 Tumorwachstum.....	3
1.1.3 Angiogenese .....	4
1.1.4 Fibrosarkome.....	5
<b>1.2 Hämostase</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 Primäre Hämostase .....	6
1.2.2 Sekundäre Hämostase .....	7
1.2.3 Regulation der Hämostase.....	9
<b>1.3 Prothrombin und Thrombin</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Molekulare Struktur von Prothrombin .....	10
1.3.2 Das Prothrombin-Gen und seine Expression .....	11
1.3.3 Posttranslationale Modifikation und Aktivierung zu Thrombin.....	12
1.3.4 Die Serinprotease Thrombin.....	13
1.3.5 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) .....	14
<b>1.4 Funktionelle Rolle von Thrombin jenseits der Hämostase</b> .....	<b>14</b>
1.4.1 Thrombin in der Immunologie und der Inflammation.....	16
1.4.2 Thrombin in der Tumorbiologie.....	17
<b>1.5 Ziel der Dissertation</b> .....	<b>18</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>19</b>
2.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.4 Primer .....	21
2.1.5 Geräte .....	21
2.1.6 Software .....	22
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Tiermodelle.....	23
2.2.1.1 D-Insight Mausmodell .....	23
2.2.1.2 Induzierbares RNA-Interferenz Mausmodell (F2KD) .....	24
2.2.2 Zellkulturen.....	25
2.2.2.1 Kultivierung .....	26
2.2.2.2 Passagieren, Pelletieren, Einfrieren und Auftauen .....	26
2.2.3 Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.3.1 RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsmessung.....	27
2.2.3.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription) .....	27
2.2.3.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) .....	28
2.2.3.4 F2 RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	29
2.2.4 Tumorzellinjektion in Mäuse und Tumorvermessung .....	30
2.2.5 Blutungszeit und Prothrombinzeit.....	31
2.2.6 Proliferationsversuch.....	32
2.2.7 Angiogeneseversuch.....	32

2.2.7.1	Angiogenese im Mausohr.....	32
2.2.7.2	Angiogenese von F2KD Fibrosarkomen in B6 Mäusen .....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Validierung der Fibrosarkom-Zellen.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Nachweis von Tumor-intrinsischem Prothrombin .....</b>	<b>36</b>
3.2.1	Nachweis von Prothrombin-Expression in D-Insight Fibrosarkomen .....	36
3.2.2	Nachweis von Prothrombin-Expression in F2KD Fibrosarkomen .....	37
<b>3.3</b>	<b>Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Hämostase .</b>	<b>38</b>
<b>3.4</b>	<b>Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf das Tumorwachstum.....</b>	<b>40</b>
3.4.1	Tumorwachstum in vitro – Zellproliferation.....	40
3.4.2	Tumorwachstum in vivo .....	42
<b>3.5</b>	<b>Einfluss von Thrombin und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese.....</b>	<b>44</b>
3.5.1	Methode zur Quantifizierung der Angiogenese mittels VEGF-induzierter Angiogenese.....	44
3.5.2	Rekombinantes Thrombin induziert Angiogenese in Mausohren .....	45
3.5.3	Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2</b>	<b>Hämostase: Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Tumorwachstum: Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin.....</b>	<b>51</b>
<b>4.4</b>	<b>Angiogenese: Einfluss von rekombinantem Thrombin und Tumor-intrinsischem Prothrombin.....</b>	<b>53</b>
<b>4.5</b>	<b>Limitationen der Studie und Implikationen für zukünftige Arbeiten.....</b>	<b>54</b>
<b>4.6</b>	<b>Klinische Relevanz und Ausblick .....</b>	<b>55</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Tabellarischer Lebenslauf.....</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APC	aktiviertes Protein C
Col1A2	Collagen-Typ-I-alpha-2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
FBS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLuc	Firefly-Luciferase
FII	Prothrombin
FIIa	Thrombin
FIII	Tissue Factor, Faktor III
FV	Faktor V
FVa	aktivierter Faktor V
FVII	Faktor VII
FVIIa	aktivierter Faktor VII
FVIII	Faktor VIII
FVIIIa	aktivierter Faktor VIII
FIX	Faktor IX
FIXa	aktivierter Faktor IX
FX	Faktor X
FXa	aktivierter Faktor X
FXI	Faktor XI
FXIa	aktivierter Faktor XI
FXIII	Faktor XIII
GRO- $\alpha$	Growth Regulated Oncogene alpha
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor 1
IL	Interleukin
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCA	Methylcholanthren
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MMP	Matrixmetalloproteinase

NO	Stickstoffmonoxid
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
PS	Protein S
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
shRNA	Small hairpin RNA
TF	Tissue Factor, Faktor III
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TGF- $\beta$ 1	transforming growth factor $\beta$ 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vWF	von-Willebrand-Faktor

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Karzinogenese.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der zellbasierten Hämostase .....	8
Abbildung 3: Regulation der Hämostase - Endothelfunktion und natürliche Antikoagulantien .....	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Prothrombin.....	11
Abbildung 5: Aktivierung von Prothrombin.....	13
Abbildung 6: Funktionelle Rolle von Thrombin in Physiologie und Pathologie .....	15
Abbildung 7: D-Insight Mausmodell - Schematische Darstellung .....	24
Abbildung 8: Induzierbares RNA-Interferenz Mausmodell (F2KD) - Schematische Darstellung.....	25
Abbildung 9: Schwanzblutungszeit - Aufbau und Durchführung .....	31
Abbildung 10: Morphologie der Fibrosarkom-Zellen und molekularbiologische Differenzierung von Fibroblasten .....	35
Abbildung 11: Tumorwachstum nach Injektion von Fibrosarkom-Zellen in B6 Mäuse .....	36
Abbildung 12: Nachweis von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in D-Insight Fibrosarkomen .....	37
Abbildung 13: Nachweis von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in F2KD Fibrosarkomen .....	38
Abbildung 14: Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Hämostase .....	40
Abbildung 15: Verlangsamte Zellproliferation nach Depletion von im Tumor exprimiertem Prothrombin .....	41
Abbildung 16: Mikroskopische Darstellung der Zellproliferation.....	42
Abbildung 17: Vermindertes Tumorwachstum nach Depletion von Tumor-intrinsischem Prothrombin .....	43
Abbildung 18: VEGF-induzierte Angiogenese im Mausohr .....	45
Abbildung 19: Thrombin-induzierte Angiogenese in Mausohren.....	46
Abbildung 20: Prothrombin-Depletion fördert die Angiogenese in Fibrosarkomen.....	47
Abbildung 21: Vermindertes Tumorwachstum durch Depletion von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression .....	48

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien</i> .....	19
<i>Tabelle 2: Puffer und Lösungen</i> .....	20
<i>Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien</i> .....	20
<i>Tabelle 4: Primer</i> .....	21
<i>Tabelle 5: Geräte</i> .....	21
<i>Tabelle 6: Software</i> .....	22
<i>Tabelle 7: Tiermodelle</i> .....	23
<i>Tabelle 8: RNA-Isolierung</i> .....	27
<i>Tabelle 9: cDNA-Synthese - Reaktionsgemisch 1</i> .....	28
<i>Tabelle 10: cDNA-Synthese - Reaktionsgemisch 2</i> .....	28
<i>Tabelle 11: qRT-PCR - Mastermix</i> .....	29

# 1 Einleitung / Ziel der Dissertation

## 1.1 Tumorbilogie

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) und Internationaler Agentur für Krebsforschung (IARC) war Krebs im Jahr 2022 für schätzungsweise 9,7 Millionen Todesfälle verantwortlich. Etwa jeder fünfte Mensch erleidet im Laufe seines Lebens eine Krebserkrankung (1). Ihre Komplexität und die Herausforderungen hinsichtlich ihrer Therapie machen Krebs zu einem der am schwierigsten zu behandelnden Gesundheitsprobleme der modernen Medizin.

Die Geschichte der Krebsforschung reicht bis in die Antike zurück. Bereits im alten Ägypten wurden Krebserkrankungen dokumentiert. Das Edwin-Smith-Papyrus, datiert auf etwa 1600 v. Chr., beschreibt Brusttumore und stellt damit die früheste bekannte medizinische Aufzeichnung einer Krebserkrankung dar (2). Hippokrates (460–370 v. Chr.), bekannt als der Vater der modernen Medizin, prägte den Begriff "Karkinos" für Krebs, ein Begriff, der auf den krabbenartigen Ausbreitungscharakter von Tumoren anspielte (3). Intensive Forschung über Jahrhunderte hinweg hat unser Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Krebsentstehung und -progression erheblich erweitert. Besonders die Entdeckung von (Proto-) Onkogenen und Tumorsuppressorgenen hat tiefgehende Einblicke in die molekularbiologischen Mechanismen der Tumorentstehung ermöglicht.

Onkogene sind mutierte Proto-Onkogene, die das Zellwachstum und die Zellteilung fördern, während Tumorsuppressorgene das Zellwachstum hemmen und die Reparatur von DNA-Schäden unterstützen. Die Aktivierung bzw. Inaktivierung solcher Gene kann zu unkontrolliertem Zellwachstum und letztlich zur Tumorbildung führen (4, 5).

Tumore entstehen durch unkontrolliertes Zellwachstum und können gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein. Gutartige Tumore wachsen in der Regel langsam und lokal begrenzt, während bösartige Tumore, auch als "Krebs" bezeichnet, schneller wachsen und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung besitzen (6). Sie können also in benachbarte Gewebe eindringen und sich über den Blutkreislauf oder das Lymphsystem in anderen Körperregionen ausbreiten.

Die Karzinogenese, also die Entstehung maligner Tumore, erfolgt durch eine Reihe genetischer und epigenetischer Veränderungen, die die normale Regulation des Zellzyklus stören und zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Die genetischen Veränderungen können durch verschiedene Auslöser verursacht werden, darunter Umweltfaktoren wie Strahlung und Chemikalien (7), oxidativer Stress (8) sowie Infektionen durch bestimmte Bakterien und Viren (9, 10). Diese Auslöser werden Karzinogene bzw. Kanzerogene genannt. Neben genetischen Mutationen spielen auch epigenetische Veränderungen wie DNA-Methylierung und Histonmodifikationen eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese. Diese Veränderungen können die Genexpression ohne Änderungen der DNA-Sequenz beeinflussen und zur Tumorentwicklung beitragen (11).

Im Jahr 2000 beschrieben Douglas Hanahan und Robert Weinberg in einem Review-Paper die "Hallmarks of Cancer". Diese umfassen sechs charakteristische biologische Fähigkeiten,

die Tumorzellen während ihrer Entwicklung erwerben, um maligne zu werden: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Widerstandsfähigkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Vermeidung des programmierten Zelltods (Apoptose), unbegrenztes Replikationspotenzial, Förderung der Angiogenese und Fähigkeit zur Gewebsinvasion und Metastasierung. Diese Kennzeichen werden als fundamentale Merkmale der Tumorbiologie betrachtet (12).

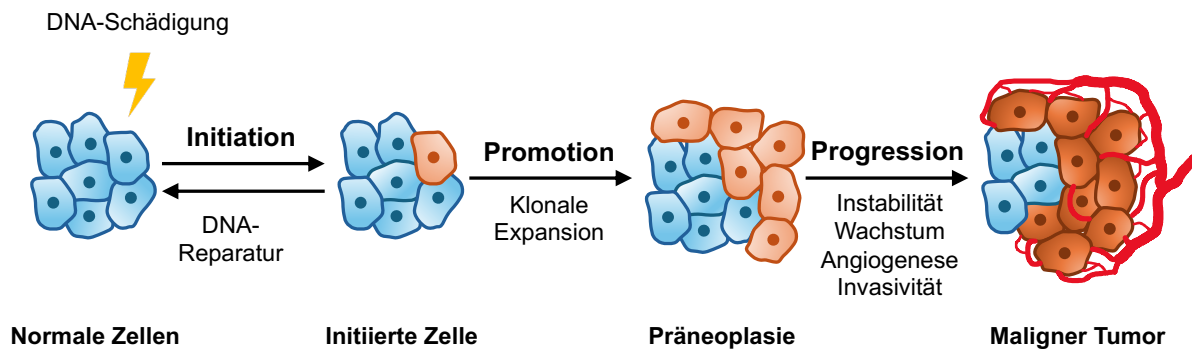
Mit fortschreitender Forschung und neuen wissenschaftlichen Entdeckungen wurden diese "Hallmarks" weiter verfeinert und erweitert. Im Jahr 2011 fügten Hanahan und Weinberg zwei weitere Merkmale hinzu: die Umgehung der Immunüberwachung zur Vermeidung der Zerstörung des Tumors durch das Immunsystem und die Umwandlung des Zellstoffwechsels zur Deckung des erhöhten Energiebedarfs (13). Im Jahr 2022 diskutierte Douglas Hanahan in einem Review-Paper die "Hallmarks" um die Eigenschaft der phänotypischen Plastizität zu ergänzen, also die Fähigkeit von Zellen, ihren Differenzierungszustand zu ändern. Dies erlaubt es den Zellen von ausgereiften Zellstadien in vorläufer-ähnliche Zustände zurückzukehren oder in andere Zelltypen zu wechseln (14).

### **1.1.1 Karzinogenese**

Die Karzinogenese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess und lässt sich in drei Hauptphasen unterteilen (siehe Abbildung 1). Der erste Schritt ist die Initiation. Diese ist durch eine Schädigung der DNA einer "normalen" Zelle gekennzeichnet. Werden die DNA-Schäden durch die körpereigenen Reparaturmechanismen nicht korrekt repariert, können daraus dauerhafte genetische Veränderungen resultieren (15). Diese Mutationen können durch Karzinogene wie chemische Substanzen, Strahlung oder Infektionen verursacht werden (7, 9, 10). Zu den am besten erforschten Mutationen gehören die der RAS-Gene und des TP53-Gens. RAS-Gene (z.B. KRAS, NRAS und HRAS) kodieren für Proteine, die als molekulare Schalter in zellulären Signalwegen fungieren, die das Zellwachstum, die Zellteilung und die Differenzierung regulieren. Mutationen in den RAS-Genen können dazu führen, dass die RAS-Proteine dauerhaft in aktivem Zustand verbleiben, selbst ohne Wachstumsfaktorsignale. Dies führt zu unkontrolliertem Zellwachstum, da die nachgeschalteten Signalwege kontinuierlich aktiviert bleiben (16, 17). Das TP53-Gen kodiert für das p53-Protein, das als Tumorsuppressor fungiert. Es wird oft als "Wächter des Genoms" bezeichnet, da es eine zentrale Rolle in der Regulierung des Zellzyklus spielt. Bei DNA-Schäden wird p53 aktiviert und kann den Zellzyklus anhalten, um Reparaturmechanismen zu ermöglichen oder bei irreparablen Schäden die Apoptose auszulösen. Mutationen im TP53-Gen führen häufig zu einem Funktionsverlust des Proteins, was als Loss-of-Function-Mutation bezeichnet wird. Dies verhindert die Reparatur von DNA-Schäden und ermöglicht die Ansammlung weiterer Mutationen, wodurch die Tumorentstehung gefördert wird (18, 19). Mutationen in diesem Gen finden sich in etwa 50% aller menschlichen Tumore (20, 21).

Anschließend folgt die Promotion. In dieser Phase kommt es zur klonalen Expansion der initiierten Zelle, wodurch Präneoplasien entstehen können (15). Promotoren sind meist nicht selbst mutagen, sondern fördern das Wachstum und die Vermehrung bereits mutierter Zellen (22-24). Hierzu zählen entzündliche Prozesse (25), hormonelle Einflüsse (26), Wachstumsfaktoren (27) oder exogene Substanzen. Sie fördern die proliferative Aktivität der Zelle, indem sie durch verschiedene Signalwege das Zellwachstum und die Zellteilung stimulieren. Ein wichtiger Signalweg ist die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade, die in vielen Krebsarten überaktiviert vorliegt (16, 28).

Die dritte Phase ist die Progression und beschreibt die maligne Transformation der Präneoplasie. Diese Phase ist durch eine erhöhte genetische Instabilität gekennzeichnet, wodurch weitere Mutationen akkumulieren können, die das Wachstum und die Ausbreitung der Zellen fördern (29, 30). Auch in dieser Phase spielen die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen eine entscheidende Rolle (31). Während der malignen Transformation erwerben die Zellen unter anderem die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (29).



**Abbildung 1: Karzinogenese**

Die Karzinogenese ist ein mehrstufiger Prozess, in dem sich normale Zellen zu Krebszellen entwickeln. Zunächst führt eine DNA-Schädigung zu einer Veränderung des Genoms (Initiation). Anschließend folgt die Promotion. Diese Phase beschreibt die klonale Expansion der zuvor initiierten Zelle, wodurch eine Präneoplasie entsteht. Durch weitere genetische und epigenetische Veränderungen erfährt die Präneoplasie eine maligne Transformation und erhält unter anderem die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung. Diese Phase wird als Progression bezeichnet. Abbildung in Anlehnung an Liu et al., 2015 (32).

### 1.1.2 Tumorwachstum

Ein zentrales Merkmal von Krebszellen ist ihr unkontrolliertes Wachstum. Normalerweise besteht ein Gleichgewicht zwischen proliferativen und antiproliferativen Signalen, bei Krebszellen ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört und sie weisen eine gesteigerte Proliferation auf. Dies ist das Ergebnis zahlreicher komplexer und multifaktorieller Prozesse.

Krebszellen sind in der Lage eigene Wachstumssignale zu erzeugen, um unabhängig von externen Wachstumssignalen zu wachsen. Dies geschieht durch autokrine Signalisierung, bei der Krebszellen Wachstumssignale produzieren und freisetzen, die dann auf dieselbe Zelle zurückwirken (33). Darüber hinaus können sie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren überexprimieren oder nachgeschaltete Signalwege konstitutiv aktivieren, um Wachstumssignale zu verstärken. Bekannte Beispiele hierfür sind der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und der Rezeptor für den insulinähnlichen Wachstumsfaktor 1 (IGF1R), die in vielen Tumorentitäten überexprimiert werden (34, 35).

Des Weiteren entwickeln Krebszellen eine Widerstandsfähigkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, beispielsweise dem Retinoblastom-Protein (rBP). Dieses spielt in der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung von Zellen und der Apoptose eine zentrale Rolle. Es kann durch Inaktivierung des Transkriptionsfaktors E2F die Zellzyklusprogression hemmen, indem es den Übergang von der G1- zur S-Phase blockiert (36). Zudem ist es beim Übergang der Zelle in den postmitotischen Zustand und der terminalen Differenzierung, sowie bei der Einleitung der Apoptose beteiligt (37, 38). Mutationen im

RB-1-Gen oder in anderen Genen, deren Genprodukte das Retinoblastom-Protein inaktivieren, machen die entsprechenden Tumorzellen resistent gegen diese Kontrollmechanismen. Mutationen, die diesen Signalweg betreffen, wurden in beinahe allen Krebsarten nachgewiesen (39).

Für das unkontrollierte Wachstum von Krebszellen ist auch ihre Unsterblichkeit entscheidend. Diese beruht hauptsächlich auf zwei Mechanismen. Zum einen erwerben sie die Fähigkeit sich unbegrenzt zu teilen. Normale Zellen haben eine begrenzte Anzahl an Teilungen bevor sie in die Seneszenz eintreten, eine Phase, in der sie ihr Wachstum einstellen (40). Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass sich die Telomere, die Schutzkappen an den Enden der Chromosomen, mit jeder Zellteilung verkürzen (41). Um dies zu umgehen, nutzen Krebszellen Mechanismen zur Verlängerung der Telomere, beispielsweise durch eine gesteigerte Aktivität der Telomerase, eines Enzyms, das die Telomere verlängert, oder durch den ALT-Mechanismus (Alternative Lengthening of Telomeres) (12, 42, 43). Zum anderen erwerben Krebszellen eine Resistenz gegen die Apoptose. Dies geschieht durch Mutationen in Genen wie RB-1 (38), TP53 (18), BCL-2 und BAX (12, 44), die apoptotische Signalwege regulieren. Eine Überexpression von anti-apoptotischen Proteinen wie BCL-2 oder eine Inaktivierung von pro-apoptotischen Proteinen wie BAX kann Tumorzellen vor dem programmierten Zelltod schützen (12).

### **1.1.3 Angiogenese**

Angiogenese beschreibt den Prozess der Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Physiologisch ist sie unter anderem für die Embryonalentwicklung und die Wundheilung essenziell (45, 46). Gleichzeitig ist die Angiogenese ein Schlüsselfaktor in der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, beispielsweise chronischer Entzündungen wie rheumatoide Arthritis (47), der diabetischen Retinopathie (48) und von Krebs (49).

Die Angiogenese ist ein mehrstufiger Prozess, der durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) reguliert wird (50). Zunächst werden die Endothelzellen, die die Innenwände der Blutgefäße auskleiden, aktiviert. Dies geschieht häufig durch Hypoxie oder andere Stressfaktoren, die zur Freisetzung von proangiogenen Faktoren wie dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) führen (51). Dieser bindet an seine Rezeptoren auf den Endothelzellen und aktiviert Signalkaskaden, die zur Degradation der Basalmembran führen, die die Endothelzellen umgibt. Anschließend migrieren und proliferieren die Endothelzellen und bilden Kapillarschlingen, die zu neuen Blutgefäßen reifen. Dieser Prozess wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie VEGF, Fibroblast Growth Factor (FGF), Platelet-Derived-Growth-Factor (PDGF) und Angiopoietine reguliert (50).

VEGF ist der wichtigste proangiogene Faktor. Er spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Angiogenese, fördert die Proliferation, Migration und Differenzierung der Endothelzellen und erhöht die Permeabilität von Gefäßwänden (52, 53). FGF fördert die Migration und Proliferation von Endothelzellen, sowie die Bildung von extrazellulärer Matrix (54). PDGF unterstützt die Stabilisierung und Reifung der neu gebildeten Blutgefäße durch die Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen (55).

Andererseits gibt es auch antiangiogene Faktoren, wie Angiostatin, Plättchenfaktor 4 (PF4) und Thrombospondin (56, 57). Thrombospondin ist einer der am frühesten entdeckten

endogenen Angiogeneseinhibitoren. Es hemmt die Migration und Proliferation von Endothelzellen und fördert deren Apoptose (58).

Eine der am intensivsten untersuchten pathologischen Auswirkungen der Angiogenese ist ihre Beteiligung an der Tumorentwicklung. Tumore benötigen eine ausreichende Blutversorgung, um wachsen und metastasieren zu können. Hypoxie-induzierte Faktoren wie HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) stimulieren die Expression von VEGF und anderen proangiogenen Faktoren und fördern so die Bildung neuer Blutgefäße (59). Inhibitoren der Angiogenese, wie der anti-VEGF-Antikörper Bevacizumab, haben sich als wirksam bei der Behandlung verschiedener Krebsarten erwiesen, indem sie die Blutversorgung des Tumors reduzieren und somit sein Wachstum hemmen (60).

### **1.1.4 Fibrosarkome**

Mit dem Begriff "Krebs" werden weit über 100 verschiedene maligne Tumorarten beschrieben, die sich in ihren biologischen Eigenschaften sowie klinischen Parametern unterscheiden (61). Da sich diese Dissertation auf die Erforschung von Fibrosarkomen konzentriert, wird diese spezifische Tumorentität im Folgenden detaillierter beschrieben.

Fibrosarkome sind seltene, bösartige Tumore, die von Fibroblasten, Zellen des Bindegewebes, ausgehen. Diese meist hochmalignen Tumore zeichnen sich durch ihr aggressives Verhalten, hohe Rezidivraten und ein großes Metastasierungspotenzial aus (62). Sie betreffen hauptsächlich Erwachsene bei einem medianen Alter von ungefähr 50 Jahren, obwohl auch pädiatrische Fälle vorkommen können (63). Fibrosarkome können in jedem fibrösen Gewebe entstehen, einschließlich der Knochen, treten aber am häufigsten in den Weichteilen der Gliedmaßen, des Rumpfes, des Kopfes und des Nackens auf (64). Sie präsentieren sich typischerweise als schmerzlose, zunehmende Raumforderung im betroffenen Bereich. Mit zunehmendem Tumorwachstum können sie durch Kompression benachbarter Strukturen schließlich zu Schmerzen und Funktionsbeeinträchtigungen führen. In fortgeschrittenen Stadien können systemische Manifestationen wie Gewichtsverlust, Müdigkeit und Fieber auftreten (65, 66). Bei der Diagnostik des Fibrosarkoms kommen bildgebende Verfahren wie Magnetresonanztomographie (MRT) und Computertomographie (CT) zum Einsatz. Eine endgültige Diagnose wird durch eine Biopsie erreicht. Morphologisch bestehen Fibrosarkome aus relativ einheitlichen, spindelförmig-zugespitzten Zellen, die eine mäßige Variabilität in Größe und Form aufweisen. Die Zellen sind typischerweise in langen, bogenförmigen Bündeln angeordnet, die einem Fischgrätenmuster ähneln, oder weisen eine storiforme Anordnung auf (64). Die primäre Behandlung für ein lokalisiertes Fibrosarkom ist die chirurgische Resektion. Aufgrund des infiltrativen Wachstums dieser Tumore ist eine R0-Resektion, also eine vollständige Entfernung des Tumors bis ins gesunde Gewebe, oft schwierig und die Rückfallraten bleiben hoch. Aus diesem Grund wird häufig eine adjuvante Strahlentherapie durchgeführt, insbesondere bei Patienten mit hochgradigen Tumoren und Nachweis von Tumoranteilen in den Resektionsrändern (67).

## **1.2 Hämostase**

Die Blutstillung und -gerinnung, also die Hämostase, ist ein lebenswichtiger und komplexer Prozess, der den Organismus vor übermäßigem Blutverlust schützt. Dieser Prozess umfasst

einen präzise abgestimmten Ablauf von Mechanismen, die in zwei Hauptphasen unterteilt werden können: die primäre Hämostase und die sekundäre Hämostase.

Die primäre Hämostase, auch als zelluläre Gerinnung bekannt, stellt die initiale Phase der Blutstillung dar. Sie wird durch eine Blutgefäßverletzung eingeleitet und umfasst drei Schritte: Die Thrombozytenadhäsion, die Thrombozytenaktivierung und die Thrombozytenaggregation. Dabei entsteht ein vorläufiger Thrombozytenpfropf, der sogenannte weiße Thrombus, der den Endotheldefekt abdichtet und somit vor weiterem Blutverlust schützt (68).

Die sekundäre Hämostase, auch als plasmatische Gerinnung bekannt, stabilisiert den initialen Thrombozytenpfropf durch die Aktivierung bestimmter Plasmaproteine, der Gerinnungsfaktoren, in der sogenannten Gerinnungskaskade. Dieser Prozess wird durch eine kaskadenartige Aktivierung der Gerinnungsfaktoren initiiert und mündet in der Entstehung eines Fibrinnetzwerks, das zusammen mit Erythrozyten den roten Thrombus bildet. Dieser ist langfristig stabil und schützt vor erneuter Blutung (68, 69).

Nach Abschluss der Wundheilung erfolgt die Fibrinolyse, bei der der Fibrinthrombus durch die Serinprotease Plasmin abgebaut wird, um die Gefäßdurchgängigkeit und somit eine ungestörte Durchblutung zu gewährleisten bzw. wiederherzustellen (70).

Das heute etablierte Modell der Blutgerinnung wurde in seinen Grundzügen erstmals 1905 beschrieben. Paul Morowitz, ein deutscher Internist und Physiologe, schlug das "klassische" Modell der Blutgerinnung vor. In diesem Modell beschrieb er die Rolle von Thrombokinase, Calcium, Prothrombin und Fibrinogen in der Blutgerinnung als eine Serie enzymatischer Reaktionen, die zur Bildung eines stabilen Fibringerinnsels führen (71, 72). 60 Jahre später beschrieben Robert G. Macfarlane und Davie Ratnoff unabhängig voneinander die Blutgerinnung erstmals als Wasserfall- bzw. Kaskadenmodell mitsamt der spezifischen Enzyme und Faktoren, die an diesem Prozess beteiligt sind (73-75). Dieses Modell hat erheblich zum Verständnis der enzymatischen Aktivierung der Gerinnungsfaktoren beigetragen, erweist sich aber als unzureichend, um die Hämostase in vivo, also im lebenden Organismus, vollständig zu erklären (76). Mit fortschreitender Forschung wurde schließlich das zellbasierte Modell der Hämostase entwickelt, das besonders die Rolle von Zelloberflächen bei der Blutgerinnung betont (77-79).

### **1.2.1 Primäre Hämostase**

Die primäre Hämostase dient der schnellen Blutstillung bei Gefäßverletzungen durch Bildung eines vorläufigen Thrombozytenpfropfs an der Verletzungsstelle. Thrombozyten sind kleine, kernlose, scheibenförmige Zellen mit einer Lebensspanne von 5-10 Tagen, die aus Megakaryozyten im Knochenmark hervorgehen (80). In ihren Granula speichern sie eine Vielzahl von Proteinen und Molekülen, die für die Hämostase benötigt werden, etwa den von-Willebrand-Faktor (vWF), ADP,  $Ca^{2+}$ , Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII (81).

Unter normalen physiologischen Bedingungen adhären und aggregieren Thrombozyten im Blut nicht, was durch eine kontinuierliche Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin bedingt ist (82). Eine Schädigung des Endothels führt zur Exposition subendothelialer Matrixproteine wie Kollagen und ermöglicht die Thrombozytenadhäsion an der Verletzungsstelle. Diese Bindung wird hauptsächlich durch den vWF ermöglicht, der als Brücke zwischen den subendothelialen Kollagenfasern und dem Glykoproteinrezeptor-Komplex GPIb/IX/V auf den Thrombozyten fungiert (83). Darüber hinaus können

Thrombozyten mit ihren Rezeptoren GPIa/IIa und GPVI auch direkt an Kollagen binden (84, 85), oder mittels weiterer Rezeptoren mit anderen subendothelialen Proteinen wie Fibronectin (86), Laminin (87) und Vitronectin (88) interagieren.

Verschiedene Agonisten wie Kollagen, Adenosindiphosphat (ADP), Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin und Thrombin können die wandadhärenten Thrombozyten aktivieren, indem sie an spezifische Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche binden und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen (89). Aktivierte Thrombozyten sezernieren gerinnungsfördernde Mediatormoleküle wie vWF, ADP, Fibrinogen und Serotonin aus ihren Granula, wodurch weitere Thrombozyten im Sinne eines positiven Feedbacks rekrutiert und aktiviert werden (68).

Die Aktivierung führt zur Konversion des Fibrinogen-Rezeptors (GPIIb/IIIa) der Thrombozyten in eine aktive Form, was für die Thrombozytenaggregation entscheidend ist (89). Schließlich bildet sich ein Netzwerk, in dem Thrombozyten durch Fibrinogen-Brücken miteinander verbunden werden, der sogenannte weiße Thrombus. Zusätzlich durchlaufen aktivierte Thrombozyten eine Formänderung mit Ausbildung von Pseudopodien, was die Adhäsion an der Gefäßwand stärkt und die Aggregation fördert (68). Nach der Bildung des vorläufigen Thrombozytenpropfs wird dieser durch die sekundäre Hämostase stabilisiert.

## 1.2.2 Sekundäre Hämostase

Klassischerweise wird die sekundäre Hämostase als Gerinnungskaskade beschrieben. Die löslichen Gerinnungsfaktoren zirkulieren in ihrer inaktiven Form im Blut und werden schrittweise durch limitierte proteolytische Spaltung aktiviert. Dieser Prozess wird in einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg unterteilt, die beide in einer gemeinsamen Endstrecke münden. In diesem Prozess wird Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) aktiviert, das seinerseits Fibrinogen in Fibrin-Monomere spaltet. Diese bilden schließlich durch Quervernetzung ein stabiles Blutgerinnsel, den roten Thrombus.

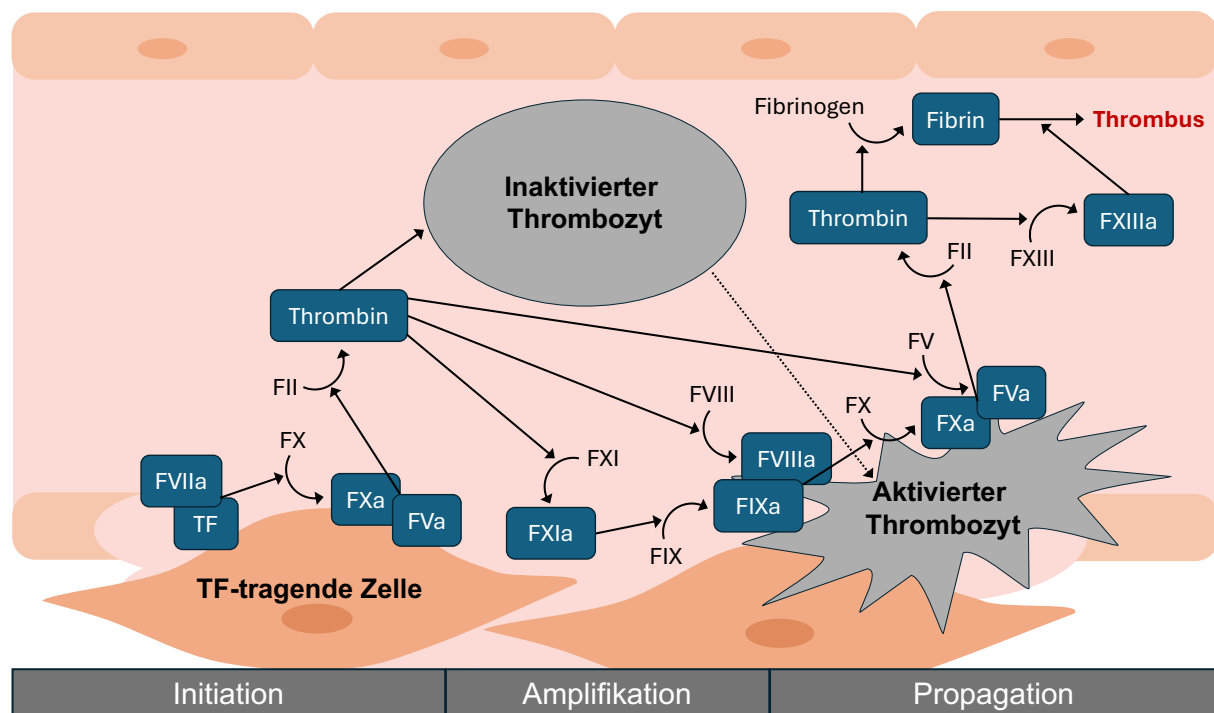
Gemäß dem zellbasierten Modell (siehe Abbildung 2), das eine umfassende Interaktion von Gerinnungsfaktoren und zellulären Oberflächen unter Einbeziehung von Calcium als Kofaktor beschreibt, lässt sich die sekundäre Hämostase in drei Hauptphasen unterteilen: Initiation, Amplifikation und Propagation (77).

Die Initiationsphase beginnt bei einer Gefäßverletzung mit der Exponierung von Tissue Factor (TF, FIII), einem Transmembranprotein, das auf subendothelialen Zellen wie Fibroblasten und Perizyten exprimiert wird (90, 91). Wenn Blut mit TF in Kontakt kommt, bildet TF an solchen Zellen einen Komplex mit aktiviertem Faktor VII (FVIIa). Faktor VII wird durch verschiedene Proteasen aktiviert, zirkuliert im Blut aber auch dauerhaft in kleinen Mengen in seiner bereits aktivierten Form (92, 93). Der TF-FVIIa-Komplex aktiviert die Faktoren IX (FIX) und X (FX). FXa aktiviert daraufhin Faktor V (FV) und bildet mit FVa an der Oberfläche der TF-tragenden Zelle den Prothrombinase-Komplex (94). Dieser wandelt Prothrombin durch proteolytische Spaltung in Thrombin um. Hierbei entstehen allerdings nur geringe Mengen an Thrombin, die für die Fibrinbildung noch nicht ausreichen. Dieser Aktivierungsablauf der Initiationsphase wird traditionell dem extrinsischen System zugeordnet.

Während der Amplifikationsphase werden die initialen prokoagulatorischen Mechanismen der primären und sekundären Hämostase verstärkt. Thrombin bindet über verschiedene Rezeptoren wie GPIIb/IX und Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) an Thrombozyten, die daraufhin degranulieren, ihre Form verändern und Phosphatidylserin-haltige Membranen exponieren (95-97). Diese Membranen dienen als Plattformen für die Bildung weiterer Gerinnungskomplexe. Thrombin aktiviert zudem die Faktoren V, VIII (FVIII) und XI (FXI) (77).

Nun beginnt mit der Propagation eine vermehrte Thrombingenerierung an der Oberfläche aktivierter Thrombozyten. FXIa verstärkt die Aktivierung von FIX, was zur Bildung des Tenase-Komplexes (FIXa-FVIIIa) führt, der große Mengen von FX in FXa umwandelt (98). Dieser Ablauf wird traditionell als intrinsischer Gerinnungsweg bezeichnet. Der nun in hoher Zahl anfallende Faktor Xa bildet zusammen mit FVa Prothrombinase-Komplexe an den Thrombozyten, die in erheblichem Maße Thrombin erzeugen (99).

Thrombin katalysiert die limitierte proteolytische Spaltung von Fibrinogen in Fibrin-Monomere. Durch Quervernetzung dieser Fibrin-Monomere über eine kovalente Bindung zwischen Glutamin- und Lysinresten, vermittelt durch den aktivierten Faktor XIII (FXIIIa), entsteht ein unlöslicher Fibrinthrombus (100).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der zellbasierten Hämostase**

Das zellbasierte Modell der sekundären Hämostase umfasst drei Hauptphasen: Initiation, Amplifikation und Propagation. Während der Initiationsphase, die durch die Exposition von Tissue Factor (TF) auf subendothelialen Zellen ausgelöst wird, werden kleine Mengen Thrombin gebildet. In der Amplifikationsphase aktiviert Thrombin Thrombozyten sowie weitere Gerinnungsfaktoren. Dies führt in der Propagationsphase zu einer erheblichen Thrombinproduktion an der Oberfläche der Thrombozyten und letztlich durch Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin zur Bildung des Fibrinthrombus.

### 1.2.3 Regulation der Hämostase

Die Hämostase unterliegt einem Gleichgewicht zwischen prokoagulatorischen und antikoagulatorischen Mechanismen, um übermäßige Gerinnung sowie gesteigerte Blutungsneigung zu verhindern. Zu den wichtigsten antikoagulatorischen Mechanismen zählen die Funktionen des Endothels, natürliche Antikoagulantien und das Fibrinolyse-System.

Das Endothel spielt eine zentrale Rolle in der Hämostase. Unter normalen Bedingungen verhindert es die Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation durch die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) sowie den Abbau von ADP mittels der Ectonukleotidase CD39 (101, 102). Zusätzlich fungieren Endothelzellen als Wirkort für natürliche Antikoagulantien und sezernieren einige davon selbst (siehe Abbildung 3).

Zu den natürlichen Antikoagulantien gehören unter anderem Protein C, Protein S, Antithrombin und der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI). Protein C zirkuliert im Blut in seiner inaktiven Form. Thrombin bindet an Thrombomodulin, einen Transmembranrezeptor von Endothelzellen, wodurch eine Konformationsänderung stattfindet, die es Thrombin ermöglicht, Protein C in aktiviertes Protein C (APC) umzuwandeln (103). APC inaktiviert die aktivierten Faktoren Va und VIIIa und hemmt somit die Hämostase. Protein S dient dabei als Kofaktor für APC und verstärkt dessen antikoagulatorische Wirkung (104).

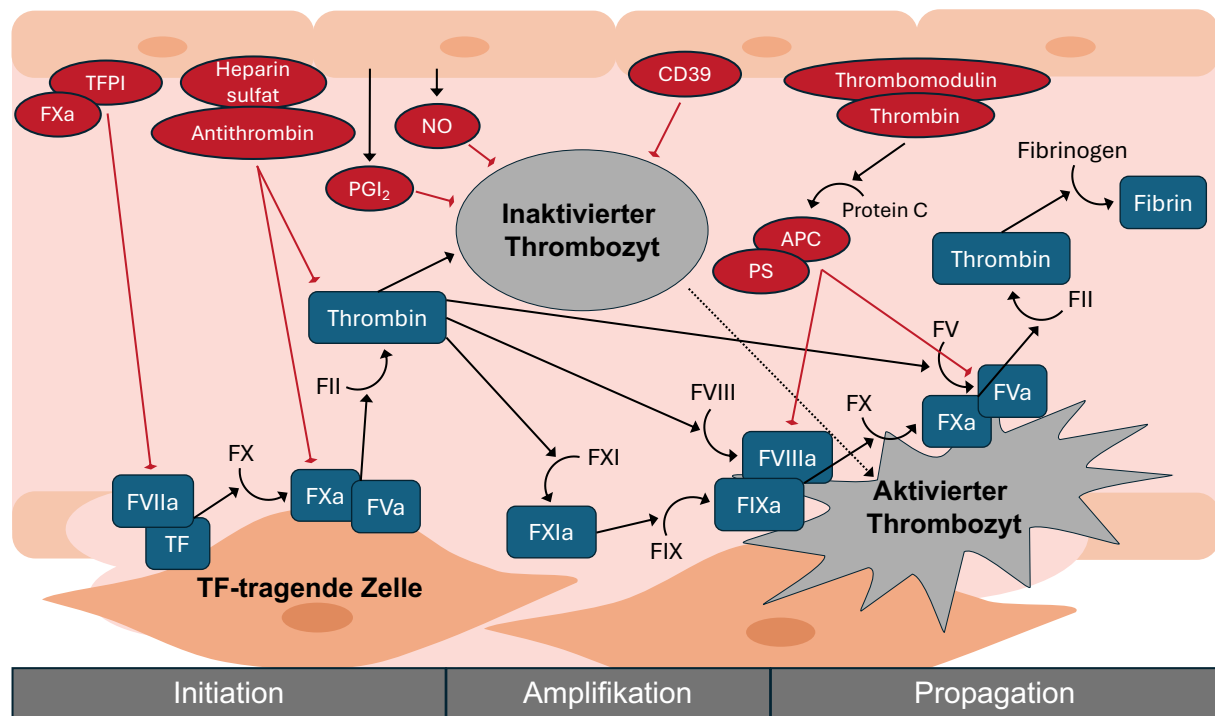
Antithrombin ist ein Serinprotease-Inhibitor, der Thrombin und Faktor Xa sowie in geringerem Ausmaß die Faktoren IXa, XIa und XIIa hemmt. Heparin und heparin-ähnliche Moleküle, die von Endothelzellen freigesetzt werden, können die antikoagulatorische Wirkung von Antithrombin erheblich verstärken (105).

Ein weiteres wichtiges Antikoagulans ist TFPI. Es kommt unter anderem an Endothelzellen vor und hemmt die Initiationsphase der Hämostase. TFPI bildet einen Komplex mit FXa, der den TF-FVIIa-Komplex inhibiert und somit die Prothrombinase-Bildung unterdrückt (106, 107).

Neben der Hemmung der Hämostase und somit der Thrombusbildung können auch bereits gebildete Blutgerinnsel abgebaut werden. Dieser Prozess, die Fibrinolyse, gewährleistet durch die Auflösung von Thromben nach abgeschlossener Wundheilung die Wiederherstellung eines normalen Blutflusses (70). Hierbei ist Plasmin entscheidend. Es wird aus seiner Vorstufe, Plasminogen, durch die Aktivatoren t-PA (Gewebe-Plasminogen-Aktivator) und u-PA (Urokinase-Plasminogen-Aktivator) aktiviert und spaltet Fibrin aus dem Thrombus in lösliche Peptidfragmente, die D-Dimere (108).

Die Fibrinolyse kann durch Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI), insbesondere PAI-1 und PAI-2, sowie durch den Plasmininhibitor  $\alpha_2$ -Antiplasmin gehemmt werden (109). Thrombin reguliert ebenfalls die Fibrinolyse. In einem Komplex mit Thrombomodulin aktiviert Thrombin den Thrombin-aktivierbaren-Fibrinolyseinhibitor (TAFI), der sowohl die Bildung als auch die Aktivität von Plasmin verringert (99, 110).

Störungen in den regulatorischen Mechanismen können schwerwiegende klinischen Zustände verursachen. Ein Mangel oder Defekt von Antithrombin, Protein C und Protein S, sowie eine unzureichende Fibrinolyse können zu einer erhöhten Thromboseneigung führen (110). Ebenso kann eine übermäßige Fibrinolyse und ein Mangel an Gerinnungsfaktoren, wie bei der Hämophilie, zu einer erhöhten Blutungsneigung führen.



**Abbildung 3: Regulation der Hämostase - Endothelfunktion und natürliche Antikoagulantien**

Gesunde Endothelzellen hemmen die Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation durch Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) sowie den Abbau von ADP mittels CD39. Thrombin aktiviert nach Konformationsänderung durch Thrombomodulin Protein C. APC hemmt zusammen mit Protein S (PS) die Faktoren Va und VIIIa. Antithrombin hemmt Thrombin und Faktor Xa. Diese Wirkung wird durch Heparin und heparin-ähnliche Moleküle verstärkt. TFPI bindet FXa und hemmt den TF-FVIIa-Komplex.

### 1.3 Prothrombin und Thrombin

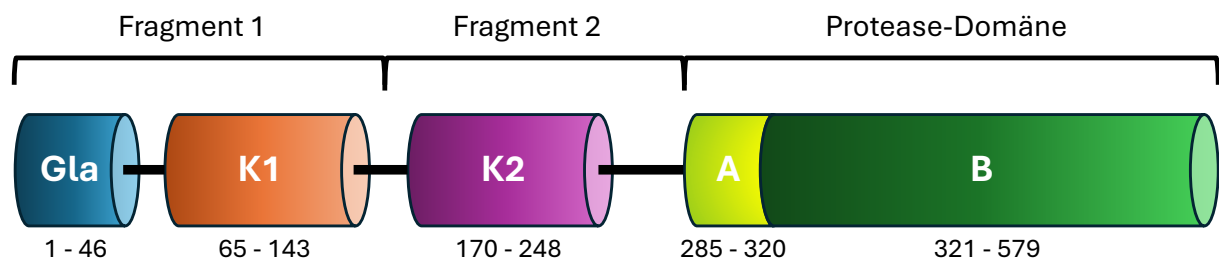
Thrombin, auch als Gerinnungsfaktor IIa bekannt, gehört zu den Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren und gilt als Hauptakteur der Gerinnungskaskade. Prothrombin, die Enzymvorstufe von Thrombin, auch Zymogen genannt, wird hauptsächlich in der Leber exprimiert. Zahlreiche Regulationsmechanismen steuern die Expression von Prothrombin, um sowohl eine übermäßige als auch eine unzureichende Synthese zu verhindern und so das Risiko von Blutungen oder Thrombosen zu minimieren. Nach seiner Expression und Synthese in der Leber wird Prothrombin in das Blutplasma freigesetzt, wo es durch spezifische Aktivierungsmechanismen in seine aktive Form, Thrombin, umgewandelt wird. Neben seiner proteolytischen Funktion in der Hämostase wirkt Thrombin auch als Signalmolekül für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Auf diese Weise kann es verschiedene physiologische und pathologische Prozesse beeinflussen (siehe Kapitel 1.3.5 und Kapitel 1.4).

#### 1.3.1 Molekulare Struktur von Prothrombin

Prothrombin ist ein Glykoprotein mit einer molekularen Masse von 72.000 Dalton und besteht aus 579 Aminosäuren, die in mehrere funktionelle Domänen unterteilt sind: die Gla-Domäne (Reste 1 - 46), Kringle 1 (kringle-1, Reste 65 - 143), Kringle 2 (kringle-2, Reste 170 - 248) und die Protease-Domäne (Reste 285 - 579), die wiederum in eine A Kette (Reste 285 - 320) und eine B Kette (Reste 321 - 579) unterteilt ist (siehe Abbildung 4) (111).

Die Gla-Domäne befindet sich am N-terminalen Ende von Prothrombin und enthält  $\gamma$ -Carboxyglutamat-Reste. Diese ermöglichen die Bindung von Calciumionen, was für die Bindung an Phospholipidmembranen und die anschließende Aktivierung durch den Prothrombinase-Komplex notwendig ist (112). Die beiden Kringel-Domänen tragen zur Aktivierung und Stabilisierung von Prothrombin bei, indem sie spezifische Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen und konformationelle Änderungen fördern (113, 114). Der C-terminale Teil von Prothrombin ist die Protease-Domäne, die nach der Aktivierung Thrombin bildet. Diese Domäne enthält die katalytische Triade bestehend aus Histidin, Aspartat und Serin, die für die proteolytische Aktivität notwendig ist (115).

Prothrombin existiert in zwei verschiedenen Konformationen: einem offenen und einem geschlossenen Zustand. Der geschlossene Zustand ist die dominante Form, in der etwa 70% des Prothrombins vorliegen. Durch intramolekulare Wechselwirkung zwischen Tyr93 in Kringel 1 und Trp547 in der Protease-Domäne wird das aktive Zentrum blockiert und so die autokatalytische Umwandlung in Thrombin gehemmt (116).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von Prothrombin**

Prothrombin besteht aus 579 Aminosäuren und wird in mehrere funktionelle Domänen unterteilt: die Gla-Domäne (Reste 1-46), Kringel 1 (Reste 65-143), Kringel 2 (Reste 170-248) und die Protease-Domäne (Reste 285-579), die weiter in eine A-Kette (Reste 285-320) und eine B-Kette (Reste 321-579) unterteilt ist. Fragment 1 beinhaltet die Gla-Domäne und Kringel 1, während Fragment 2 Kringel 2 enthält. Abbildung in Anlehnung an Pozzi et al., 2013 (117)

### 1.3.2 Das Prothrombin-Gen und seine Expression

Das Prothrombin-Gen ist beim Menschen (*Homo sapiens*) auf Chromosom 11 (11p11.2) lokalisiert (118). Es umfasst 20,3 Kilobasen (kb) und besteht aus 14 Exons und 13 Introns (118, 119). Die Exons kodieren für die verschiedenen Domänen des Prothrombin-Proteins, während die Introns nicht-kodierende Sequenzen darstellen und ca. 90% des gesamten Gens ausmachen (119).

Die Expression des Prothrombin-Gens wird auf mehreren Ebenen reguliert, einschließlich der Transkription und posttranskriptionaler Modifikationen. Auf der Ebene der Transkription wird die Expression von F2 durch spezifische Transkriptionsfaktoren gesteuert, die an regulatorische Elemente, sogenannte Enhancer und Silencer, des Gens binden. Hierzu zählen HNF-4 (Hepatocyte Nuclear Factor 4), HNF3-beta (FOXA2), Sp1 (specificity protein 1) und Sp3 (specificity protein 3), die durch Bindung an den Prothrombin-Enhancer eine erhöhte Genexpression bewirken können (120).

Posttranskriptional kann die Genexpression von Prothrombin beispielsweise durch die Regulation der 3'-Prozessierung mittels der p38 MAPK (p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase)

beeinflusst werden. Externe Stimuli wie Entzündungen aktivieren p38 MAPK, die in der Folge die RNA-bindenden Proteine FBP2 und FBP3 phosphoryliert. Die Phosphorylierung inaktiviert diese Proteine, was die 3'-Prozessierung der mRNA erleichtert. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität der mRNA und somit zu einer gesteigerten Prothrombin-Translation (121).

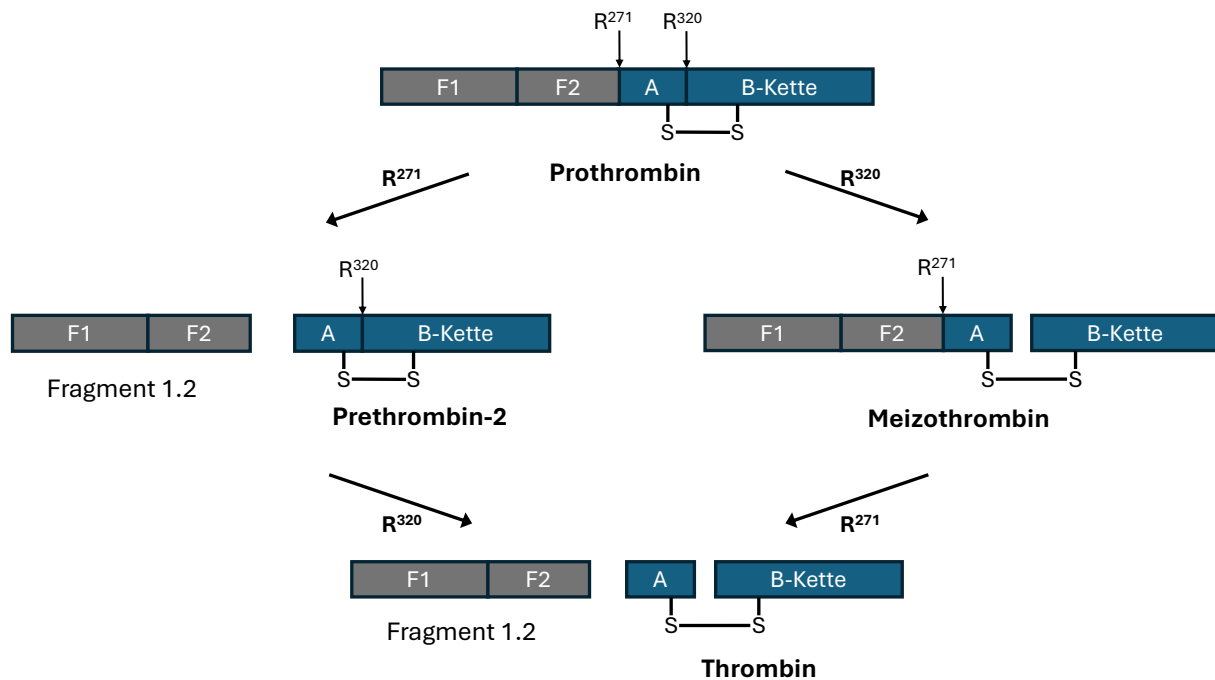
Eine Dysregulation der F2-Expression kann sowohl zu thrombotischen als auch zu hämorrhagischen Störungen führen. Ein bekanntes Beispiel ist die Prothrombin-Mutation G20210A, die mit einem erhöhten Risiko für Thromboembolien einhergeht (122). Diese "Gain of Function"-Mutation führt zu einer erhöhten Stabilität der F2-mRNA und somit zu einer erhöhten Prothrombinproduktion (123). Umgekehrt können Hypoprothrombinämien, also Mutationen, die die F2-Expression reduzieren, zu Gerinnungsstörungen mit teilweise schweren Blutungen führen (124).

### 1.3.3 Posttranslationale Modifikation und Aktivierung zu Thrombin

Nach der Proteinbiosynthese wird Prothrombin posttranslational modifiziert, was für seine Umwandlung zu Thrombin unerlässlich ist. Die wichtigste posttranslationale Modifikation ist die  $\gamma$ -Carboxylierung von Glutaminsäureresten in der Gla-Domäne. Dieser Prozess ist Vitamin K-abhängig und wird durch das Enzym  $\gamma$ -Glutamylcarboxylase vermittelt (125). Durch die  $\gamma$ -Carboxylierung entstehen  $\gamma$ -Carboxyglutamat-Reste, die Calciumionen binden. Diese Bindung wiederum ist essenziell für die Bindung von Prothrombin an Phospholipidmembranen und somit für seine Aktivierung durch den Prothrombinase-Komplex (112).

Der Prothrombinase-Komplex bildet sich aus Faktor Xa und Faktor Va an Phospholipidmembranen in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  (126, 127). Die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin geschieht durch Spaltung an zwei spezifischen Stellen (siehe Abbildung 5). Die Spaltung an Arginin 271 ( $\text{R}^{271}$ ) entfernt Fragment 1, das die Gla-Domäne und Kringel 1 enthält, und Fragment 2, das Kringel 2 enthält. Die Spaltung an Arginin 320 ( $\text{R}^{320}$ ) trennt die A-Kette von der B-Kette der Proteasedomäne, die aber durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (128).

Die Reihenfolge dieser Spaltungen kann variieren und führt zur Bildung verschiedener Zwischenprodukte, dem Prethrombin-2 und dem Meizothrombin. Hierfür ist die Konformation von Prothrombin (siehe Kapitel 1.3.1) ausschlaggebend. Die geschlossene Form von Prothrombin fördert die Spaltung an Arginin 320 und initiiert die Aktivierung entlang des Meizothrombin-Wegs, während die offene Form die Spaltung an Arginin 271 fördert und die Aktivierung entlang des alternativen Prethrombin-2-Weges startet (111, 114).



**Abbildung 5: Aktivierung von Prothrombin**

Die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin erfolgt durch Spaltungen an Arginin 271 ( $R^{271}$ ) und Arginin 320 ( $R^{320}$ ) durch den Prothrombinase-Komplex entlang des Prethrombin-2-Weges oder des Meizothrombin Weges. Durch die Spaltung an ( $R^{271}$ ) werden die Fragmente 1 und 2 entfernt. Die Spaltung an ( $R^{320}$ ) trennt die A-Kette von der B-Kette der Proteasedomäne, die durch eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Abbildung in Anlehnung an Wood et al., 2011 (128)

### 1.3.4 Die Serinprotease Thrombin

Serinproteasen sind durch einen Serinrest im katalytischen Zentrum charakterisiert. Bei Thrombin bildet der Serinrest (Ser-195) zusammen mit Histidin (His-57) und Aspartat (Asp-102) die katalytische Triade im aktiven Zentrum der B-Kette, die die Proteolyse von Proteinen und Peptiden katalysiert (115). Thrombin verfügt über mehrere positiv geladene Bindungsstellen, sogenannte Exosites, die zur Erkennung und Bindung spezifischer Substrate, Kofaktoren und Inhibitoren dienen (129). So interagiert Thrombin beispielsweise über die Exosite I mit Fibrinogen und Thrombomodulin, während Exosite II die thrombininduzierte Thrombozytenaktivierung und die Bindung von Heparin vermittelt (130-134).

Thrombin kann seine biologischen Eigenschaften in Abhängigkeit der gebundenen Liganden erheblich verändern, ein Prozess, der als allosterische Regulation bezeichnet wird. Diese Regulation bewirkt eine Konformationsänderung von Thrombin, die dessen Enzymaktivität moduliert (135). Beispielsweise induziert die Bindung von Natrium eine strukturelle Veränderung des aktiven Zentrums und der Exosites in die sogenannte "schnelle Form" von Thrombin (136). In dieser Konformation zeigt Thrombin eine erhöhte Affinität zu prokoagulatorischen Substraten wie Fibrinogen und Faktor V (137, 138). Im Gegensatz dazu führt die Bindung von Thrombomodulin zu einer Konformationsänderung, die eine erhöhte Affinität zu Protein C zur Folge hat und somit die antikoagulatorische Wirkung von Thrombin fördert (139). Durch die Modulation der Thrombinaktivität kann der Körper flexibel auf veränderte physiologische Bedingungen reagieren und die Balance in der Blutgerinnung aufrechterhalten.

### **1.3.5 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs)**

Neben seiner proteolytischen Funktion vermittelt Thrombin auch vielfältige zelluläre Wirkungen, wie beispielsweise die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (siehe Kapitel 1.2.1 und 1.2.2), indem es als Signalmolekül für Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) fungiert (140). PARs sind eine Familie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs), die durch Serinproteasen, insbesondere Thrombin, aktiviert werden. Bis heute wurden vier PARs identifiziert: PAR-1, PAR-2, PAR-3 und PAR-4. Thrombin aktiviert hauptsächlich PAR-1 (141), PAR-3 (142) und PAR-4 (143), während PAR-2 überwiegend durch andere Proteasen wie Trypsin aktiviert wird (144).

Der Aktivierungsprozess variiert zwischen den verschiedenen PARs und wird hier am Beispiel von PAR-1 erläutert (145). Zunächst erfolgt eine proteolytische Spaltung der extrazellulären N-terminalen Domäne des Rezeptors. Durch diese Spaltung wird ein neues N-terminales Ende erzeugt, das als intramolekularer Ligand fungiert und an die extrazelluläre Schleife des Rezeptors bindet (141). Diese Bindung bewirkt eine Konformationsänderung, die zur Aktivierung des Rezeptors führt (145). Der aktivierte Rezeptor bindet an heterotrimere G-Proteine, was verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden auslöst.

Zu den wichtigsten Signalwegen gehört der Phospholipase C (PLC)-Signalweg, der zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerin (DAG) führt, wodurch Calciumionen freigesetzt und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert werden (140). PKC aktiviert wiederum weitere Signalkaskaden wie den MAPK/ERK-Signalweg. Dieser ist durch Phosphorylierung und Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) an Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (146).

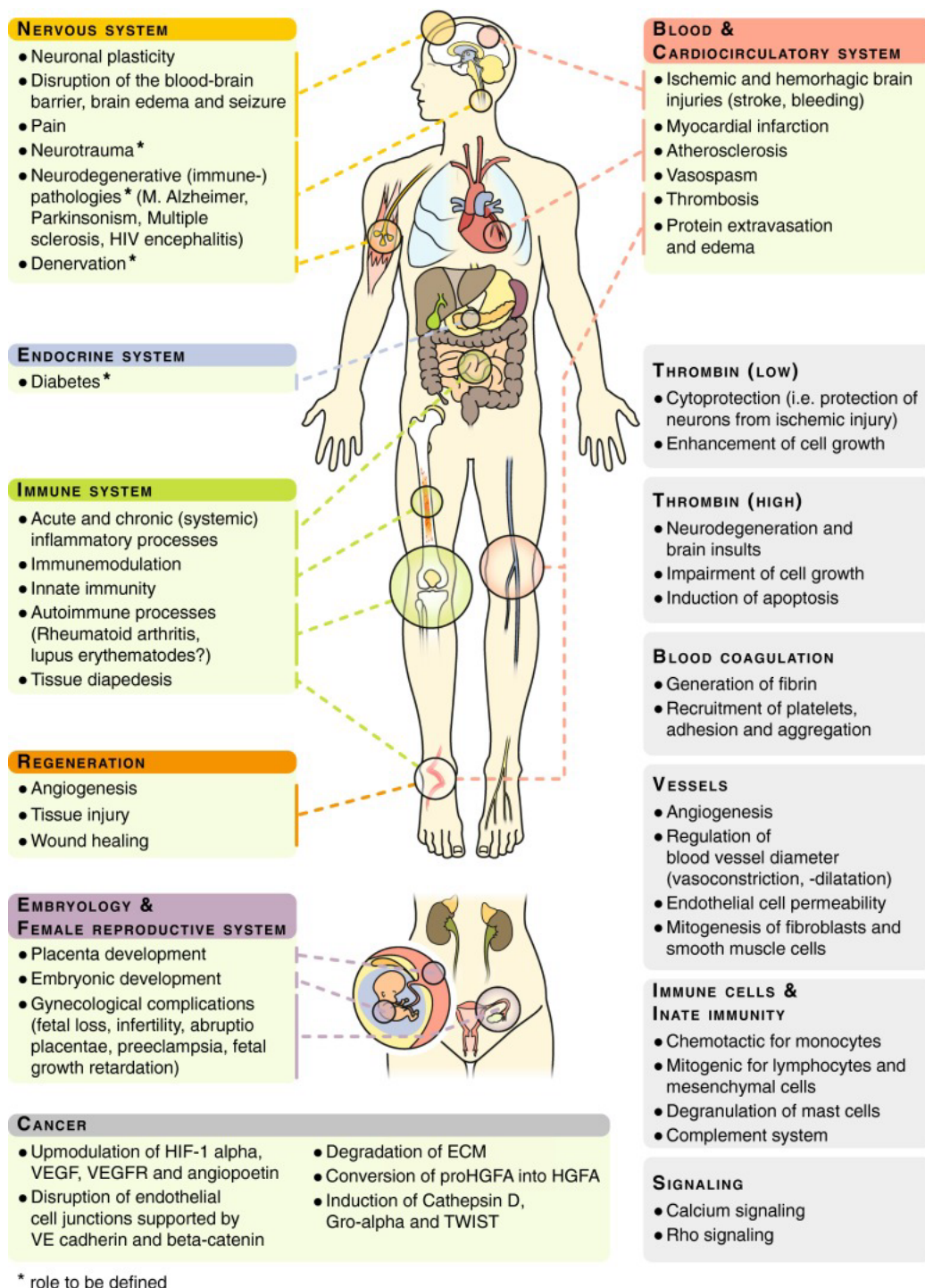
Über diese und weitere Signalwege hat Thrombin vielfältige physiologische und pathophysiologische Auswirkungen. Neben der Förderung der Hämostase ist Thrombin durch die Aktivierung der PARs an Entzündungsreaktionen, Embryonalentwicklung, Wundheilung, Tumorprogression und vielen weiteren Prozessen beteiligt (siehe Kapitel 1.4) (147).

## **1.4 Funktionelle Rolle von Thrombin jenseits der Hämostase**

Thrombin wurde traditionell hauptsächlich als Schlüsselkomponente der Blutgerinnung betrachtet. In den letzten Jahrzehnten hat sich jedoch das Verständnis von Thrombin erheblich erweitert, da immer mehr nicht-hämostatische Funktionen dieses Enzyms entdeckt wurden (siehe Abbildung 6). Besonders die Erforschung der Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs) hat zahlreiche weitere Funktionen von Thrombin offenbart. Durch die Aktivierung der PARs beeinflusst Thrombin zelluläre Prozesse wie Proliferation, Zellteilung, Differenzierung, Motilität und Apoptose verschiedener Gewebe (148-151). Es spielt eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl physiologischer Prozesse, etwa der Embryonalentwicklung (152-154), Angiogenese (155, 156), Organregeneration (157) sowie Funktionen des Nervensystems (158, 159) und des Immunsystems (160, 161). Darüber hinaus ist Thrombin an zahlreichen pathologischen Prozessen beteiligt, einschließlich Entzündungsreaktionen (162) und der Tumorbilogie (163, 164).

Die Erforschung der Prothrombin-Synthese hat ebenfalls bedeutende Erkenntnisse geliefert. Prothrombin wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, doch neuere Studien zeigen, dass es auch in anderen Körperregionen exprimiert wird. Es konnte eine Expression von Prothrombin in verschiedenen Organen und Geweben nachgewiesen werden, unter anderem im

Nervensystem (165, 166), in Knochen (167), in der Niere (168), in verschiedenen Tumoren (169-171) sowie in einigen weiteren Organen während der Embryonalentwicklung (119, 172). Diese weitreichende Expression von Prothrombin legt eine Bedeutung in diversen physiologischen und pathologischen Prozessen außerhalb der Hämostase nahe.



**Abbildung 6: Funktionelle Rolle von Thrombin in Physiologie und Pathologie**

Neben seiner Rolle als Schlüsselkomponente in der Hämostase ist Thrombin an zahlreichen weiteren physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Unter anderem an der Embryonalentwicklung, Angiogenese, Organregeneration, Funktionen des Nervensystems und des Immunsystems, Entzündungsreaktionen und der Tumorbologie. Abbildung aus Danckwardt et al., 2013 (163).

### 1.4.1 Thrombin in der Immunologie und der Inflammation

Das Gerinnungssystem und das Immunsystem sind sowohl evolutionär als auch funktionell eng miteinander verknüpft (173, 174). Während Immunzellen etwa durch Expression von Gerinnungsfaktoren wie dem Tissue Factor die Hämostase beeinflussen, können Gerinnungsfaktoren ihrerseits Zellen des Immunsystems aktivieren, deren Funktionen regulieren und proinflammatorische Zytokine freisetzen (175-177). Thrombin ist hierbei sowohl in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr, als auch in entzündlichen Prozessen vielfältig involviert (163).

Thrombin spielt eine entscheidende Rolle bei der Immunthrombose, einem Mechanismus der angeborenen Immunabwehr, bei dem thrombosefördernde Moleküle und Immunzellen physiologische Thromben innerhalb kleiner Blutgefäße bilden. Dieser Prozess trägt dazu bei, Pathogene zu erkennen, einzudämmen und zu eliminieren (178). Darüber hinaus interagiert Thrombin auch direkt mit verschiedenen Immunzellen, einschließlich Makrophagen (179), neutrophilen Granulozyten (180), dendritischen Zellen (181) und Lymphozyten (182, 183). Diese Interaktionen erfolgen hauptsächlich über Protease-aktivierte Rezeptoren, die auf vielen Immunzellen exprimiert werden und deren Proliferation, Chemotaxis und Aktivierung fördern (184). Thrombin aktiviert auch die Faktoren C3 und C5 des Komplementsystems, das einen wesentlichen Bestandteil der angeborenen Immunabwehr darstellt (185). Durch die Aktivierung von C5 werden die verschiedenen Aktivierungswege des Komplementsystems umgangen und eine rasche Immunantwort eingeleitet (186). Diese umfasst die Induktion lokaler Entzündungsreaktionen, die Opsonierung von Pathogenen, sowie deren Zerstörung durch den Membranangriffskomplex (187).

Durch seine vielfältigen Einflüsse auf das Immunsystem ist Thrombin auch eng mit der (Patho-) Physiologie akuter und chronischer Entzündungsreaktionen verknüpft. Thrombin induziert die Freisetzung zahlreicher Chemokine und Zytokine, darunter TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) (188), IL-1 $\alpha$  (161) sowie vieler weiterer Interleukine (189-191). Dies bewirkt die Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen am Ort der Entzündung. Darüber hinaus aktiviert Thrombin die Bildung von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf Endothelzellen und erleichtert so die Leukozytenmigration in das entzündete Gewebe (192, 193). Thrombin kann aber auch eine autokrine Schleife der endothelialen Aktivierung durch Produktion von IL-6 und MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) auslösen, was zur Umwandlung einer akuten in eine chronische Entzündung beitragen kann (194).

Durch Thrombin stimulierte überschießende Entzündungsreaktionen sind an der Pathogenese verschiedener chronischer Erkrankungen beteiligt, etwa an Atherosklerose (195), rheumatoider Arthritis und einigen neurologischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Alzheimer, Parkinson und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (196-198). Beispielsweise fördert Thrombin in der rheumatoiden Arthritis die Freisetzung von IL-6 und anderen proinflammatorischen Zytokinen durch Synovialzellen, wodurch es zu den Gelenkentzündungen beiträgt (199, 200).

Darüber hinaus hat der Einfluss von Thrombin auf das Immunsystem und die Inflammation auch Auswirkungen auf Tumore. Beispielsweise fördert Thrombin durch Stimulation der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$  und MCP-1 die Rekrutierung von myeloiden Suppressorzellen (MDSCs), M2-artigen Makrophagen und regulatorischen T-Zellen (Tregs), die die Immunüberwachung unterdrücken und somit die Tumorprogression begünstigen (201). Zusätzlich induziert Thrombin die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1) durch die Spaltung von GARP (glycoprotein A repetitions predominant) auf

der Oberfläche von Thrombozyten (202). TGF- $\beta$ 1 ist ein immunsuppressives Zytokin, das durch Hemmung der Funktion von natürlichen Killerzellen ebenfalls zur Umgehung der tumoralen Immunüberwachung beiträgt (203).

### 1.4.2 Thrombin in der Tumorbiologie

Ein klinischer Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und Krebserkrankungen ist schon seit dem 19. Jahrhundert bekannt und wurde erstmals von dem französischen Arzt Armand Trousseau beschrieben (204). Als Trousseau-Syndrom wird das Auftreten von Thrombosen, insbesondere der venösen Thromboembolien, im Rahmen einer Tumorerkrankung bezeichnet (205). Während man früher in diesem Kontext einen hyperkoagulatorischen Zustand mit der Entwicklung von Thrombosen lediglich als Folge einer Tumorerkrankung, also als paraneoplastisches Syndrom ansah (205, 206), weiß man heute, dass das Blutgerinnungssystem umgekehrt auch zur Tumorprogression beiträgt (207, 208). So bewirkt eine pathologische Aktivierung der Blutgerinnung durch Krebszellen eine gesteigerte Proliferation sowie ein erhöhtes Invasions- und Metastasierungspotenzial dieser Zellen (209). Dies wird auch dadurch verdeutlicht, dass eine Hemmung der Blutgerinnung nicht nur die Häufigkeit von Thrombosen reduziert, sondern auch das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren, vielleicht sogar deren Entstehung einschränken kann (210-212).

Thrombin spielt eine entscheidende Rolle bei der Beeinflussung verschiedener "Hallmarks" von Tumoren (siehe Kapitel 1.1). Dies beruht zum einen darauf, dass Thrombin zur Bildung eines tumorfördernden Mikromilieus beiträgt. Die Thrombin-induzierte Aktivierung von Immunzellen, Thrombozyten und Endothelzellen sowie die damit verbundene Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen fördert die Entstehung einer Umgebung, die die Proliferation, Angiogenese, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen unterstützt (163, 164, 201, 213-215).

Des Weiteren wirkt Thrombin auch direkt auf verschiedene Tumorzellen, indem es Protease-aktivierte Rezeptoren aktiviert (216). Es fungiert als Wachstumsfaktor, der die Proliferation von Tumorzellen mittels der MAPK/ERK-Kaskade durch Aktivierung von PAR-1 anregt (148). Zudem fördert Thrombin die Zellzyklusprogression durch Hemmung von p27Kip1 und Induktion von Cyclin D1, Cyclin A und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs), was wiederum die Proliferation und somit das Tumorwachstum weiter begünstigt (217, 218).

Thrombin steigert die Motilität von Tumorzellen und fördert deren Adhäsion an Thrombozyten, Endothelzellen und subendotheliale Matrixproteine, was die Tumorzellinvasion und Metastasierung unterstützt (164, 219, 220). Es induziert zudem die Expression von Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9), was den Abbau der extrazellulären Matrix bewirkt und so die Invasion und Metastasierung des Tumors fördert (221).

Auch die Angiogenese in Tumoren wird durch Thrombin stimuliert, und das auf mehreren Wegen. Thrombin fördert die Ausschüttung der vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF (156) und Angiopoietin-1 (222) aus Thrombozyten, sowie Angiopoietin-2 (223), MMP-1 und MMP-2 aus Endothelzellen (224). Aber auch Krebszellen können durch Thrombin-Stimulation VEGF sekretieren (225, 226). Thrombin induziert zudem die Expression der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und KDR auf Endothelzellen (227) und aktiviert Thrombozyten, die ihrerseits Wachstumsfaktoren freisetzen und die Angiogenese weiter fördern (228, 229). Darüber hinaus stimuliert Thrombin in Tumoren die Sekretion von GRO- $\alpha$  (Growth Regulated Oncogene

alpha), einem Chemokin, das durch Bindung an den CXCR2-Rezeptor das Wachstum, die Angiogenese und die Metastasierung von Tumorzellen fördert (230, 231).

## 1.5 Ziel der Dissertation

Thrombin, eine Serinprotease mit zentraler Bedeutung für die Blutgerinnung, erfüllt neben seiner klassischen Rolle in der Hämostase zahlreiche weitere physiologische und pathologische Funktionen, einschließlich seiner Beteiligung an immunologischen Prozessen und Entzündungsreaktionen. In der Tumorbilogie wirkt Thrombin als wesentlicher Faktor, der entscheidend zur Förderung von Tumorwachstum, Angiogenese und Metastasierung beiträgt.

Prothrombin wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und synthetisiert, doch neuere Forschungen zeigen, dass es auch in anderen Geweben sowie in verschiedenen Tumoren produziert wird. Der spezielle Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Tumorbilogie und seine potenziellen Unterschiede zum Leber-produzierten Thrombin sind jedoch bislang nicht bekannt und erfordern weitere wissenschaftliche Untersuchungen.

Diese Arbeit zielt darauf ab, die Expression von Tumor-intrinsischem Prothrombin in Fibrosarkomen nachzuweisen und systematisch zu untersuchen, wie dieses Prothrombin die Hämostase, das Tumorwachstum und die Angiogenese beeinflusst. Zum Nachweis der Prothrombin-Expression in Tumorzellen wurde ein neues, im Labor von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt entwickeltes, genetisch modifiziertes Mausmodell namens "D-Insight" verwendet. Dieses Modell ermöglicht die Visualisierung von Prothrombin-exprimierenden Zellen mittels eines Lumineszenz-Reporters, der Firefly-Luciferase.

Durch anschließende funktionelle Vergleichsstudien von Fibrosarkomen mit unterdrückter und normaler Prothrombin-Expression, basierend auf einem weiteren genetisch modifizierten Mausmodell (F2KD-Maus), wurden die Auswirkungen des Tumor-intrinsischen Prothrombins auf die Tumorbilogie untersucht. Das F2KD-Mausmodell ermöglicht durch eine Doxycyclin-induzierbare RNA-Interferenz einen gezielten Knockdown des Prothrombin-Gens, was detaillierte Analysen der Rolle von Tumor-intrinsischem Prothrombin in der Tumorentwicklung erlaubt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller	Verwendung
<b>Zellkulturflaschen</b>	Zellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss rot 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One	Zellkultur
<b>Well-Platten</b>	Nuclon™ Delta Surface (6-, 12-, 24-, 48-, 96- Wells)	Thermo Fisher Scientific	Zellkultur
<b>Petrischale</b>	Nunc™ Petrischale, 10 cm, steril	Thermo Fisher Scientific	Zellkultur
<b>Kryoröhrchen</b>	Nunc™ Kryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Fisher Scientific	Zellkultur
<b>Falcons (Polypropylen-Röhrchen)</b>	Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One	Zellkultur
<b>Reaktionsgefäß</b>	Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf	unspezifisch
<b>Pipettenspitzen</b>	Spitzen mit und ohne Filter, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Biozym	unspezifisch
<b>Pasteurpipetten</b>	Pasteurpipetten ohne Wattestopfen 230 mm	Roth	Zellkultur
<b>Stabpipetten</b>	Cellstar® Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One	Zellkultur
<b>Zellsieb</b>	Zellsieb 40 µm	Corning	Zellkultur
<b>Kryoeinbettformen</b>	Tissue-Tek® Cryomold® 25 x 20 x 5 mm	Sakura	F2-RNA-FISH
<b>Adhäsionsobjektträger</b>	SuperFrost Plus™	Thermo Fisher Scientific	F2-RNA-FISH
<b>Hydrophober Barriere-Stift</b>	ImmEDGE™ Pen	Vector	F2-RNA-FISH
<b>Skalpell</b>	Feather Einmal-Skalpell, Fig. 11	Servoprax GmbH	Schwanzblutungszeit

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Hersteller	Verwendung
<b>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</b>	Gibco	Zellkultur
<b>Fötale Kälberserum (FBS)</b>	Gibco	Zellkultur
<b>Penicillin-Streptomycin 100x</b>	Gibco	Zellkultur
<b>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</b>	Gibco	Zellkultur
<b>Maisöl</b>	Sigma-Aldrich	Zellkultur
<b>RPMI 1640 Medium</b>	Gibco	Zellkultur

## 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	Verwendung
<b>Methylcholanthren (MCA)</b>	Sigma-Aldrich	Zellkultur
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Sigma-Aldrich	Zellkultur
<b>Trypsin-EDTA</b>	Sigma-Aldrich	Zellkultur
<b>Trypanblau</b>	Biochrom AG	Zellkultur
<b>Doxycyclin</b>	Sigma-Aldrich	Zellkultur
<b>PeqGold TriFast Lösung</b>	PeqLab	RNA-Isolierung
<b>Chloroform</b>	Sigma-Aldrich	RNA-Isolierung
<b>Isopropanol</b>	Sigma-Aldrich	RNA-Isolierung
<b>Glykogen (RNA-Grad)</b>	Thermo Fisher Scientific	RNA-Isolierung
<b>70%iges Ethanol (vergällt)</b>	Sigma-Aldrich	RNA-Isolierung
<b>RNAse freies Wasser</b>	Thermo Fisher Scientific	unspezifisch
<b>Oligo d(T) (16mer) Primer (0,5 µg/µl)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>dNTPs (10mM)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>5x RT-Buffer</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>DTT (0,1 µM)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>RiboLock RNAse Inhibitor (40U/µl)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese
<b>RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl)</b>	Thermo Fisher Scientific	cDNA-Synthese

Chemikalie / Reagenz	Hersteller	Verwendung
<b>SYBR green</b>	Thermo Fisher Scientific	qRT-PCR
<b>2x OneTaq Mix</b>	Thermo Fisher Scientific	qRT-PCR
<b>Isofluran</b>	Piramal Critical Care	Tierversuche
<b>Tissue-Tek® O.C.T. Compound</b>	Sakura	F2-RNA-FISH
<b>Befestigungsmedium</b>	Invitrogen	F2-RNA-FISH
<b>Ketamin</b>	Inresa Arzneimittel GmbH	Tierversuche
<b>Xylazin (Rompun 2%)</b>	Bayer	Tierversuche
<b>Natriumcitrat</b>	Sigma-Aldrich	Schwanzblutung
<b>VEGF 165 (20 µg/ml)</b>	PeptoTech	Angiogenese
<b>AngioSense 750EX</b>	PerkinElmer	Angiogenese
<b>Murines rekombinantes Thrombin</b>	Sigma-Aldrich	Angiogenese

## 2.1.4 Primer

Tabelle 4: Primer

Primer	Sequenz
<b>Col1A2 for</b>	GGCTCTGCAACACAAGGAGT
<b>Col1A2 rev</b>	GGCCCTTTCGTA CTGATCCC
<b>β-Aktin for</b>	GGCATCCTCACCCTGAAGTA
<b>β-Aktin rev</b>	GGGGTGTGAAGGTCTCAA

## 2.1.5 Geräte

Tabelle 5: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller	Verwendung
<b>Brutschrank</b>	CB150	Binder	Zellkultur
<b>Mikroskop</b>	Leica DMIL	Leica	Unspezifisch
<b>Sterilwerkbank</b>	HS18 NuAire Class II	Heraeus NuAire	Zellkultur
<b>Wasserbad</b>	SW23	Julabo	Zellkultur
<b>Pipettierhilfe</b>	Pipetus®	Hirschmann	Zellkultur
<b>Zentrifuge</b>	Rotina 420 R	Hettich	Unspezifisch
<b>Gefrierbehälter</b>	Mr. Frosty	Nalgene	Zellkultur
<b>Zählkammer</b>	Neubauer, Tiefe 0,1 mm	Marienfeld	Zellkultur

Gerät	Modell	Hersteller	Verwendung
<b>Vortex-Schüttler</b>	peqTWIST	PeqLab	Unspezifisch
<b>Elektrischer Homogenisierer</b>	TissueRuptor	Qiagen	RNA-Isolierung
<b>Nanodrop</b>	ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab	RNA-Isolierung
<b>Thermozykler</b>	Flex Cyclor	Analytic Jena AG	cDNA-Synthese
<b>PCR-Gerät</b>	CFX Connect™ Real-Time System	Bio-Rad	qRT-PCR
<b>Digitaler Messschieber</b>	KESSER® Digital Messschieber	Masko	Tumorvermessung
<b>Konfokalmikroskop</b>	Zeiss LSM 710 NLO	Carl Zeiss Microscopy GmbH	F2-RNA-FISH
<b>Gerinnungs-Analysator</b>	AMAX Destiny Plus	TRINITY BIOTECH PLC	Prothrombinzeit
<b>Bildgebungssystem</b>	IVIS Spectrum	PerkinElmer	In vivo Bildgebung

## 2.1.6 Software

Tabelle 6: Software

Software	Hersteller	Verwendung
<b>CFX Manager 3.1</b>	Bio-Rad	qRT-PCR
<b>Leica Application Suite 4.5</b>	Leica	Mikroskopische Bildgebung
<b>Living Image® 4.5.4</b>	PerkinElmer	In vivo Bildgebung
<b>ZEN (Zeiss LSM 710 NLO)</b>	Carl Zeiss Microscopy GmbH	F2-RNA-FISH - Bildgebung
<b>ImageJ 1.52a mit ThunderSTORM 1.3</b>	Wayne Rasband; Martin Ovesny et al.	F2-RNA-FISH - Quantifizierung
<b>Microsoft Excel</b>	Microsoft Corporation	Datenverarbeitung
<b>Microsoft Word</b>	Microsoft Corporation	Textverarbeitung
<b>ChatGPT</b>	OpenAI	Rechtschreibung und Grammatik (keine inhaltliche Nutzung)
<b>GraphPad Prism 9, 10</b>	Graphpad Software	Statistik, Abbildungen
<b>EndNote 20, 21</b>	Clarivate Analytics	Literaturverzeichnis

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiermodelle

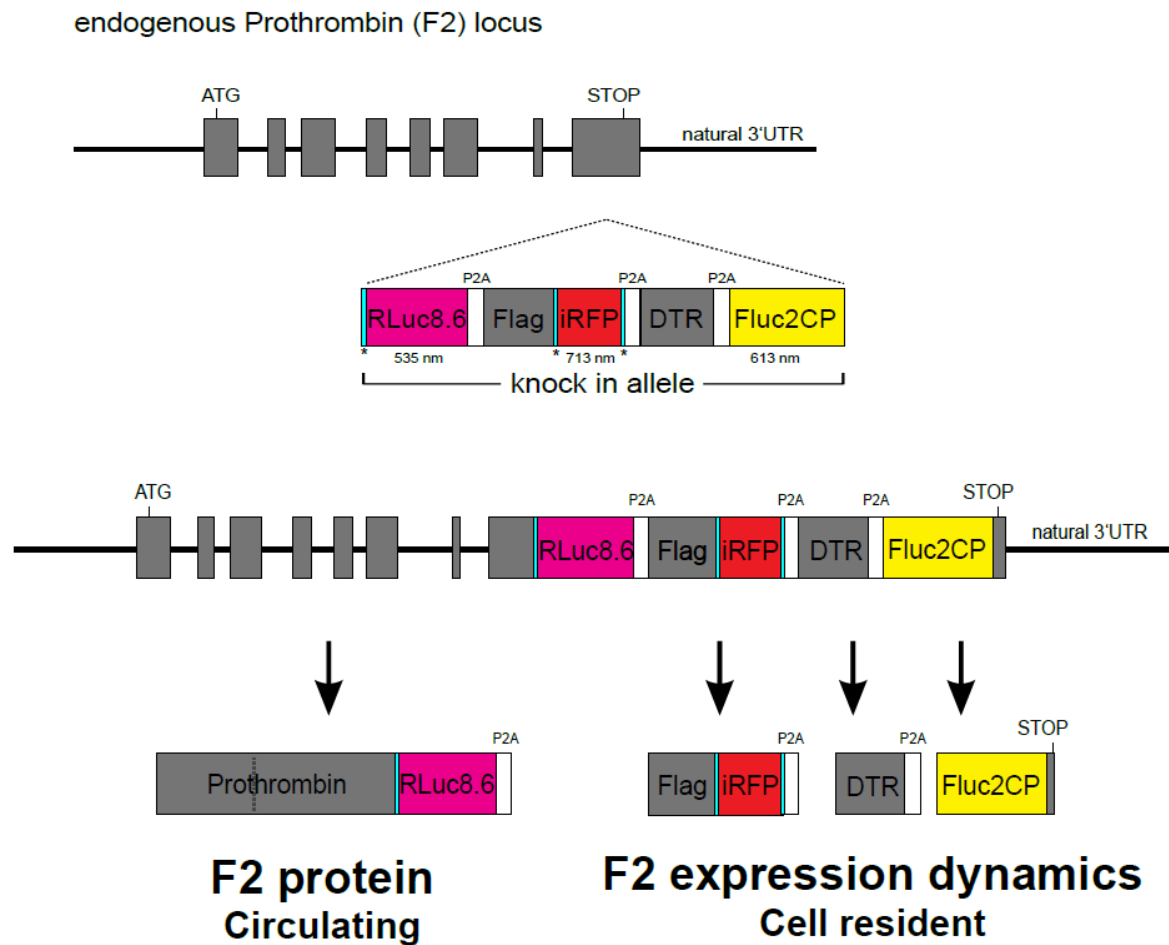
Tabelle 7: Tiermodelle

Name	Maus-Linie	Herkunft
<b>B6</b>	C57BL/6J	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA
<b>D-Insight</b>	C57BL/6 NTac-F2 <sup>tm3427</sup> (Rluc-P2A-iRFP-P2A-DTR-P2A-Fluc2CP)Arte	Danckwardt Labor
<b>F2KD</b>	C57BL/6-Gt(ROSA)26Sor <sup>tm2756</sup> (H1/tetO-RNAi:F2)Arte	Danckwardt Labor

#### 2.2.1.1 D-Insight Mausmodell

Das neu entwickelte D-Insight Mausmodell wurde in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt entwickelt und etabliert (170). Es handelt sich um eine transgene Reportermaus, die durch Einfügen eines Knock-in-Allels die Lokalisierung und Quantifizierung der Prothrombin-Expression erlaubt, sowie die Verfolgung der Sekretionsdynamik von Prothrombin ermöglicht.

Das Knock-in-Allel wurde in den endogenen Prothrombin-Lokus inseriert (siehe Abbildung 7). Es besteht aus zwei Lumineszenz-Reportern, RLuc8.6 (pink) und Fluc2CP (gelb), einem Nahinfrarot-Fluoreszenzprotein (iRFP, rot) und einem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR). Die Verwendung viraler P2A-Spaltungspeptide ermöglicht die Spaltung der multicistronischen Transkriptionseinheit, sodass das endogene Prothrombin und die inserierten Reporter als individuelle Proteine in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 exprimiert werden. RLuc wird zusammen mit Prothrombin in das Kreislaufsystem sekretiert und ermöglicht so die Verfolgung der Sekretionsdynamik von Prothrombin. Fluc (Firefly-Luciferase), iRFP und DTR verbleiben in der Zelle, wodurch Prothrombin-exprimierende Zellen identifiziert werden können.



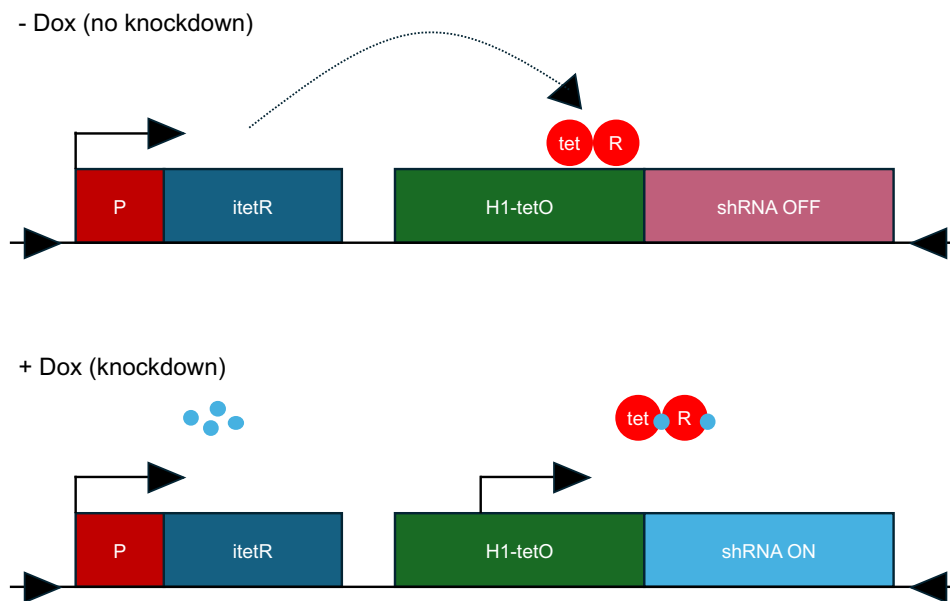
**Abbildung 7: D-Insight Mausmodell - Schematische Darstellung**

Die transgene Reportermaus „D-Insight“ enthält ein in den Prothrombin-Genlocus inseriertes Knock-in-Allel, bestehend aus zwei Lumineszenz-Reportern (RLuc8.6 und Fluc2CP), einem Fluoreszenzreporter (iRFP) und einem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR). Durch Spaltung mittels inserierter P2A-Spaltungspeptide werden die Reporter und das Prothrombin in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1:1 exprimiert. RLuc wird zusammen mit Prothrombin in das Kreislaufsystem sekretiert (links), während iRFP, DTR und Fluc in der Zelle verbleiben (rechts). Dies ermöglicht die Untersuchung der Expressions- und Sekretionsdynamik von Prothrombin. Das Mausmodell wurde in der Arbeitsgruppe von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt entwickelt und etabliert (170).

### 2.2.1.2 Induzierbares RNA-Interferenz Mausmodell (F2KD)

Das induzierbare RNA-Interferenz Mausmodell "F2KD" wurde im Labor von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt entwickelt und etabliert (170). Dieses Modell ermöglicht durch die Doxycyclin-gesteuerte Expression einer Small hairpin RNA (shRNA) (siehe Abbildung 8) eine zielgerichtete und reversible Unterdrückung des Prothrombin-Gens (Knockdown). Dies erlaubt vielfältige funktionelle Untersuchungen des Gens und seines Translationsprodukts.

Unter physiologischen Bedingungen (ohne Doxycyclin) hemmt der Tet-Repressor (itetR) den Tet-Promotor (H1-tetO), wodurch die Transkription der shRNA verhindert wird und die Prothrombin-Expression somit unverändert bleibt. Bei Zufuhr von Doxycyclin dissoziiert der Tet-Repressor vom Tet-Promotor, was die Transkription der shRNA ermöglicht. Die shRNA interagiert mit der mRNA des Prothrombin-Gens und verhindert deren Translation durch RNA-Interferenz (232).



**Abbildung 8: Induzierbares RNA-Interferenz Mausmodell (F2KD) - Schematische Darstellung**

Das "F2KD" Mausmodell dient der zielgerichteten Stilllegung (Knockdown) des Prothrombin-Gens mittels Doxycyclin-gesteuerter Expression einer shRNA. Ohne Doxycyclin (oben) hemmt der Tet-Repressor (itetR) den Tet-Promotor (H1-tetO) und damit die Transkription der shRNA. Bei Zufuhr von Doxycyclin (unten) dissoziiert der Tet-Repressor vom Tet-Promotor, wodurch die shRNA transkribiert wird. Das Mausmodell wurde im Labor von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt entwickelt und etabliert (170).

## 2.2.2 Zellkulturen

Für die Experimente in dieser Arbeit wurden im Danckwardt Labor generierte B6, F2KD und D-Insight Fibrosarkom-Zellkulturen verwendet. Die Fibrosarkome wurden durch intramuskuläre Injektion von 0,1 mg Methylcholanthren (MCA, Sigma-Aldrich), gelöst in 30 µL Maisöl (Sigma-Aldrich), in den linken Glutealmuskel von B6, D-Insight und F2KD Mäusen generiert. Die so entstanden Tumore wurden nach Euthanasie der entsprechenden Maus extrahiert bevor sie einen Durchmesser von 2 cm erreicht hatten. Anschließend wurden sie in DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco) gewaschen und in kleine Fragmente geschnitten. Diese Fragmente wurden dann in einer 6-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific) für 24 Stunden in einem Verdauungsmedium bestehend aus RPMI (Gibco), 20% fötalem Kälberserum (FBS, Gibco), 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 8 mg/ml Kollagenase inkubiert. Anschließend wurden die Tumorfragmente mechanisch durch Auf- und Abpipettieren gelöst und durch ein 40 µm Zellsieb (Corning) filtriert. Die Zellsuspension wurde bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.2.2.1) resuspendiert.

Neben Fibrosarkom-Zellen wurden in dieser Arbeit aus Mausohren gewonnene primäre Fibroblasten verwendet. Nach der Euthanasie einer B6 Maus wurde mit einer feinen Schere ein Hautstück des Ohrs mit einem Durchmesser von ca. 1 cm entnommen und dreimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde es in einer 10 cm Petrischale (Thermo Fisher Scientific) in kleine Stücke (< 3 mm) geschnitten und in zwei Wells einer 6-Well-Platte übertragen und für 24 Stunden in einem Verdauungsmedium bestehend aus RPMI, 20% fötalem Kälberserum, 1% Penicillin-Streptomycin und 8 mg/ml Kollagenase inkubiert. Die

Fragmente wurden durch Auf- und Abpipettieren gelöst und durch ein 40 µm Zellsieb filtriert. Die Zellsuspension wurde bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert und das Zellpellet in Zellkulturmedium (siehe Kapitel 2.2.2.1) resuspendiert.

### **2.2.2.1 Kultivierung**

Die Zellkulturen wurden im Brutschrank (Binder) bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C gehalten. Für die Kultivierung wurden Zellkulturflaschen mit Filterschraubverschluss (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> und 175 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio-One) sowie Well-Platten (6-, 12-, 24-, 48-, 96- Wells, Nuclon™ Delta, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Als Zellkulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) mit hitzeinaktiviertem FBS in einer Konzentration von 10% sowie Penicillin-Streptomycin in einer Konzentration von 1% angesetzt. Die Zelldichte und Vitalität der Zellkulturen wurden täglich unter dem Mikroskop (Leica) kontrolliert und das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Zellen wurden entweder passagiert sobald sie eine 70-80%ige Konfluenz aufwiesen, in einer ausgezählten und definierten Zellzahl für Experimente verwendet, oder für späteren Gebrauch eingefroren. Zum Pipettieren oder Resuspendieren größerer Volumina wurden hierbei Stabpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Greiner Bio-One) sowie eine Pipettierhilfe (Hirschmann) verwendet. Zum Absaugen von Flüssigkeiten wurden Pasteurpipetten (Roth) benutzt. Um Kontamination zu vermeiden, wurden alle Arbeiten im Umgang mit den Zellkulturen unter sterilen Bedingungen in einer Sterilwerkbank (HS18, Heraeus / NuAire Class II) durchgeführt.

### **2.2.2.2 Passagieren, Pelletieren, Einfrieren und Auftauen**

Um Temperaturschwankungen während der Zellpassage zu minimieren, wurden die verwendeten Flüssigkeiten in einem Wasserbad (SW23, Julabo) auf 37°C vorgewärmt. Das Medium im Zellkulturbehälter wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich) benetzt, für 5 Minuten inkubiert und in frischem Medium gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One) überführt und bei 300 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet entweder in frischem Medium resuspendiert und zur weiteren Kultivierung in einen Zellkulturbehälter pipettiert, oder in 1 ml Einfriermedium, bestehend aus 90% FBS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich), für späteren Gebrauch eingefroren und bei -80°C gelagert. Da das Einfriermedium lichtsensitiv ist, wurde es stets lichtgeschützt gelagert. Für das kontrollierte Einfrieren wurden 1,8 ml Kryoröhrchen (Thermo Fisher Scientific) und ein Gefrierbehälter (Nalgene) verwendet. Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen für weniger als eine Minute im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Nach dem Hinzufügen von 5 ml Medium wurden sie in ein 15 ml Falcon-Röhrchen pipettiert und dann zentrifugiert. Nach anschließender Resuspension in frischem Medium wurden die Zellen in einen Zellkulturbehälter übertragen und unter dem Mikroskop auf Vitalität überprüft.

Für Versuche, die eine definierte Zellzahl erforderten, wurde die Zellzahl der Kultur vor dem Pelletieren bestimmt. Dazu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (Biochrom AG) gefärbt und mit einer Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe) unter dem Mikroskop gezählt. Trypanblau ist ein Perforationsfarbstoff, der nur in abgestorbene Zellen eindringt und sie färbt. Diese wurden bei der Zählung nicht berücksichtigt. Anhand der Zellzahl pro Volumen der

Zellkultur-Suspension wurde das entsprechende Volumen für die benötigte Zellzahl errechnet und zentrifugiert, um ein Zellpellet mit der gewünschten Zellzahl zu erhalten.

## 2.2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.3.1 RNA-Isolierung und RNA-Konzentrationsmessung

Für die Isolierung von RNA aus Gewebe oder Zellkulturen wurde PeqGold TriFast Lösung (PeqLab) verwendet. Pro 50-100 mg Gewebe oder 5-10 Millionen Zellen wurde 1 ml der Lösung zugegeben, mittels Vortex-Schüttler (PeqLab) gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei festem Gewebe kam ein elektrischer Homogenisierer (Qiagen) zum Einsatz. Nach der Inkubation wurde pro 1 ml der entstandenen Suspension 200 µl Chloroform (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Nach erneutem Vortexen und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension 5 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorfer) überführt. Zur Fällung der RNA wurden pro 1 ml anfänglich verwendeter TriFast Lösung 500 µl Isopropanol (Sigma-Aldrich) und 20 µl Glykogen (Thermo Fisher Scientific) zugegeben. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Zentrifugation für 10 Minuten bei 12000 g und 4°C. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml eiskaltem 70%igem Ethanol (vergällt, Sigma-Aldrich) gewaschen und erneut 10 Minuten bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde entfernt und das RNA-Pellet in 20 µl RNase freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific) gelöst. Das restliche Ethanol wurde durch 10-minütige Verdunstung bei 50°C und 500 rpm auf einem Schüttler entfernt.

Tabelle 8: RNA-Isolierung

Reagenz	Volumen
<b>PeqGold TriFast Lösung</b>	1 ml pro 50-100 mg Gewebe 1 ml pro 5-10 x 10 <sup>6</sup> Zellen
<b>Chloroform</b>	200 µl
<b>Isopropanol</b>	500 µl
<b>Glykogen</b>	20 µl
<b>Ethanol</b>	1 ml
<b>RNase freies Wasser</b>	20 µl

Abschließend wurde die Konzentration der RNA mittels Nanodrop Spectrophotometer (PeqLab) bestimmt und auf eine Konzentration von 1 µg/ml durch Zugabe von RNase freiem Wasser verdünnt.

### 2.2.3.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

Die cDNA-Synthese wurde gemäß eines Standardprotokolls zur reversen Transkription mit RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl, Thermo Fisher Scientific) und Oligo d(T) (16mer) Primer (0,5 µg/µl, Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

Zunächst wurde ein Reaktionsgemisch 1 bestehend aus RNA, RNase freiem Wasser, Oligo d(T) und dNTPs (10mM, Thermo Fisher Scientific) hergestellt (siehe Tabelle 9). Dieses Gemisch wurde für 10 Minuten bei 65°C mittels Thermozykler (Analytic Jena AG) inkubiert und anschließend für wenige Minuten auf Eis gekühlt.

Tabelle 9: cDNA-Synthese - Reaktionsgemisch 1

Reagenz	Volumen
<b>RNA (1 µg/µl)</b>	1 µl
<b>RNase freies Wasser</b>	9 µl
<b>Oligo d(T) (16mer) Primer (0,5 µg/µl)</b>	1 µl
<b>dNTPs (10mM)</b>	1 µl

Durch Zugabe von 5x RT-Buffer (Thermo Fisher Scientific), DTT (0,1 µM, Thermo Fisher Scientific), RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl, Thermo Fisher Scientific) und RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl, Thermo Fisher Scientific) wurde das Reaktionsgemisch 2 hergestellt (siehe Tabelle 10). Dieses Gemisch wurde für 50 Minuten bei 42°C und anschließend für 10 Minuten bei 70°C im Thermozykler inkubiert.

Tabelle 10: cDNA-Synthese - Reaktionsgemisch 2

Reagenz	Volumen
<b>Reaktionsgemisch 1</b>	12 µl
<b>5x RT-Buffer</b>	4 µl
<b>DTT (0,1 µM)</b>	2 µl
<b>RiboLock RNase Inhibitor (40U/µl)</b>	1 µl
<b>RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µl)</b>	1 µl

Abschließend wurde die cDNA im Verhältnis 1:10 für die weitere Verarbeitung in der qRT-PCR verdünnt.

### 2.2.3.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Für die quantitative Real-Time PCR wurde zunächst ein Mastermix erstellt, bestehend aus 2x OneTaq Mix (Thermo Fisher Scientific), SYBR green (Thermo Fisher Scientific), Primern (forward und reverse), cDNA und H<sub>2</sub>O. Die entsprechenden Volumina sind in Tabelle 11 aufgelistet. Anschließend erfolgte die Inkubation im Real-Time PCR Detektionsgerät (Bio-Rad) nach dem unten beschriebenen Schema.

Tabelle 11: qRT-PCR - Mastermix

Reagenz	Volumen
<b>cDNA (1:10 verdünnt)</b>	5 µl
<b>2x OneTaq Mix</b>	7,5 µl
<b>SYBR green</b>	0,15 µl
<b>Primer for</b>	0,3 µl
<b>Primer rev</b>	0,3 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	1,75 µl

Inkubationsschema: 5°C für 2 min; 95°C für 30 sec; 60°C für 30sec; 72°C für 30 sec, Erstellung einer Schmelzkurve

Die Auswertung der Daten erfolgte mittels der Software CFX Manager 3.1 (Bio-Rad) und Microsoft Excel. Zur Quantifizierung der Genexpression wurde eine Normalisierung auf das Referenz-Gen  $\beta$ -Aktin nach folgender Formel durchgeführt:

$$\Delta Cq = Cq \text{ Zielgen} - Cq \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta Cq \text{ Expression} = 2^{(-\Delta Cq)}$$

### 2.2.3.4 F2 RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Zunächst wurden Kryoschnitte der Fibrosarkome angefertigt. Die Tumore wurden durch Injektion von F2KD Fibrosarkom-Zellen und D-Insight Fibrosarkom-Zellen in B6 Mäuse generiert (siehe Kapitel 2.2.4). Nach der Euthanasie der Mäuse durch Luxation der Halswirbelsäule wurden die Tumore präpariert und mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden sie in Kryoeinbettformen (Tissue-Tek® Cryomold® 25 x 20 x 5 mm, Sakura) überführt, mit Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T. Compound, Sakura) bedeckt und auf Trockeneis gelegt, bis sie eingefroren waren. Die Proben wurden bis zur Erstellung der Gefrierschnitte bei -80°C gelagert. Gefrierschnitte (12 µm) wurden mit einem Kryostaten angefertigt, auf Adhäsionsobjektträger (SuperFrost Plus™, Thermo Fisher Scientific) übertragen und über Nacht bei 4°C in 4 % Formaldehyd fixiert.

Zur Visualisierung der F2-mRNA-Expression in den Proben wurde der ViewRNA ISH Tissue 1-Plex Assay (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Schnitte wurde zweimal in DPBS gewaschen und in aufsteigender Ethanolkonzentration (50 %, 70 %, 100%; jeweils 10 Minuten) dehydriert. Nach dem Trocknen der Schnitte wurde eine hitzestabile, hydrophobe Barriere um die Proben gezeichnet (ImmEDGE™ Pen, Vector). Anschließend wurden die Schnitte für 30 - 45 Sekunden bei 85 - 95°C in 1x Pretreatment Solution gekocht, zweimal mit DPBS gewaschen und für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0,2 M HCL inkubiert. Nach erneutem Waschen mit DPBS wurden sie für 10 Minuten bei Raumtemperatur in Protease Solution (1:100 mit vorgewärmtem DPBS verdünnt) inkubiert. Anschließend wurden sie mit DPBS gewaschen und für drei Minuten in 4% Formaldehyd inkubiert. Alle folgenden Hybridisierungs- und Amplifikationsschritte wurden bei 40°C in einer befeuchteten Kammer durchgeführt.

Nach zweimaligem Waschen mit DPBS und einmal mit zweifach destilliertem Wasser erfolgte die Hybridisierung der Proben durch Inkubation mit der Probe Set Working Solution (ViewRNA

Type 1 Probe Set 1:30 mit vorgewärmtem Probe Set Diluent QF verdünnt) für 2,5 - 3 Stunden bei 40°C. Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte dreimal unter konstantem Schütteln in Waschpuffer für jeweils zwei Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden sie für 40 Minuten in PreAmp1 Working Solution (PreAmp1 QF 1:100 mit vorgewärmtem Amplifier Diluent QF verdünnt) inkubiert und dann erneut, wie oben beschrieben, gewaschen. Die Schnitte wurden dann für 40 Minuten in Amp1 Working Solution (Amp1 QF 1:100 in vorgewärmtem Amplifier Diluent QF verdünnt) inkubiert. Nach einem dritten Waschschrift wurden die Schnitte für 40 Minuten in Label Probe-AP Working Solution (Label Probe-AP 1 zu 500 in Label Probe Diluent verdünnt) inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mittels Washing Buffer unter konstantem Schütteln für jeweils drei Minuten. Nun wurde AP-Enhancer Solution den Proben zugefügt und diese für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 30 - 40 Minuten bei 40°C in frisch zubereitetem Detektionssubstrat, bestehend aus einer halben Tablette Fast Red, gelöst in 2,5 mL Naphtol Buffer. Die Schnitte wurden zweimal mit DPBS gewaschen und 5 Minuten in 4% Formaldehyd inkubiert. Nach Waschen mit zweifach destilliertem Wasser, Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 10 - 30 Sekunden und erneutem Waschen mit zweifach destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 20 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur getrocknet und mittels Befestigungsmedium mit DAPI (Fluoromount-G™ Befestigungsmedium, mit DAPI, Invitrogen) eingebettet. Die Schnitte wurden dann mit Deckgläsern versehen, die Ecken mit Nagelpolitur versiegelt und schließlich bei 4°C mit Aluminiumfolie bedeckt gelagert.

Nach der FISH wurde das Tumorgewebe bezüglich der Expression von F2 mRNA fluoreszenzmikroskopisch mit einem Konfokalmikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH) untersucht. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden mit der Unterstützung der AG Strand an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz erstellt. Die quantitative Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Fotos erfolgte mittels ImageJ und dem ThunderSTORM Plugin (233). Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurde das Fluoreszenzsignal der Prothrombin mRNA auf das DAPI-Signal der Zellkerne normalisiert.

## 2.2.4 Tumorzellinjektion in Mäuse und Tumormessung

Für die Injektion von Fibrosarkom-Zellen in Mäuse wurden zunächst mittels Zellzählung und Zentrifugation Zellpellets mit definierter Anzahl an vitalen Zellen für das jeweilige Experiment erzeugt und in DPBS gelöst. Pro Maus wurden 100 µl der Zelllösung subkutan in die rechte Flanke injiziert. Hierfür wurden die Mäuse mittels Isofluran-Inhalationsnarkose (Piramal Critical Care) kurzzeitig betäubt. Nach der Injektion wurden die Mäuse täglich durch Abtasten auf das Anwachsen von Tumoren überprüft. Die Tumorgöße wurde dabei mit einem digitalen Messschieber (Masko) von außen gemessen. Um das Leid der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurden die Mäuse spätestens bei Erreichen eines Tumordurchmessers von 2 cm durch Luxation der Halswirbelsäule euthanasiert.

Da die Tumore in ihrer Form am ehesten einem Ellipsoid entsprachen, wurde das Tumolvolumen näherungsweise mit der Volumenformel für Rotationsellipsoide berechnet:

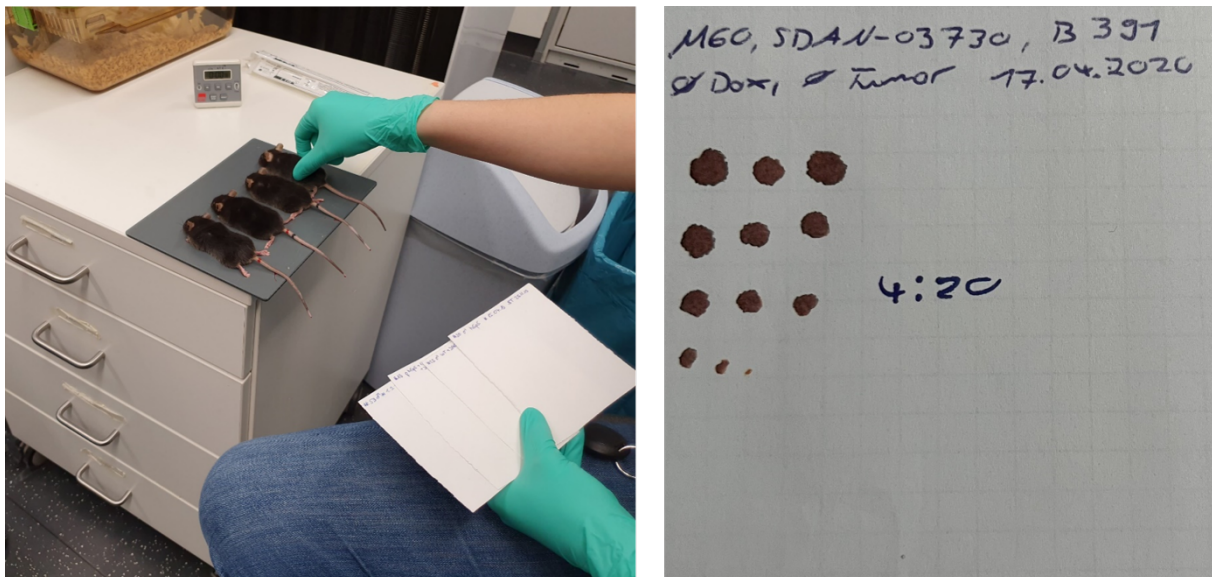
$$V = \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{l}{2} \cdot \left(\frac{b}{2}\right)^2$$

Hierbei entspricht  $l/2$  dem Abstand der Pole zum Mittelpunkt, also der Hälfte des Durchmessers der langen Achse, und  $b/2$  dem Radius des Äquatorkreises, also der Hälfte des Durchmessers der kurzen Achse.

## 2.2.5 Blutungszeit und Prothrombinzeit

Um die Blutungszeit als Indikator der primären Hämostase zu ermitteln, wurde die Schwanzblutungszeit von B6 Mäusen gemessen. Dabei wurden vier Versuchsgruppen gebildet: B6 Mäuse mit und ohne F2KD Fibrosarkomen, jeweils mit und ohne Zufuhr von Doxycyclin-haltiger Ernährung für 3 Wochen. Die Tumore wurden durch Injektion von jeweils 500.000 F2KD Fibrosarkom-Zellen induziert (siehe Kapitel 2.2.4).

Acht Tage nach der Zellinjektion wurden die Mäuse durch intraperitoneale Verabreichung eines Ketamin/Xylazin-Gemischs betäubt, wobei pro 1 kg Körpergewicht 100 mg Ketamin (Inresa Arzneimittel GmbH) und 10 mg Xylazin (Rompun 2 %, Bayer) verwendet wurden. Nach der Betäubung wurden 2 mm der Schwanzspitze mit einem chirurgischen Skalpell (Servoprax GmbH) abgetrennt. Die Mäuse wurden sofort horizontal auf einem Tisch platziert, sodass der Schwanz herunterhing, und eine Stoppuhr wurde gestartet (siehe Abbildung 9). Die sich bildenden Blutropfen wurden alle 20 Sekunden durch vorsichtiges Abtupfen mit Filterpapier aufgefangen, ohne hierbei den sich bildenden Thrombus zu dislozieren oder die Blutung durch mechanische Reizung der Wunde zu beeinflussen. Der Zeitpunkt des Sistierens der Blutung wurde bestimmt und die Stoppuhr wurde angehalten. Nachblutungen wurden nur dann zur Blutungszeit addiert, wenn sie innerhalb von zwei Minuten nach dem primären Sistieren der Blutung auftraten.



**Abbildung 9: Schwanzblutungszeit - Aufbau und Durchführung**

Das linke Bild dient der Veranschaulichung des schematischen Aufbaus und der Durchführung des Experiments zur Bestimmung der Schwanzblutungszeit. Das rechte Bild zeigt beispielhaft das mittels Filterpapiers bestimmte Ergebnis der Blutungszeit einer B6 Maus.

Anschließend wurde die Prothrombinzeit als Parameter des extrinsischen Systems der sekundären Hämostase gemessen. Hierfür wurde den Mäusen durch Punktion der Vena facialis Blut abgenommen und im Verhältnis 9:1 mit Trinatriumcitrat 3,2% ungerinnbar gemacht. Durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 4.500 g wurde Citratplasma gewonnen und anschließend im Verhältnis 1:3 mit DPBS (ohne Calcium) verdünnt. Schließlich wurde mit dem Gerinnungs-Analysator Amax Destiny Plus (TRINITY BIOTECH PLC) die Prothrombinzeit bestimmt.

## 2.2.6 Proliferationsversuch

Die Proliferation von B6 Fibrosarkom-Zellen und F2KD Fibrosarkom-Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels Zellzählung ermittelt. Beide Zelllinien wurden dabei mit und ohne Zugabe von Doxycyclin (Sigma-Aldrich) untersucht. Die Konzentration des Doxycyclins betrug 20 µg pro 1 ml Zellkulturmedium und die entsprechenden Zellkulturen wurden eine Woche lang mit dem Doxycyclin-haltigem Medium vorbehandelt. Diese Behandlung induzierte eine F2-Depletion in den F2KD Fibrosarkom-Zellen, während die B6-Zellkulturen als Kontrollgruppe dienten, um mögliche Doxycyclin-eigene Effekte auszuschließen.

In biologischen Triplikaten wurden pro Zellkultur und Well einer 12-Well-Platte jeweils 5000 Zellen ausgesät. Die Zellzahl wurde in Intervallen von 24 Stunden über einen Zeitraum von fünf Tagen mittels Zellzählung (siehe Kapitel 2.2.2.2) bestimmt. Da die adhärennten Zellen für die Zählung von der Kulturplatte abgelöst werden mussten, wurden fünf solcher 12-Well-Platten vorbereitet, um täglich eine neue Platte für die Zellzählung zu verwenden. Pro Well wurde 1 ml Zellkulturmedium verwendet, das alle 2 Tage gewechselt wurde. Vor der Zellzählung am fünften Tag wurden Fotos der Zellkulturen unter dem Mikroskop zur visuellen Dokumentation aufgenommen.

## 2.2.7 Angiogeneseversuch

### 2.2.7.1 Angiogenese im Mausohr

Zur Untersuchung der Angiogenese im Mausohr wurden 2 µl rekombinantes VEGF 165 (20 µg/ml, PeproTech), oder 2 µl (10 nM) murines rekombinantes Thrombin (Sigma-Aldrich), oder DPBS als Kontrolle intradermal in die Ohren von betäubten B6 Mäusen (Ketamin/Xylazin-Gemisch, siehe Kapitel 2.2.5) injiziert. Insgesamt erfolgten 5 Injektionen pro Ohr. Diese Injektionen wurden jeden zweiten Tag über einen Zeitraum von 10 Tagen durchgeführt. 24 Stunden nach der letzten Ohrinjektion wurden 100 µl des Fluoreszenzmarkers AngioSense 750EX (20 nmol/ml, PerkinElmer) in die Schwanzvene gespritzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Mäuse erneut betäubt und es wurden Fluoreszenzfotos mit dem in vivo Bildgebungssystem IVIS Spectrum (PerkinElmer) und der Living Image Software aufgenommen. Hierbei wurde gemäß der Herstellerinformation für AngioSense ein Exzitationsfilter von 745 nm und ein Emissionsfilter von 800 nm verwendet. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals erfolgte ebenfalls mit der Living Image Software, wobei die Average Radiant Efficiency ( $[\text{p/s/cm}^2/\text{sr}] / [\mu\text{W/cm}^2]$ ) gemäß der Herstellerinformation für das IVIS Spectrum bestimmt wurde.

### **2.2.7.2 Angiogenese von F2KD Fibrosarkomen in B6 Mäusen**

Zur Untersuchung der Angiogenese von F2KD Fibrosarkomen wurden durch Injektion von jeweils 500.000 F2KD Fibrosarkom-Zellen pro Maus in B6 Mäusen Fibrosarkome erzeugt. (siehe Kapitel 2.2.4). Diese Mäuse wurden dann in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe erhielt Doxycyclin-haltige Nahrung, die andere Gruppe bekam reguläre Nahrung.

Pro Maus wurden 100 µl des Fluoreszenzmarkers AngioSense 750EX (20 nmol/ml) in die Schwanzvene injiziert. 24 Stunden danach wurden die Mäuse durch Luxation der Halswirbelsäule euthanasiert und anschließend präpariert, sodass die Tumore sichtbar waren (siehe Abbildung 20). Unmittelbar darauf wurden mit dem IVIS Spectrum und der Living Image Software Fluoreszenzfotos erstellt und das Fluoreszenzsignal quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.7.1).

### 3 Ergebnisse

Diese Dissertation untersucht die Auswirkungen von Tumor-intrinsischem Prothrombin in Fibrosarkomen auf die Blutgerinnung, das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese in Mäusen.

Die experimentellen Grundlagen dieser Arbeit basieren auf der Verwendung von Fibrosarkom-Zellen, die im Labor von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt durch Injektion von Methylcholanthren in den Glutealmuskel von Mäusen erzeugt wurden (siehe Kapitel 2.2.2). Um diese Zellen zu validieren, wurden sie morphologisch beurteilt und mit Fibroblasten bezüglich ihrer Expression von Kollagen verglichen. Anschließend wurde in vivo überprüft, ob die Injektion dieser Fibrosarkom-Zellen in Mäuse tatsächlich zur Entstehung solider Tumore führt.

Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit besteht in dem Nachweis von Tumor-intrinsischem Prothrombin in den so entstandenen Fibrosarkomen. Dies wurde durch die Verwendung von Fibrosarkomen ermöglicht, die in genetisch modifizierten D-Insight Mäusen erzeugt wurden. Diese Mäuse tragen ein Knock-in-Allel im Prothrombin-Gen, das die Lokalisierung und Quantifizierung der Prothrombin-Expression, sowie die Verfolgung der Sekretionsdynamik von Prothrombin erlaubt (siehe Kapitel 2.2.1.1). Ergänzend dazu wurde die Prothrombin-Expression mittels F2-RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von Tumoren sowohl visuell als auch quantitativ bestätigt.

Im weiteren Verlauf wurden die Auswirkungen des Tumor-intrinsischen Prothrombins auf zentrale Parameter der Tumorbiologie, nämlich die Blutgerinnung, das Tumorwachstum und die Tumorangiogenese, untersucht. Hierfür kamen Fibrosarkome und Fibrosarkom-Zellkulturen aus einer weiteren genetisch modifizierten Mauslinie, der F2KD Maus, zum Einsatz. Dieses Mausmodell ermöglicht durch eine Doxycyclin-induzierbare RNA-Interferenz einen gezielten Knockdown des Prothrombin-Gens (siehe Kapitel 2.2.1.2). Durch die Verwendung von F2KD Fibrosarkomen wurden funktionelle Vergleichsstudien von Tumoren mit unbeeinflusster Prothrombin-Expression und Tumoren mit unterdrückter Prothrombin-Expression durchgeführt.

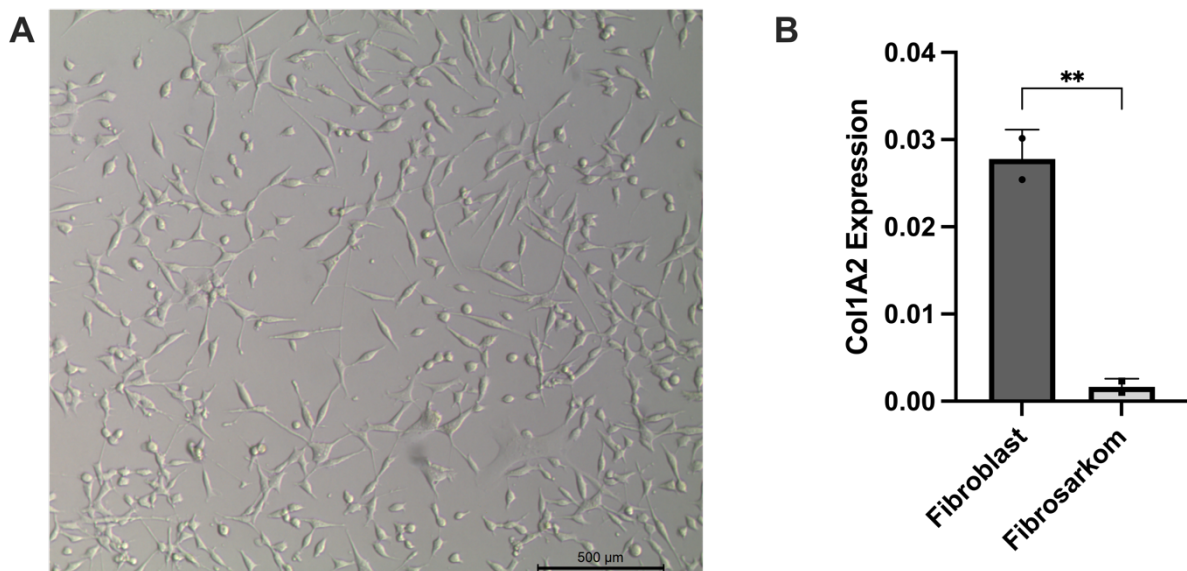
#### 3.1 Validierung der Fibrosarkom-Zellen

In den Experimenten dieser Arbeit wurden Fibrosarkom-Zellen der Mauslinien B6, D-Insight und F2KD verwendet. Die Fibrosarkome wurden im Labor von Univ.-Prof. Dr. Sven Danckwardt durch Injektion von Methylcholanthren in den Glutealmuskel der Mäuse induziert. Anschließend wurden aus den resultierenden Tumoren Zellkulturen etabliert. Dazu wurden die Tumore in kleine Fragmente zerteilt, in einem Kollagenase-haltigen Verdauungsmedium inkubiert und mechanisch durch wiederholtes Pipettieren gelöst. Nach der Filtration durch ein Zellsieb wurden die Zellen im Zellkulturmedium resuspendiert und für die nachfolgenden Experimente kultiviert (siehe Kapitel 2.2.2).

Fibrosarkome sind maligne Tumore, die durch die Entartung von mesenchyalem Gewebe, insbesondere von Fibroblasten, entstehen. Um die Validität der nachfolgenden Experimente sicherzustellen, wurde zunächst überprüft, ob die verwendeten Fibrosarkom-Zellen tatsächlich eine entartete, tumorartige Natur aufweisen. Hierfür wurden die Tumorzellen morphologisch mittels Lichtmikroskopie untersucht (Abbildung 10A). Die repräsentativ dargestellten F2KD Fibrosarkom-Zellen zeigen eine moderate, aber deutliche Variabilität in Größe und Form, ein

typisches Merkmal von Fibrosarkom-Zellen, das als Zellpleomorphismus bezeichnet wird. Die Zellen präsentieren sowohl eine rundliche als auch eine spindelförmige Morphologie und weisen teilweise eine storiforme Anordnung auf, was ebenfalls charakteristisch für Fibrosarkom-Zellen ist.

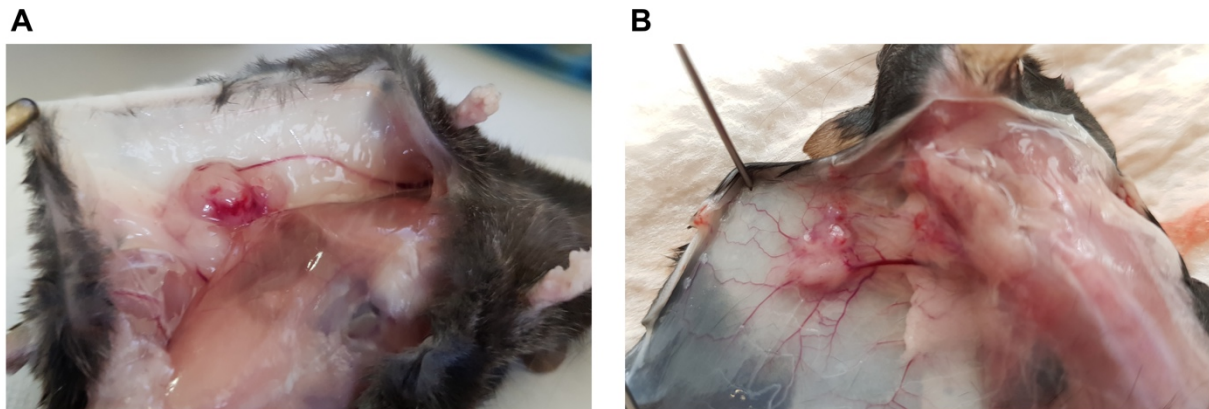
Zur Validierung der Fibrosarkom-Zellen wurde zudem die Expression von Collagen-Typ-I-alpha-2 (Col1A2) untersucht. Col1A2 ist ein Marker für Fibroblasten, der in Fibrosarkomen im Vergleich zu Fibroblasten weniger stark exprimiert wird (234). Um zu überprüfen, ob eine eventuelle Verunreinigung der Fibrosarkom-Kulturen mit Fibroblasten vorliegt, wurde die Expression von Col1A2 in B6 Fibrosarkom-Zellen mit der Expression in Fibroblasten, die aus den Ohren von B6 Mäusen isoliert wurden, verglichen (siehe Kapitel 2.2.2). Die Analyse mittels qRT-PCR ergab eine signifikant geringere Col1A2 Expression in den Fibrosarkom-Zellen (Abbildung 10B), wodurch eine substantielle Verunreinigung mit Fibroblasten ausgeschlossen werden konnte.



**Abbildung 10: Morphologie der Fibrosarkom-Zellen und molekularebiologische Differenzierung von Fibroblasten**

(A) Mikroskopische Aufnahme von F2KD Fibrosarkom-Zellen, die eine rundliche und spindelförmige Morphologie sowie eine teils storiforme Anordnung zeigen. (B) Der Vergleich der normalisierten Expression von Col1A2 in B6 Fibroblasten mit der in B6 Fibrosarkom-Zellen mittels qRT-PCR, schließt eine substantielle Verunreinigung mit Fibroblasten aus. Jeder Datenpunkt stellt ein biologisches Replikat mit jeweils zwei technischen Replikaten dar. Der Vergleich erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Um die Tumorigenität der Fibrosarkom-Zellen *in vivo* zu bestätigen, wurden 5 Millionen Zellen in die rechte Flanke von B6 Mäusen injiziert. Die Mäuse wurden täglich durch Abtasten auf das Wachstum von Tumoren überprüft. Sobald Tumore tastbar waren, wurden die Mäuse euthanasiert, präpariert und fotografiert (Abbildung 11). Neben der erfolgreichen Induktion von Tumoren kann eine deutliche vaskuläre Versorgung der Tumore beobachtet werden, was auf eine ausgeprägte Angiogenese in den Fibrosarkomen hindeutet. Weiterführende Untersuchungen zur Tumorangiogenese werden in Kapitel 3.5 detailliert beschrieben.



**Abbildung 11: Tumorwachstum nach Injektion von Fibrosarkom-Zellen in B6 Mäuse**

(A) Foto einer präparierten B6 Maus 14 Tage nach Injektion von  $5 \times 10^6$  D-Insight Fibrosarkom-Zellen.  
 (B) Foto einer präparierten B6 Maus 3 Tage nach Injektion von  $5 \times 10^6$  F2KD Fibrosarkom-Zellen.

## 3.2 Nachweis von Tumor-intrinsischem Prothrombin

Nach der Validierung der Fibrosarkom-Zellen wurde die Expression von Prothrombin innerhalb der Tumore untersucht. Prothrombin wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, doch neuere Forschungen zeigen, dass es auch in anderen Körperregionen sowie in verschiedenen Tumoren produziert wird (siehe Kapitel 1.4). Die folgenden Untersuchungen dienen der Bestätigung, dass auch Fibrosarkome Prothrombin exprimieren. Hierfür wurden Fibrosarkome der Mauslinien D-Insight und F2KD verwendet. Die Analyse der Prothrombin-Expression in den Tumoren erfolgte sowohl bildgebend als auch molekularbiologisch.

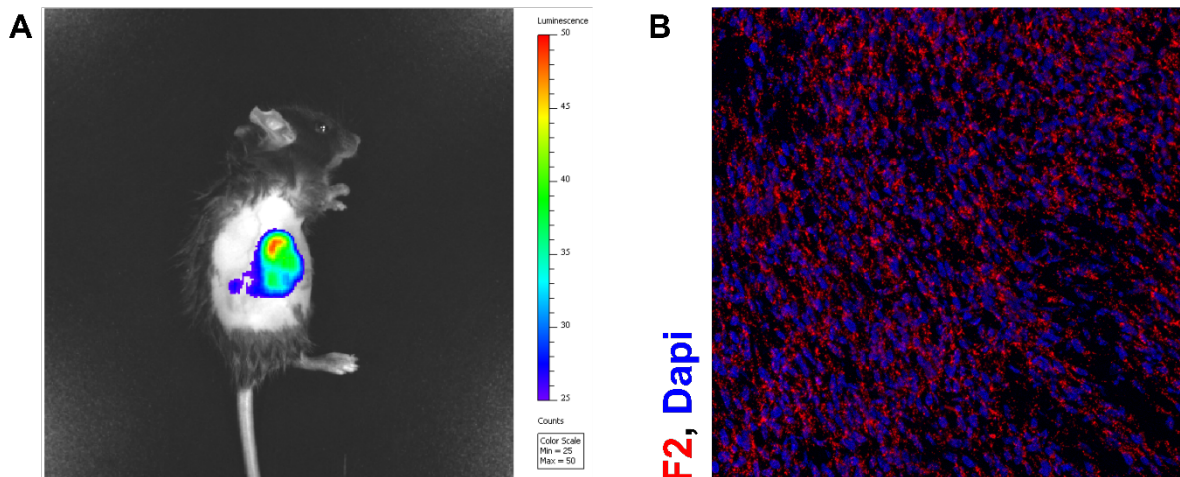
### 3.2.1 Nachweis von Prothrombin-Expression in D-Insight Fibrosarkomen

Die D-Insight Maus ist eine transgene Reportermaus, die durch ein Knock-in-Allel die Lokalisierung und Quantifizierung der Prothrombin-Expression ermöglicht. In dieser Maus wird der Lumineszenz-Reporter FLuc zusammen mit Prothrombin in einem Verhältnis von 1:1 exprimiert. Während Prothrombin teilweise in den Blutkreislauf sekretiert wird, verbleibt FLuc in der Zelle, was die spezifische Detektion von Prothrombin-exprimierenden Zellen erlaubt (siehe Abbildung 7).

Zur Überprüfung der Prothrombin-Expression in Fibrosarkomen wurde zunächst ein D-Insight Fibrosarkom in einer B6 Maus induziert. Hierfür wurden  $1 \times 10^6$  D-Insight Fibrosarkom-Zellen in die rechte Flanke einer B6 Maus injiziert. Vierzehn Tage nach der Injektion, als der Tumor bereits deutlich tastbar war, wurde eine biolumineszente Bildgebung der narkotisierten Maus durchgeführt. Um die Darstellung zu optimieren, wurde die Maus zuvor rasiert. Die Lumineszenz wurde mit einem in vivo Bildgebungssystem (IVIS Spectrum) gemessen und visuell dargestellt. Die Bildgebung ergab ein deutliches Signal im Tumorbereich (Abbildung 12A). Dieses Signal repräsentiert den Lumineszenz-Reporter FLuc, der bei der Prothrombin-Expression in den entsprechenden Zellen verbleibt. Da nur der Tumor, nicht aber die Maus selbst das D-Insight-Transgen und somit den Lumineszenzreporter aufweist, bestätigt dieses Ergebnis die Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin im Fibrosarkom.

Zur weiteren Validierung wurde eine F2 RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung des D-Insight Fibrosarkoms durchgeführt, um die Prothrombin mRNA in dem Tumorgewebe nachzuweisen

und das Ergebnis der biolumineszenten Bildgebung zu bestätigen. Die Maus wurde hierfür euthanisiert und der Tumor präpariert und in eine Kryoform eingebettet. Nach der FISH wurde das Tumorgewebe fluoreszenzmikroskopisch mit einem Konfokalmikroskop untersucht und fotografiert. Hierbei zeigt sich ein deutliches rotes Signal, was die Präsenz von Prothrombin mRNA belegt (Abbildung 12B). Dieser Befund untermauert die Ergebnisse der biolumineszenten Bildgebung und bestätigt die Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin.



**Abbildung 12: Nachweis von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in D-Insight Fibrosarkomen**

(A) Die Biolumineszenz-Bildgebung einer betäubten B6 Maus mit einem D-Insight Fibrosarkom zeigt ein deutliches Lumineszenzsignal im Tumorbereich, das die Expression von Prothrombin in dem Tumor nachweist. Die Bildgebung erfolgte 14 Tage nach Injektion von  $1 \times 10^6$  D-Insight Fibrosarkom-Zellen. Für eine bessere Darstellung und Signalmessung wurde die Maus vor der Bildgebung rasiert. (B) Fluoreszenzmikroskopie nach F2-RNA-FISH eines D-Insight Fibrosarkoms. Die Prothrombin mRNA ist hierbei als rotes Signal sichtbar und das blaue Signal stellt mit DAPI gefärbte Zellkerne dar.

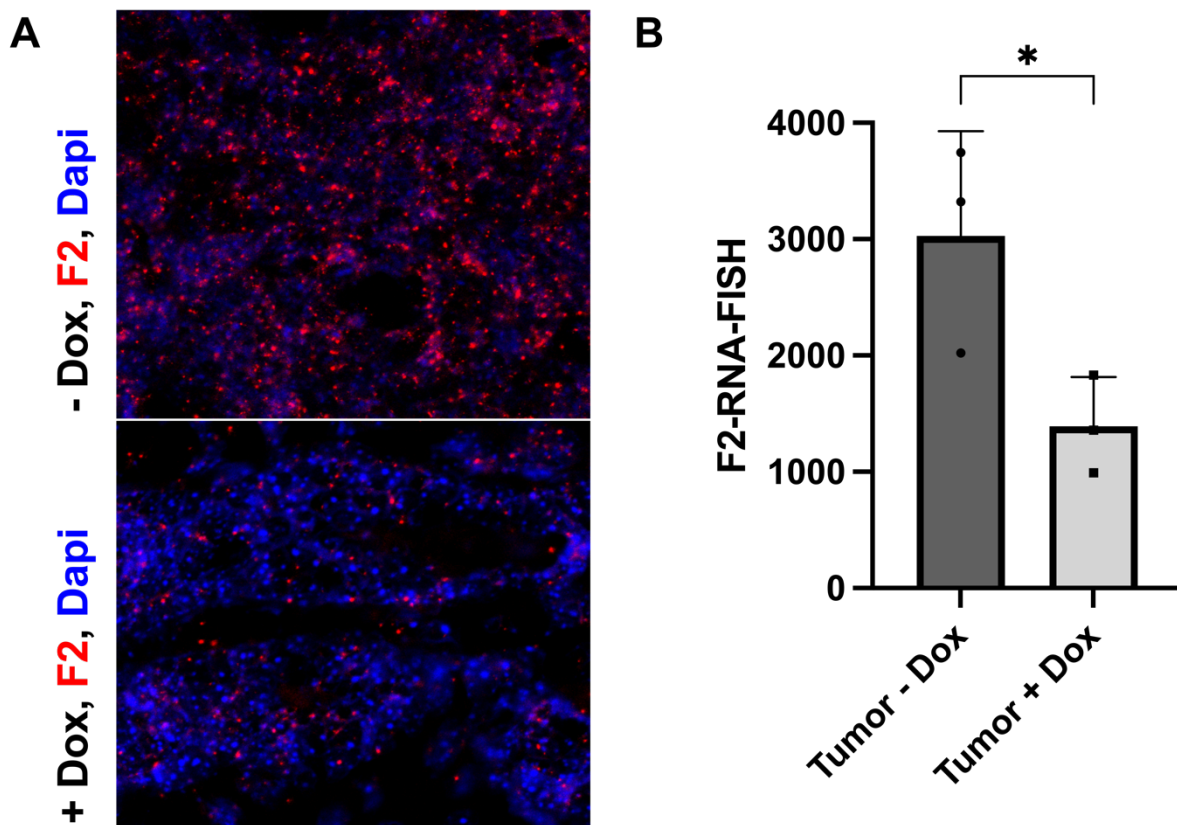
### 3.2.2 Nachweis von Prothrombin-Expression in F2KD Fibrosarkomen

Im nächsten Schritt wurde die Prothrombin-Expression in F2KD Fibrosarkomen untersucht. In diesen Tumoren kann durch eine Doxycyclin-induzierbare RNA-Interferenz die Expression des Prothrombin-Gens unterdrückt werden.

Um die Tumorbildung zu induzieren, wurden 500.000 Fibrosarkom-Zellen in die rechte Flanke von B6 Mäusen injiziert. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe erhielt Doxycyclin, um einen Knockdown der Prothrombin-Expression herbeizuführen, während die andere Gruppe unbehandelt blieb und somit eine normale Prothrombin-Expression aufwies. Neun Tage nach der Zelinjektion wurden die Mäuse euthanasiert und die Tumore entnommen, um die Prothrombin mRNA mittels FISH und anschließender Fluoreszenzmikroskopie darzustellen.

Die Fluoreszenzmikroskopie zeigt, dass die Prothrombin-Expression in den Fibrosarkomen ohne Doxycyclin-Behandlung (- Dox) deutlich sichtbar ist, während in den Tumoren der Doxycyclin-behandelten Mäuse (+ Dox) eine vergleichsweise reduzierte Expression festzustellen ist (Abbildung 13A). Um das visuelle Ergebnis quantitativ zu bestätigen, wurden

die Fluoreszenzsignale anschließend ausgewertet. Hierfür wurde die Software ImageJ mit dem Thunderstorm-Plugin verwendet. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurde das Fluoreszenzsignal der Prothrombin mRNA auf das DAPI-Signal der Zellkerne normalisiert. Die quantitative Auswertung zeigt eine deutliche und statistisch signifikante Abnahme der Prothrombin-Expression in den Doxycyclin-behandelten Tumoren im Vergleich zu den unbehandelten Tumoren (Abbildung 13B). Diese Ergebnisse bestätigen die Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin. Zudem belegen sie, dass die induzierte RNA-Interferenz in der Lage ist, die Prothrombin-Expression effektiv zu unterdrücken und somit valide funktionelle Vergleiche von Tumoren mit normaler und solcher mit reduzierter Prothrombin-Expression ermöglicht.



**Abbildung 13: Nachweis von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in F2KD Fibrosarkomen**

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach F2-RNA-FISH von repräsentativen F2KD Fibrosarkomen ohne Knockdown (- Dox, oben) und mit Knockdown (+ Dox, unten). Das rote Signal zeigt die Prothrombin mRNA, während die blauen Signale die DAPI-gefärbten Zellkerne darstellen. In den Doxycyclin-behandelten Tumoren ist eine deutlich geringere Prothrombin-Expression zu erkennen. (B) Quantitative Auswertung des Fluoreszenzsignals der normalisierten F2 mRNA, die das visuelle Ergebnis bestätigt. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Tumor. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

### 3.3 Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Hämostase

Im Anschluss an den Nachweis von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression und der Validierung des Prothrombin-Knockdowns konnten verschiedene funktionelle Vergleichsstudien durchgeführt werden. Zunächst wurde die Hämostase untersucht. Thrombin spielt eine zentrale Rolle in der sekundären Hämostase, kann aber auch die primäre

Hämostase beispielsweise durch Thrombozytenaktivierung fördern (siehe Kapitel 1.2.1 und Kapitel 1.2.2). Es ist bekannt, dass sich Tumore auf verschiedene Weise auf die Hämostase auswirken und häufig zu einem hyperkoagulatorischen Zustand mit der Entwicklung von Thrombosen führen (siehe Kapitel 1.4.2).

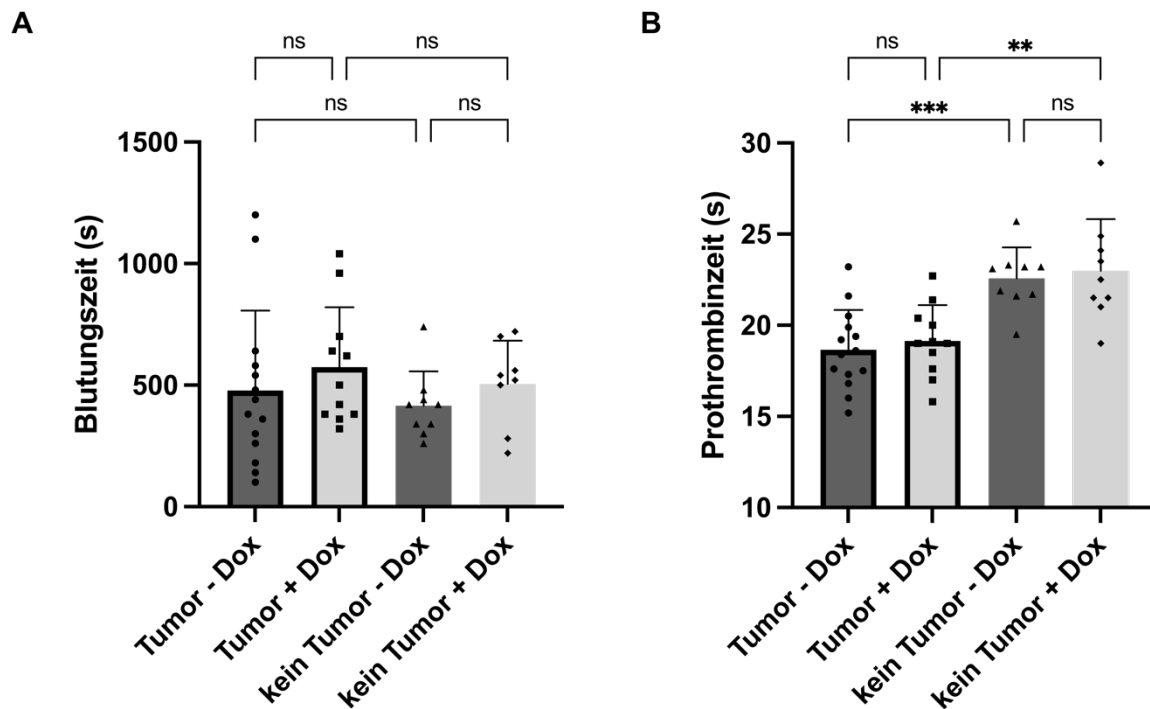
Im Folgenden wird der Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Hämostase untersucht. Hierzu wurde die Blutungszeit als Maß für die primäre Hämostase und die Prothrombinzeit als Indikator für die Aktivität des extrinsischen Systems der sekundären Hämostase in vier Versuchsgruppen bestimmt: B6 Mäuse mit F2KD Fibrosarkomen, die entweder eine Doxycyclin-induzierte Depletion des Prothrombins erfuhren (Tumor + Dox) oder unbehandelt blieben (Tumor – Dox), sowie B6 Mäuse ohne Tumor, die ebenfalls entweder Doxycyclin erhielten (kein Tumor + Dox) oder nicht (kein Tumor – Dox).

Zur Bestimmung der Blutungszeit wurden die Mäuse betäubt und es wurden 2 mm der Schwanzspitze mit einem Skalpell abgetrennt. Die sich bildenden Blutropfen wurden alle 20 Sekunden mit einem Filterpapier abgetupft und die Zeit bis zum Sistieren der Blutung gemessen (siehe Kapitel 2.2.5). Die Prothrombinzeit wurde mit einem Gerinnungs-Analysator ermittelt. Hierfür wurde den Mäusen Blut aus der Vena facialis entnommen und mit Trinatriumcitrat ungerinnbar gemacht. Anschließend wurde hieraus Citratplasma gewonnen und im Verhältnis 1:3 mit DPBS (ohne Calcium) verdünnt.

Die Analyse der Blutungszeit ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den vier Versuchsgruppen (Abbildung 14A). Der Vergleich der Mäuse mit und ohne Tumor legt nahe, dass Fibrosarkome keinen wesentlichen Einfluss auf die primäre Hämostase haben. Ebenso zeigte das Tumor-intrinsische Prothrombin keinen signifikanten Einfluss auf die Blutungszeit, wie der Vergleich der Tumor-tragenden Mäuse mit und ohne Doxycyclin-induzierter Prothrombin-Depletion verdeutlicht.

Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der Prothrombinzeit (Abbildung 14B) signifikante Unterschiede. Mäuse mit Tumoren, unabhängig von einer Doxycyclin-Behandlung, wiesen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen ohne Tumore eine verkürzte Prothrombinzeit auf. Dieses Ergebnis deutet auf einen prokoagulatorischen Einfluss der Fibrosarkome auf das Blutgerinnungssystem hin. Interessanterweise übte das Tumor-intrinsische Prothrombin, wie der Vergleich der Tumor-tragenden Mäuse mit und ohne Doxycyclin-Behandlung zeigt, keinen Einfluss auf die Prothrombinzeit aus.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Fibrosarkome die sekundäre Hämostase, nicht aber die primäre Hämostase signifikant beeinflussen. Das Tumor-intrinsische Prothrombin scheint hingegen weder auf das eine noch auf das andere System einen signifikanten Einfluss zu haben. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass die Menge des Tumorgenerierten Prothrombins im Vergleich zur Gesamtkonzentration von Prothrombin im Organismus zu gering ist, um eine spürbare Auswirkung auf die Hämostase zu erzielen. Eine detaillierte Diskussion und wissenschaftliche Einordnung dieser Ergebnisse erfolgt in Kapitel 4.2.



**Abbildung 14: Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Hämostase**  
 Vergleich der Blutungszeit (A) und der Prothrombinzeit (B) in vier Versuchsgruppen: B6-Mäuse mit F2KD-Fibrosarkomen, die entweder eine Doxycyclin-induzierte Prothrombin-Depletion erhielten (Tumor + Dox) oder unbehandelt blieben (Tumor – Dox), sowie B6 Mäuse ohne Tumor, die ebenfalls entweder mit Doxycyclin behandelt wurden (kein Tumor + Dox) oder nicht (kein Tumor – Dox). Die Ergebnisse zeigen, dass die Tumore die Prothrombinzeit signifikant verkürzen, während weder Tumore noch Tumor-intrinsisches Prothrombin die Blutungszeit beeinflussen. Jeder Datenpunkt repräsentiert eine einzelne Maus. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

### 3.4 Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf das Tumorwachstum

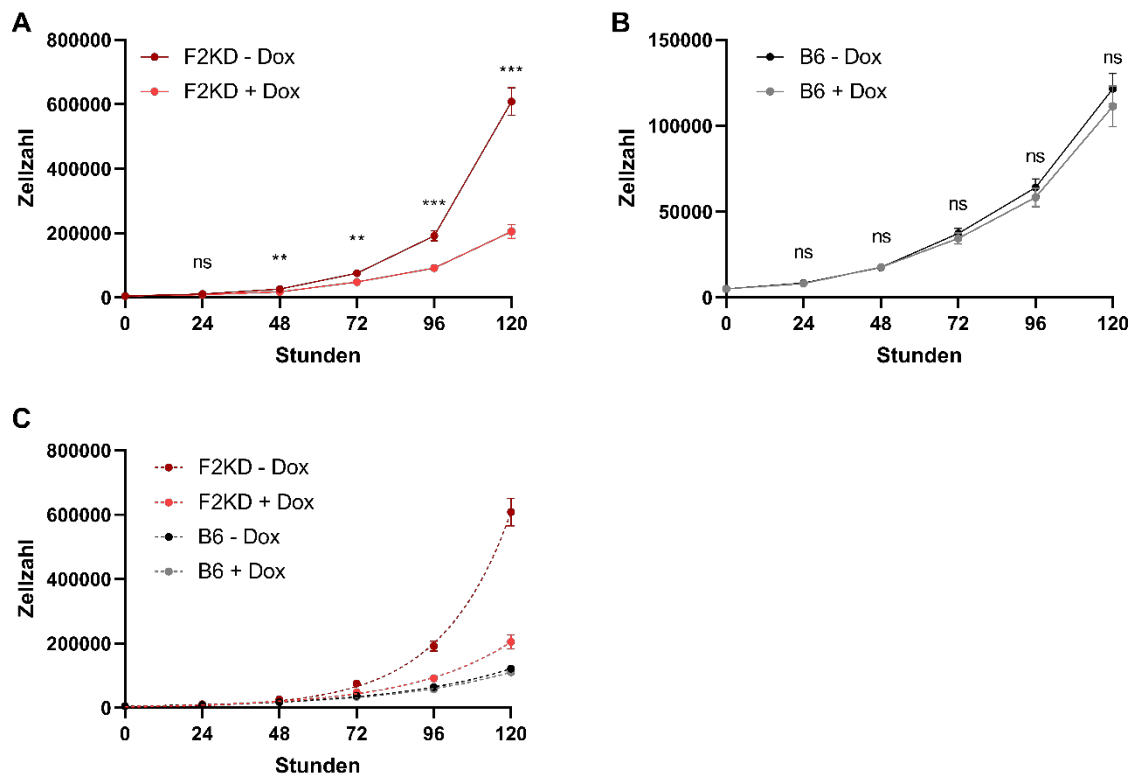
Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf das Wachstum von Fibrosarkomen untersucht. Es ist bekannt, dass Thrombin über verschiedene Mechanismen tiefgreifenden Einfluss auf die Tumorbiologie, einschließlich des Tumorwachstums, ausübt (siehe Kapitel 1.4.2). Nachfolgend wird untersucht, ob und in welchem Ausmaß auch Tumor-intrinsisches Prothrombin das Tumorwachstum beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde sowohl die Zellproliferation *in vitro* als auch das Tumorwachstum *in vivo* analysiert.

#### 3.4.1 Tumorwachstum *in vitro* – Zellproliferation

Um die Effekte von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Zellproliferation von Fibrosarkomen zu bestimmen, wurden die Zellen *in vitro* kultiviert und ihr Wachstum über mehrere Tage beobachtet. Es wurden vier verschiedene Zellkulturen in biologischen Triplikaten untersucht: F2KD Fibrosarkom-Zellen mit (F2KD + Dox) und ohne (F2KD – Dox) Doxycyclin-induzierter Depletion von Prothrombin, sowie B6 Fibrosarkom-Zellen ebenfalls mit (B6 + Dox) und ohne Zugabe von Doxycyclin (B6 – Dox). Jede Kultur wurde initial mit 5000

Zellen ausgesät und die Zellzahl wurde über fünf Tage hinweg alle 24 Stunden mittels Zellzählung bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Depletion von Prothrombin in den F2KD Fibrosarkom-Zellkulturen zu einer signifikanten Reduktion der Proliferationsrate im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führte (Abbildung 15A und C). Konkret wiesen die Zellkulturen mit Prothrombin-Knockdown eine mittlere Wachstumsrate von  $0,032 \text{ h}^{-1}$  bei exponentiellem Wachstum auf, was einer Verdopplungszeit von 21,6 Stunden entspricht. Im Vergleich dazu hatten die unbehandelten Zellen (F2KD - Dox) eine Wachstumsrate von  $0,046 \text{ h}^{-1}$  und benötigten somit nur 15 Stunden zur Verdopplung ihrer Zellzahl. In den B6-Fibrosarkom-Zellkulturen zeigte sich hingegen kein Unterschied in der Proliferationsrate, unabhängig von der Zugabe von Doxycyclin. Dies schließt eine direkte Wirkung von Doxycyclin auf die Zellproliferation von Fibrosarkom-Zellen aus (Abbildung 15B und C). Diese Ergebnisse zeigen somit, dass Tumor-intrinsisches Prothrombin in vitro eine proliferationsfördernde Wirkung auf Fibrosarkom-Zellen ausübt.

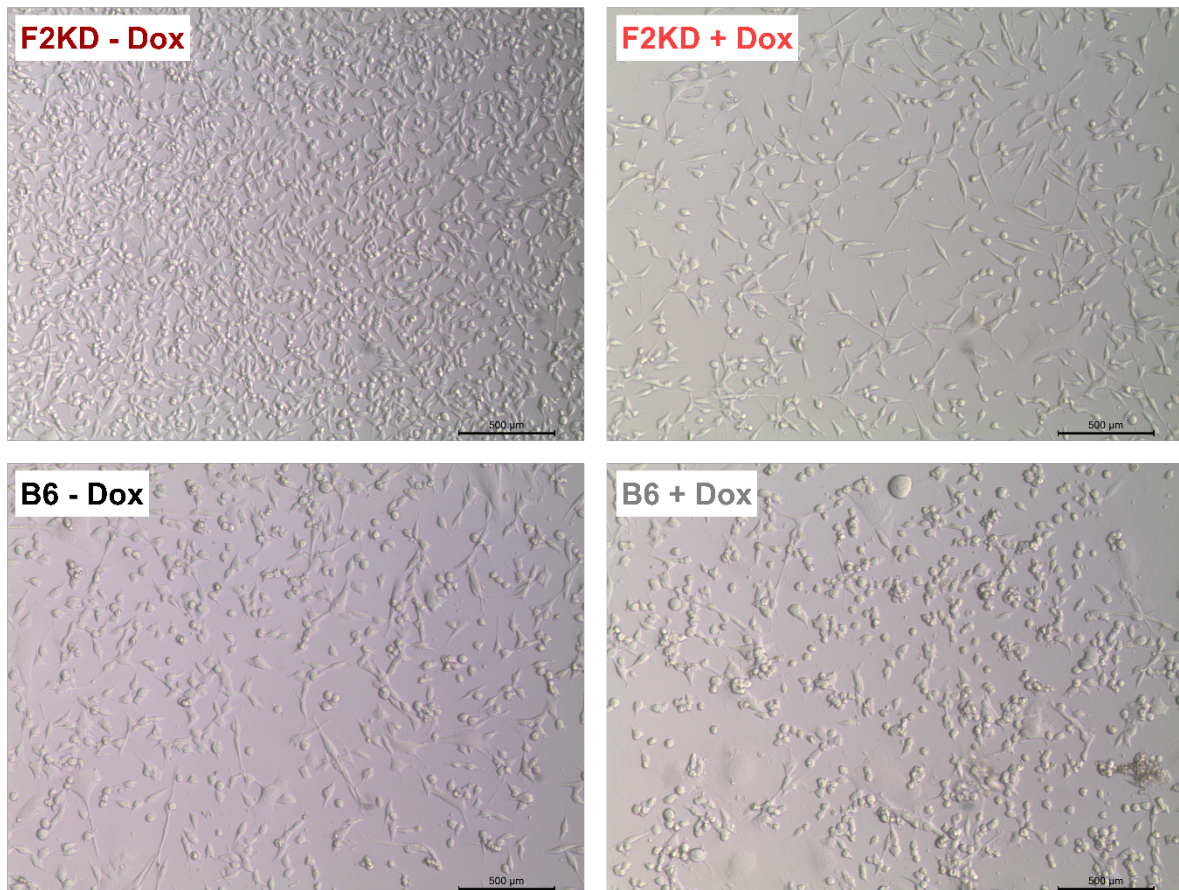


**Abbildung 15: Verlangsamte Zellproliferation nach Depletion von im Tumor exprimiertem Prothrombin**

Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit von Fibrosarkom-Zellen durch Bestimmung der Zellzahl alle 24 Stunden nach der Aussaat von 5000 Zellen. (A) Die Depletion von Prothrombin (F2KD + Dox) führt zu einer signifikanten Verringerung der Proliferationsrate im Vergleich zu unbehandelten Zellen (F2KD - Dox). (B) In den B6 Fibrosarkom-Zellen zeigt sich kein Unterschied in der Proliferationsrate, unabhängig von der Doxycyclin-Behandlung, was eine direkte Wirkung von Doxycyclin ausschließt. (C) Die nichtlineare Regression (gestrichelte Linie) verdeutlicht das exponentielle Wachstum der Tumorzellen.

Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von drei biologischen Replikaten. Die statistische Auswertung erfolgte separat für jedes Zeitintervall mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Zellkulturen am fünften Tag vor der Zellzählung mikroskopisch fotografiert (Abbildung 16). Die F2KD Fibrosarkom-Zellkulturen mit Prothrombin-Depletion weisen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (F2KD – Dox) eine wesentlich geringere Zelldichte auf, während in den B6 Fibrosarkom-Zellkulturen kein wesentlicher Unterschied der Zelldichte zu erkennen ist.



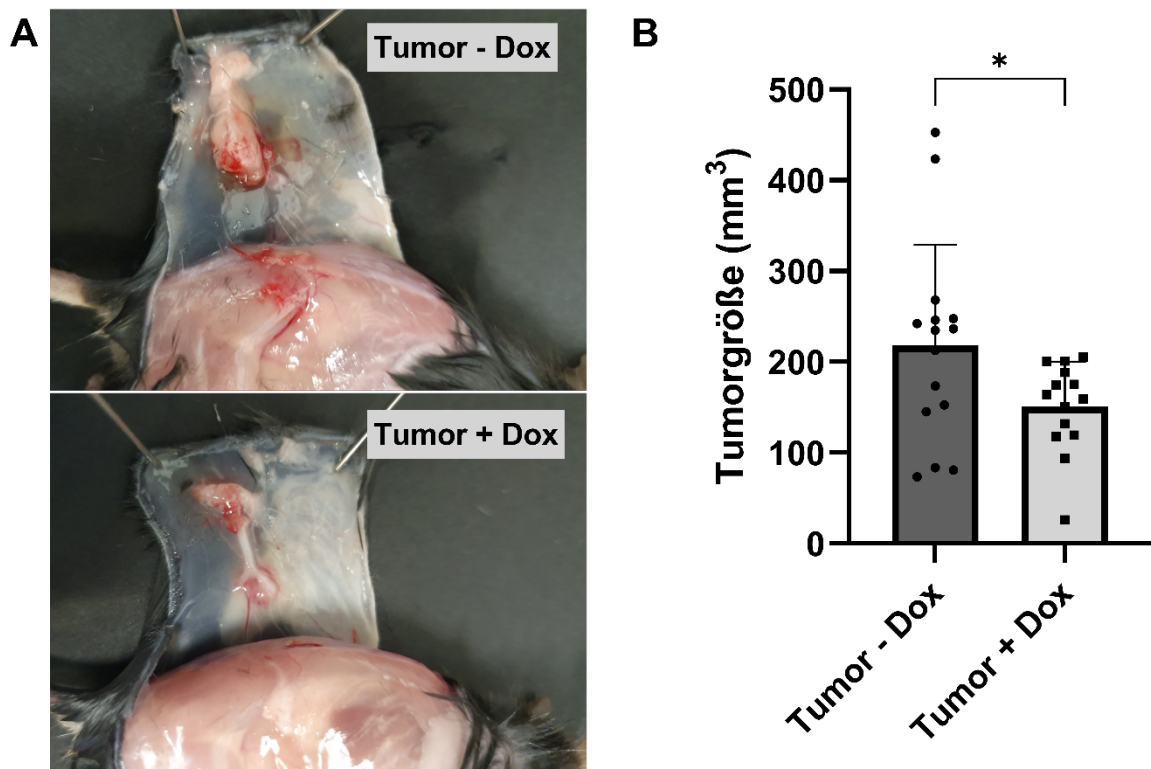
**Abbildung 16: Mikroskopische Darstellung der Zellproliferation**

Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von F2KD Fibrosarkom-Zellkulturen mit (F2KD + Dox) und ohne (F2KD – Dox) Doxycyclin-induzierter Depletion des Tumor-generierten Prothrombins, sowie B6 Fibrosarkom-Zellkulturen mit (B6 + Dox) und ohne (B6 – Dox) Zugabe von Doxycyclin. Die Fotos wurden fünf Tage nach Aussaat von jeweils 5000 Zellen aufgenommen. Die Zellen mit Prothrombin-Knockdown weisen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (F2KD – Dox) eine wesentlich geringere Zelldichte auf, während in den B6 Fibrosarkom-Zellkulturen kein wesentlicher Unterschied der Zelldichte zu erkennen ist.

### 3.4.2 Tumorwachstum in vivo

Infolge des Nachweises der proliferationssteigernden Wirkung von Tumor-intrinsischem Prothrombin in vitro wurde untersucht, ob sich dieser Effekt auch im lebenden Organismus widerspiegelt. Dazu wurden in B6 Mäusen Fibrosarkome durch die Injektion von 500.000 F2KD-Fibrosarkom-Zellen in die rechte Flanke induziert. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen eingeteilt: Eine Gruppe erhielt Doxycyclin, um die Prothrombin-Expression mittels Knockdown zu unterdrücken, während die andere Gruppe unbehandelt blieb und somit eine normale Prothrombin-Expression aufwies.

Nach der Injektion wurden die Mäuse täglich durch Abtasten auf das Anwachsen von Tumoren überprüft. Am siebten Tag nach der Zelinjektion wurde die Tumorgöße mit einem digitalen Messschieber erfasst. Da die Fibrosarkome in ihrer Form am ehesten einem Ellipsoid entsprachen, wurde das Tumolvolumen näherungsweise mit der Volumenformel für Rotationsellipsoide berechnet (siehe Kapitel 2.2.4). Die Ergebnisse zeigen ein signifikant geringeres Tumolvolumen bei den Fibrosarkomen, die durch Doxycyclin in der Prothrombin-Expression gehemmt wurden (Tumor + Dox), im Vergleich zu den Fibrosarkomen der unbehandelten Kontrollgruppe (Tumor - Dox) (Abbildung 17). Da nur die Tumorzellen und nicht die Mäuse selbst die Doxycyclin-induzierbare RNA-Interferenz tragen, ist der wachstumssteigernde Effekt spezifisch dem Tumor-intrinsischen Prothrombin zuzuordnen.



**Abbildung 17: Vermindertes Tumorstadium nach Depletion von Tumor-intrinsischem Prothrombin**  
Darstellung der Tumorstößen bei B6 Mäusen 7 Tage nach Injektion von 500.000 F2KD Fibrosarkom-Zellen pro Maus. Es werden Fibrosarkome mit (Tumor + Dox) und ohne (Tumor - Dox) Doxycyclin-induzierter Depletion des Tumor-generierten Prothrombins verglichen. (A) Repräsentative Aufnahmen von Fibrosarkomen mit und ohne Prothrombin-Knockdown. (B) Die quantitative Auswertung der Tumorstößen zeigt, dass Tumore mit unterdrückter Prothrombin-Expression ein signifikant geringeres Wachstum aufweisen als Tumore ohne diese Unterdrückung. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Tumor. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Tumor-intrinsisches Prothrombin sowohl in vitro die Zellproliferation als auch in vivo das Tumorstadium von Fibrosarkomen signifikant fördert.

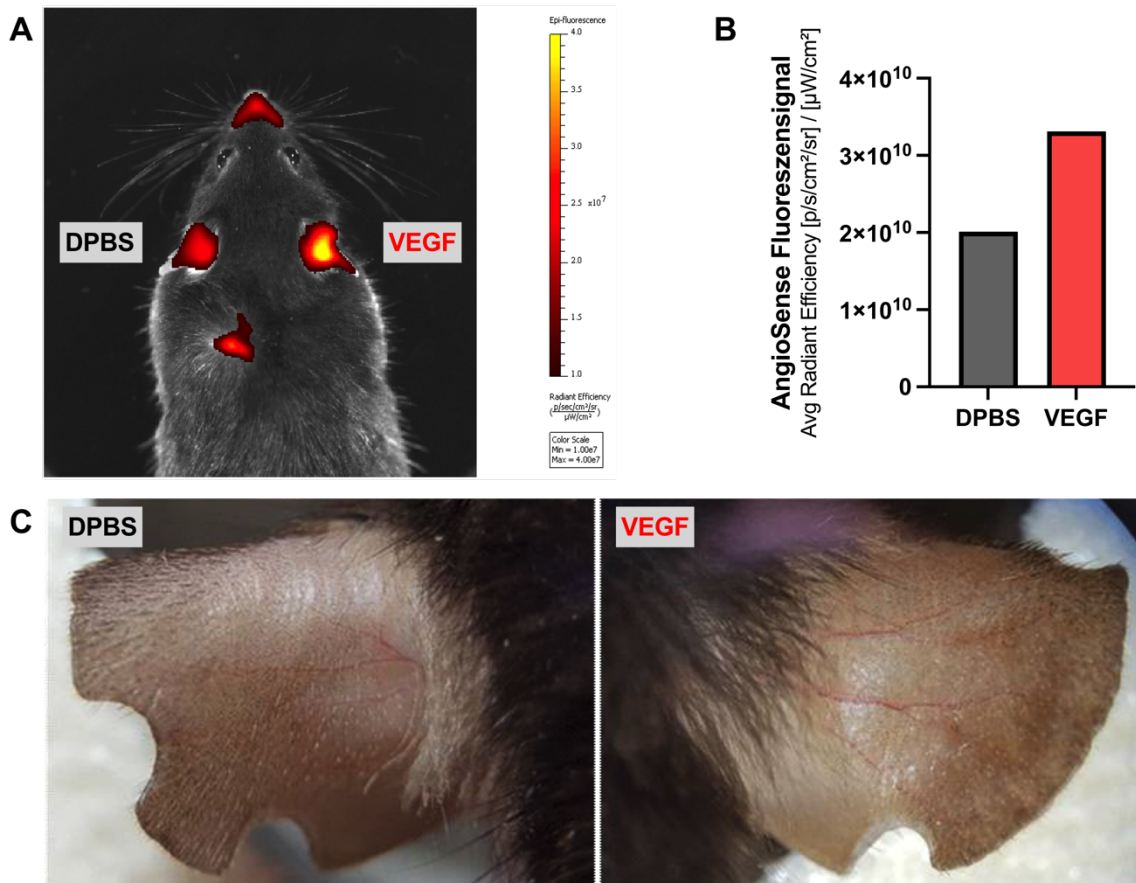
### **3.5 Einfluss von Thrombin und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese**

Die Tumorangiogenese ist ein zentraler Prozess in der Tumorbilogie, da sie durch die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen die Versorgung des Tumors mit Sauerstoff und Nährstoffen sicherstellt. Dies ist essenziell sowohl für das Wachstum als auch die Metastasierung von Tumoren. Die Tumorangiogenese ist ein komplexer Prozess, der durch zahlreiche Faktoren, darunter Thrombin, beeinflusst wird (siehe Kapitel 1.1.3 und 1.4.2). Im Folgenden wurde zunächst eine Methode getestet, um Angiogenese in vivo zuverlässig messen und quantifizieren zu können. Danach wurde mit dieser Methode die durch rekombinantes Thrombin induzierte Angiogenese untersucht, gefolgt von der Analyse des Einflusses von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese in Fibrosarkomen.

#### **3.5.1 Methode zur Quantifizierung der Angiogenese mittels VEGF-induzierter Angiogenese**

Um den Einfluss von Thrombin und Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese zu untersuchen, musste zunächst eine zuverlässige Methode zur Bestimmung der Angiogenese gefunden werden. Zu diesem Zweck wurde der Fluoreszenzmarker AngioSense getestet. AngioSense ist ein Makromolekül, das aufgrund der erhöhten Gefäßpermeabilität während der Angiogenese aus den Blutgefäßen austritt und sich im umliegenden Gewebe anreichert, wo es mittels Fluoreszenzbildgebung detektiert werden kann. Um die Eignung von AngioSense zur Detektion der Angiogenese zu testen, wurde VEGF, ein bekannter und gut charakterisierter Stimulator der Angiogenese, verwendet.

VEGF wurde über einen Zeitraum von zehn Tagen alle zwei Tage in das rechte Ohr einer B6 Maus injiziert, während das linke Ohr zur Kontrolle mit DPBS behandelt wurde. 24 Stunden nach der letzten VEGF-Injektion wurde AngioSense in die Schwanzvene verabreicht. Weitere 24 Stunden später erfolgte die in vivo Fluoreszenzbildgebung mit dem IVIS Spectrum System. Die Bildgebung (Abbildung 18A) zeigt hierbei ein höheres Fluoreszenzsignal im VEGF-behandelten Ohr im Vergleich zum Kontroll-Ohr (Abbildung 18B). Auch der Vergleich der Nahaufnahmen beider Ohren deutet eine gesteigerte Angiogenese in dem VEGF-behandelten Ohr an (Abbildung 18C). Ziel dieses Versuchs war es, die Eignung des Markers zur Detektion der Angiogenese zu testen, und nicht, den Einfluss von VEGF auf die Angiogenese statistisch signifikant zu quantifizieren. Daher wurde auf eine Ausweitung dieses Versuchs mit mehreren Versuchstieren verzichtet.

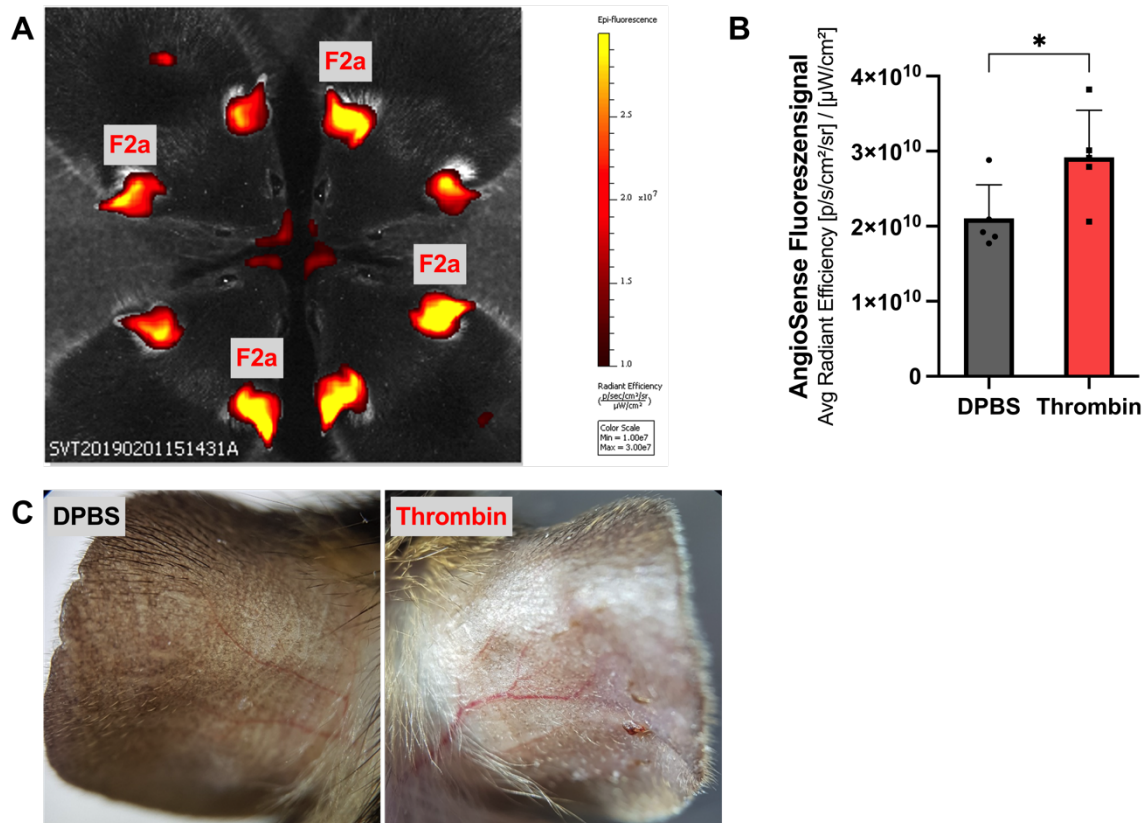


**Abbildung 18: VEGF-induzierte Angiogenese im Mausohr**

Vergleich der Angiogenese in den Ohren einer B6 Maus nach wiederholter intradermaler Injektion von VEGF in das rechte Ohr bzw. von DPBS als Kontrolle in das linke Ohr. (A) Darstellung der Angiogenese in den Ohren mit dem in vivo Bildgebungssystem IVIS Spectrum, 24 Stunden nach intravenöser Injektion des Fluoreszenzmarkers AngioSense. (B) Quantifizierung des Fluoreszenzsignals als "Average Radiant Efficiency" mit der Living Image Software. (C) Nahaufnahmen der Ohren zur Darstellung der Blutgefäße.

### 3.5.2 Rekombinantes Thrombin induziert Angiogenese in Mausohren

Im nächsten Schritt wurde die direkte Wirkung von Thrombin auf die Angiogenese im Mausohrenmodell untersucht. Dazu wurde in die rechten Ohren von B6 Mäusen rekombinantes Thrombin injiziert, während die linken Ohren zur Kontrolle mit DPBS behandelt wurden. Anschließend wurde mit dem Fluoreszenzmarker AngioSense und dem in vivo Bildgebungssystem IVIS das Signal in den Ohren bestimmt. Ähnlich wie bei der VEGF-Injektion zeigten die Ohren mit Thrombin-Behandlung ein höheres Signal als die Kontrollohren (Abbildung 19A). Wie vom Hersteller von AngioSense empfohlen, wurde das Signal als "Average Radiant Efficiency" quantifiziert. Hierbei konnten signifikante Unterschiede in den beiden Gruppen festgestellt werden (Abbildung 19B). Auch die Untersuchungen der Nahaufnahmen der Ohren deuten auf eine gesteigerte Angiogenese in den Thrombin-behandelten Ohren im Vergleich zu den DPBS-behandelten Ohren hin (Abbildung 19C).



**Abbildung 19: Thrombin-induzierte Angiogenese in Mausohren**

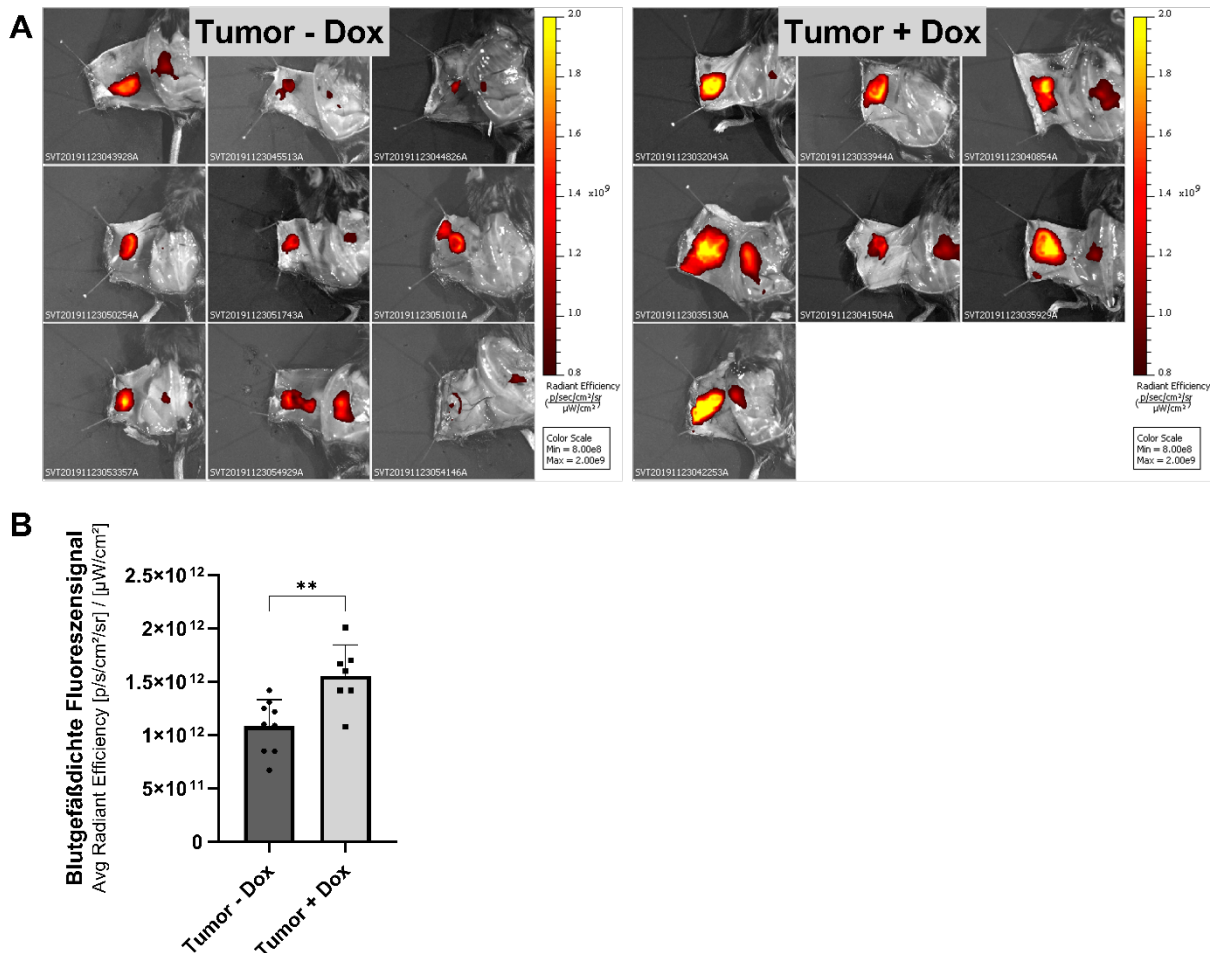
Darstellung der Angiogenese in den Ohren von B6 Mäusen nach wiederholter intradermaler Injektion von rekombinantem Thrombin (F2a) in das rechte Ohr bzw. von DPBS als Kontrolle in das linke Ohr. (A) Darstellung der Angiogenese in den Ohren mit dem in vivo Bildgebungssystem IVIS Spectrum, 24 Stunden nach intravenöser Injektion des Fluoreszenzmarkers AngioSense. (B) Quantifizierung des Fluoreszenzsignals als "Average Radiant Efficiency" zum Vergleich der Angiogenese in beiden Gruppen, ermittelt mit der Living Image Software. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Ohr. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %. (C) Nahaufnahmen eines repräsentativen Ohrenpaares zur Darstellung der Blutgefäße.

### 3.5.3 Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese

Schließlich wurde der Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Tumorangiogenese in Fibrosarkomen untersucht. Hierfür wurden in B6 Mäusen Tumore durch Injektion von jeweils 500.000 F2KD Fibrosarkom-Zellen induziert. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: Eine Gruppe erhielt Doxycyclin, um die Prothrombin-Expression mittels Knockdown zu unterdrücken, während die andere Gruppe unbehandelt blieb und somit eine normale Prothrombin-Expression aufwies.

Am neunten Tag nach der Injektion wurden die Tumorgößen wie in Kapitel 3.4.2 ermittelt. Anschließend wurde der Fluoreszenzmarker AngioSense intravenös verabreicht. 24 Stunden nach der Injektion von AngioSense wurden die Mäuse euthanasiert und präpariert. Die anschließende Fluoreszenzbildgebung mit dem IVIS-System zeigte in allen Tumoren ein Fluoreszenzsignal oberhalb des Hintergrundniveaus, was die Tumorangiogenese in den Fibrosarkomen bestätigt (Abbildung 20A). Überraschenderweise zeigten die Fibrosarkome mit unterdrückter Prothrombin-Expression ein signifikant stärkeres Signal als die Tumore ohne Prothrombin-Depletion. Dies deutet darauf hin, dass Prothrombin in diesem spezifischen Kontext eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese ausübt. Dies steht im Widerspruch zu

den zuvor festgestellten und in der Literatur gut dokumentierten proangiogenen Effekten von Thrombin. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Thrombin selbst zwar durch Induktion von angiogenen Faktoren wie VEGF und MMPs die Blutgefäßbildung fördert, jedoch Spaltprodukte, die bei der Prothrombin-Expression entstehen, eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese ausüben. Ebenso könnte die Wirkung von Prothrombin und Thrombin auf die Angiogenese kontext- und umgebungsabhängig sein und je nach Gewebe oder Tumor variieren. Eine detaillierte Diskussion und wissenschaftliche Einordnung dieser Ergebnisse erfolgt in Kapitel 4.4.

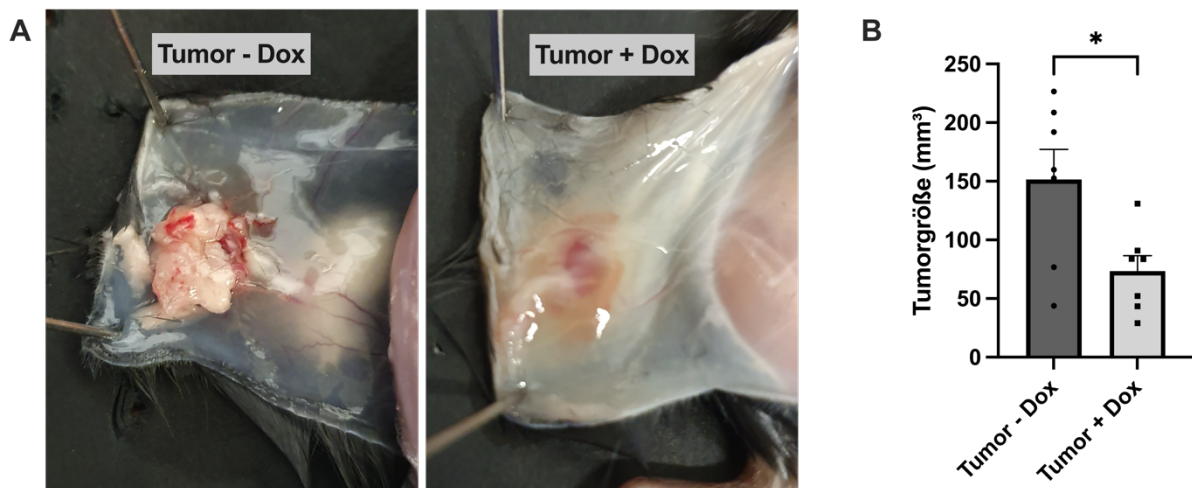


**Abbildung 20: Prothrombin-Depletion fördert die Angiogenese in Fibrosarkomen**

Darstellung der Angiogenese in Fibrosarkomen in B6 Mäusen, 9 Tage nach Injektion von 500.000 F2KD Fibrosarkom-Zellen pro Maus. Es werden Fibrosarkome mit (Tumor + Dox) und ohne (Tumor - Dox) Doxycyclin-induzierter Depletion des Tumor-generierten Prothrombins verglichen. (A) Darstellung der Angiogenese in den Fibrosarkomen mit dem in vivo Bildgebungssystem IVIS Spectrum, 24 Stunden nach intravenöser Injektion des Fluoreszenzmarkers AngioSense. (B) Quantifizierung des Fluoreszenzsignals als "Average Radiant Efficiency" zum Vergleich der Angiogenese in beiden Gruppen, ermittelt mit der Living Image Software. Jeder Datenpunkt repräsentiert einen Tumor. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

Zusätzlich zur Untersuchung der Angiogenese wurde, wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben, das Tumolvolumen der Fibrosarkome bestimmt. Da die Tumorzellen in diesem Experiment nicht über denselben Zeitraum in den Mäusen gewachsen sind wie in dem vorhergehenden

Experiment, konnten die Daten nicht zusammengefasst werden. Daher erfolgt die Analyse des Tumolvolumens noch einmal separat für die Tumore aus dem Angiogeneseversuch. Wie zuvor zeigt die Analyse, dass die Fibrosarkome mit unterdrückter Prothrombin-Expression (Tumor + Dox) ein signifikant geringeres Tumolvolumen aufwiesen als die Fibrosarkome der unbehandelten Kontrollgruppe (Tumor - Dox) (Abbildung 21). Diese Beobachtung untermauert die bereits in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Ergebnisse, dass Tumor-intrinsisches Prothrombin eine fördernde Wirkung auf das Tumorstadium hat.



**Abbildung 21: Vermindertes Tumorstadium durch Depletion von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression**

Darstellung der Tumorstadium in B6 Mäusen, 9 Tage nach Injektion von 500.000 F2KD Fibrosarkom-Zellen pro Maus. Es werden Fibrosarkome mit (Tumor + Dox) und ohne (Tumor - Dox) Doxycyclin-induzierter Depletion des Tumor-generierten Prothrombins verglichen. (A) Repräsentative Fotos von Fibrosarkomen mit und ohne Prothrombin-Knockdown. (B) Die quantitative Auswertung der Tumorstadium zeigt, dass Tumore mit unterdrückter Prothrombin-Expression ein signifikant geringeres Wachstum aufweisen als Tumore ohne diese Unterdrückung. Jeder Datenpunkt stellt einen Tumor dar. Der Vergleich der beiden Gruppen erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 %.

## 4 Diskussion

Thrombin wurde lange Zeit hauptsächlich als zentrale Komponente der Blutgerinnung angesehen. In den letzten Jahrzehnten hat sich das Verständnis seiner Funktionen jedoch erheblich erweitert. Heute ist bekannt, dass Thrombin, insbesondere durch die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren, zahlreiche nicht-hämostatische Prozesse steuert, darunter die Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose in verschiedenen Zelltypen (148-151) (siehe Kapitel 1.3.5 und Kapitel 1.4). Thrombin spielt eine wesentliche Rolle in physiologischen Prozessen wie der Embryonalentwicklung, Angiogenese, Organregeneration sowie in Funktionen des Nerven- und Immunsystems (152-161). Zudem ist es an pathologischen Prozessen, etwa an Entzündungsreaktionen und der Tumorbilogie, beteiligt (162-164) (siehe Kapitel 1.4, Kapitel 1.4.1 und Kapitel 1.4.2).

Der Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und Krebs ist seit dem 19. Jahrhundert bekannt und wurde erstmals von Armand Trousseau beschrieben (204). Das sogenannte Trousseau-Syndrom bezeichnet das Auftreten von Thrombosen bei Krebserkrankungen. Während Tumore einen hyperkoagulatorischen Zustand mit der Entwicklung von Thrombosen verursachen können, fördert umgekehrt auch eine pathologisch gesteigerte Blutgerinnung die Tumorprogression durch erhöhte Proliferation, Invasion und Metastasierung (205-209). Thrombin spielt hierbei eine entscheidende Rolle bei der Förderung dieser "Tumor-Hallmarks" (siehe Kapitel 1.4.2). Prothrombin, das Zymogen von Thrombin, wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, kann jedoch auch in anderen Geweben, einschließlich dem Nervensystem, in Knochen, Nieren und verschiedenen Tumoren, exprimiert werden (165-171). Der spezifische Einfluss von Tumor-generiertem Prothrombin auf die Tumorbilogie und potenzielle Unterschiede zum Leber-generierten Prothrombin sind bislang nicht bekannt.

In dieser Dissertation wurde der Einfluss von Tumor-generiertem Prothrombin in Fibrosarkomen auf Blutgerinnung, Tumorstadium und Angiogenese untersucht. Die Hypothese lautete: Tumore fördern durch eine intrinsische Expression von Prothrombin ihre eigene Progression. Um diese Hypothese zu testen, wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Experimente mit genetisch modifizierten Fibrosarkomen durchgeführt.

### 4.1 Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin

Ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis einer Tumor-intrinsischen Expression von Prothrombin in Fibrosarkomen. Dieser Nachweis konnte sowohl *in vivo* als auch *ex vivo* erbracht werden (siehe Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2). Mittels biolumineszenter Bildgebung konnte in genetisch modifizierten D-Insight Fibrosarkomen in B6 Mäusen eine Tumor-intrinsische Prothrombin-Expression detektiert werden (siehe Abbildung 12A). Dieser Befund wurde *ex vivo* durch den Nachweis von Prothrombin mRNA in Fibrosarkomen mittels F2 RNA Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bestätigt (siehe Abbildung 12B und Abbildung 13).

Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Forschungsarbeiten, die ebenfalls eine Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin in verschiedenen Tumorentitäten nachweisen konnten. Hierzu zählen Prostatakarzinome (235), Gliome (171) und Caco-2-Zellen, die aus einem kolorektalen Adenokarzinom stammen (169). Allerdings gibt es im Gegensatz dazu auch Tumore, die keine Prothrombin-Expression aufweisen, wie beispielsweise die Brustkrebszelllinien MCF-7 und SK-BR-3, was von Dunjic et al. gezeigt wurde (169).

Interessanterweise exprimieren MCF-7-Zellen jedoch den Thrombinrezeptor PAR-1, was auf eine mögliche direkte Wirkung von Thrombin auf diese Krebszellen hindeutet (236).

Diese Beobachtungen werfen die Fragen auf, warum bestimmte Krebsarten Prothrombin exprimieren, während dies bei anderen Tumoren nicht der Fall ist, und welche spezifische Rolle jeweils Leber-exprimiertes bzw. Tumor-exprimiertes Prothrombin in den unterschiedlichen Tumorentitäten spielt. Um diese Fragen zu beantworten, sind weitere Forschungen erforderlich, die verschiedene Tumore systematisch hinsichtlich ihrer Prothrombin-Expression untersuchen und die funktionellen Auswirkungen des Tumor-exprimierten Prothrombins auf diese Tumore analysieren. Zusätzlich zur direkten Untersuchung der Tumore wäre es außerdem interessant zu erforschen, ob und inwiefern das Tumor-Mikromilieu, einschließlich Faktoren wie Hypoxie und Entzündungsprozesse, die Prothrombin-Expression in den Tumorzellen beeinflusst, und wie sich das auf die Tumorprogression auswirkt.

## **4.2 Hämostase: Einfluss von Fibrosarkomen und Tumor-intrinsischem Prothrombin**

Es ist gut belegt und umfangreich erforscht, dass Tumore die Hämostase beeinflussen und häufig zu einem hyperkoagulatorischen Zustand führen, der die Entstehung von Thrombosen begünstigt (237). Bei 15-20 % der Krebspatienten treten venöse Thrombosen auf, wobei das Risiko für deren Entwicklung bei Krebspatienten etwa um das 4- bis 7-fache im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht ist (238-240). Aus diesem Grund wird eine idiopathische Thrombose oft als Hinweis auf eine möglicherweise noch nicht diagnostizierte Krebserkrankung angesehen (163).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Fibrosarkomen auf die Prothrombinzeit als Indikator für die Aktivität des extrinsischen Systems der sekundären Hämostase untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Prothrombinzeit bei Fibrosarkom-tragenden Mäusen signifikant kürzer war als bei Tumor-freien Mäusen (siehe Abbildung 14B). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, die eine Hyperkoagulation als häufige Begleiterscheinung maligner Erkrankungen beschreiben. Hierfür sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Krebszellen interagieren mit Blutzellen und setzen inflammatorische Zytokine frei, die die Hämostase beeinflussen (241). Zudem sezernieren Tumore prokoagulatorische Faktoren wie den Tissue Factor und weitere Faktor-X-Aktivatoren (242). TF ist der Initiator des extrinsischen Systems der sekundären Hämostase und fördert über die Aktivierung von Faktor X die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin (siehe Kapitel 1.2.2). Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Fibrosarkome in der Lage sind, selbst Prothrombin zu exprimieren (siehe Kapitel 3.2.1 und Kapitel 3.2.2).

Interessanterweise konnte in dieser Arbeit jedoch kein signifikanter Einfluss des Tumor-intrinsischen Prothrombins auf die sekundäre Hämostase nachgewiesen werden. Der Vergleich der Prothrombinzeit von Tumor-tragenden Mäusen mit und ohne Doxycyclin-induziertem Knockdown der Prothrombin-Expression zeigte keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 14B). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass das von den Tumorzellen exprimierte Prothrombin quantitativ nicht ausreicht, um die Gerinnung merklich zu beeinflussen. Zum einen ist der Anteil des Tumor-intrinsischen Prothrombins an der Gesamtprothrombin-Konzentration womöglich zu gering. Zum anderen führt der Doxycyclin-induzierte Knockdown in den F2KD Fibrosarkomen nicht zu einer vollständigen Unterdrückung

der Prothrombin-Expression, sondern reduziert diese nur um etwa 80 % (170). Ebenfalls wäre denkbar, dass das Tumor-intrinsische Prothrombin keine systemische Wirkung entfaltet, sondern eher eine autokrine oder parakrine Rolle in der Tumorbiologie spielt, also hauptsächlich den Tumor selbst und dessen unmittelbare Umgebung beeinflusst, jedoch keinen maßgeblichen Effekt auf die sekundäre Hämostase hat.

Im Gegensatz zur Prothrombinzeit, einem Marker der sekundären Hämostase, konnte kein signifikanter Einfluss der Fibrosarkome auf die Blutungszeit, einem Maß für die primäre Hämostase, festgestellt werden (siehe Abbildung 14A). Während die Auswirkungen von Tumoren auf die sekundäre Hämostase in der Literatur umfangreich beschrieben sind, ist ihr Einfluss auf die primäre Hämostase weniger ausführlich dokumentiert. Tumore wirken sich auf verschiedene Parameter der primären Hämostase aus, etwa die Thrombozytenaktivierung und -aggregation (242) sowie die Plasmaspiegel von vWF und der Gerinnungsfaktoren VIII und IX (243). Dennoch scheint die primäre Hämostase von Krebserkrankungen weniger stark betroffen zu sein als die sekundäre Hämostase. Dies wurde etwa in einer Meta-Analyse von Winther-Larsen et al. dokumentiert, die 26 Veröffentlichungen mit insgesamt 3288 Patienten untersuchte (244). Diese Analyse zeigt, dass Patienten mit Hirntumoren eine erhöhte Inzidenz von Thrombosen, eine gesteigerte sekundäre Hämostase und eine reduzierte Fibrinolyse aufwiesen, jedoch keine konsistente Steigerung der primären Hämostase präsentierten.

Auch bei der Untersuchung des Tumor-exprimierten Prothrombins konnte kein signifikanter Einfluss auf die Blutungszeit festgestellt werden (siehe Abbildung 14A). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zur bekannten Funktion von Thrombin als wesentlichem Aktivator von Thrombozyten und somit wichtigem Promotor der primären Hämostase (245-247). Eine mögliche Erklärung könnte auch hier ein zu geringer Anteil des Tumor-intrinsischen Prothrombins an der Gesamtprothrombin-Konzentration sein, oder dass Tumor-intrinsisches Prothrombin nur eine lokal begrenzte Wirkung hat.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Fibrosarkome im Rahmen der in dieser Arbeit untersuchten Parameter eine signifikante Wirkung auf die sekundäre Hämostase haben, die primäre Hämostase jedoch nicht maßgeblich beeinflussen. Das Tumor-intrinsische Prothrombin zeigte hingegen weder auf das eine noch auf das andere System signifikante Auswirkungen. Dies möglicherweise aufgrund einer nur lokal begrenzten Wirkung auf die Tumore und deren unmittelbare Umgebung, oder weil die Menge an Tumor-exprimiertem Prothrombin für einen maßgeblichen systemischen Effekt nicht ausreicht.

### **4.3 Tumorwachstum: Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin**

Es ist gut belegt, dass das Gerinnungssystem, im Speziellen auch Thrombin, das Wachstum von Tumoren fördern kann (siehe Kapitel 1.4.2). In dieser Arbeit konnte nun nachgewiesen werden, dass auch Tumor-intrinsisches Prothrombin eine solche pro-tumorigene Wirkung entfaltet. In vitro Untersuchungen von Fibrosarkom-Zellen zeigten eine signifikant geringere Proliferationsrate bei Zellen mit unterdrückter Prothrombin-Expression im Vergleich zu Zellen mit unbeeinflusster Prothrombin-Expression (siehe Abbildung 15). Die zugrundeliegenden Mechanismen, durch die Tumor-intrinsisches Prothrombin die Proliferation von Fibrosarkom-Zellen fördert, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt.

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass Thrombin über den Protease-aktivierten Rezeptor 1 eine mitogene Wirkung auf verschiedene Zelltypen, einschließlich

Tumorzellen, entfaltet (148, 163, 248-251). Dies geschieht beispielsweise durch die Thrombin-induzierte Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs, der durch die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinase an der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt ist (140, 146, 252, 253). Eine Studie von Hu et al. zeigt, dass Thrombin in Prostatakrebs-Zellen und Glioblastom-Zellen PAR-1-vermittelt als Wachstumsfaktor fungiert (218). In diesen Zellen hemmt Thrombin den Zellzyklusinhibitor p27Kip1 durch Induktion von Skp2 (S-phase kinase-associated protein 2) und MiR-222 (Mikro-RNA-222), was wiederum zur Induktion von Cyclin D1 und Cyclin A führt und somit die Zellzyklusprogression fördert (217, 218). Interessanterweise konnten Zain et al. nachweisen, dass die mitogene Wirkung von Thrombin konzentrationsabhängig ist (254). Während eine niedrige Thrombinkonzentration im Zellmedium die Proliferation der Krebszellen förderte, führte eine höhere Konzentration zu einer Hemmung der Proliferation und zur Förderung der Apoptose.

Neben der in vitro nachgewiesenen proliferationsfördernden Wirkung von Tumor-intrinsischem Prothrombin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich dieser Effekt auch im lebenden Organismus widerspiegelt. In B6 Mäusen wiesen Fibrosarkome, deren Prothrombin-Expression durch Doxycyclin-induzierte RNA-Interferenz gehemmt wurde, ein signifikant geringeres Tumolvolumen auf als Tumore ohne Knockdown (siehe Abbildung 17 und Abbildung 21). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, die eine wachstumsfördernde Wirkung von Thrombin und dessen Zymogen Prothrombin auf Tumore beschrieben. So zeigten Yang et al., dass Pankreaskarzinome in Mäusen mit reduzierter Prothrombin-Expression ein signifikant geringeres Wachstum aufwiesen als in Kontrollmäusen (255). Darüber hinaus führte die Hemmung der PAR-1-Expression in den Krebszellen ebenfalls zu einem verminderten Tumorwachstum, was auf eine PAR1-vermittelte Wirkung von Thrombin auf Pankreaskarzinome hinweist. Ähnliche Ergebnisse wurden von Adams et al. beschrieben, die sowohl durch genetische als auch durch pharmakologische Reduktion der Prothrombinkonzentration in Mäusen ein eingeschränktes Wachstum von Kolonkarzinomen dokumentierten (256). Auch in Prostata- und Brustkrebsmodellen wurde in vivo eine wachstumsfördernde Wirkung von Thrombin nachgewiesen (257-259).

Die wachstumsfördernde Wirkung von Thrombin auf Tumore beruht auf einer Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen. Neben den zuvor beschriebenen direkten Effekten auf Tumorzellen spielen im lebenden Organismus auch indirekte Mechanismen eine Rolle, wie die Interaktion von Thrombin mit anderen Zelltypen und der Tumormikroumgebung sowie die Förderung der Hämostase durch Fibrinbildung (164, 201, 214). Thrombin aktiviert Immunzellen, Thrombozyten und Endothelzellen, was zur Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen führt und eine Umgebung schafft, die Angiogenese, Invasion, Metastasierung sowie Tumorwachstum unterstützt (163, 164, 201, 213-215). Ein Beispiel hierfür ist die Thrombin-vermittelte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- $\alpha$  und MCP-1, die die Rekrutierung myeloider Suppressorzellen (MDSCs), M2-artiger Makrophagen und regulatorischer T-Zellen (Tregs) fördern. Diese unterdrücken die Immunüberwachung und begünstigen so die Tumorprogression (201). Darüber hinaus induziert Thrombin die Freisetzung von TGF- $\beta$ 1 (transforming growth factor  $\beta$ 1), einem immunsuppressiven Zytokin, das die Aktivität natürlicher Killerzellen hemmt und somit ebenfalls zur Umgehung der tumoralen Immunüberwachung beiträgt (202, 203). Becherer et al. zeigten zudem, dass Thrombin die Synthese von Prostaglandin E2 in Fibrosarkomzellen steigert (260). Prostaglandin E2 spielt eine ausschlaggebende Rolle in der Tumorprogression, indem es das Tumorwachstum, die Angiogenese, die Invasion und die Metastasierung fördert, die Apoptose von Tumorzellen hemmt und die antitumorale Immunantwort unterdrückt (261).

Ob die oben beschriebenen Mechanismen auch für Tumor-intrinsisches Prothrombin gelten, ist unklar. In dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine tumorigene Wirkung auf Fibrosarkome hat. Hierbei stellt sich die Frage, ob Tumor-intrinsisches Prothrombin seine tumorfördernde Wirkung direkt entfaltet, oder ob diese erst durch die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin vermittelt wird. Um die zugrundeliegenden Mechanismen besser zu verstehen, sind weiterführende Studien notwendig.

#### **4.4 Angiogenese: Einfluss von rekombinantem Thrombin und Tumor-intrinsischem Prothrombin**

Die Angiogenese, also die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen, gilt als ein charakteristisches Merkmal von Tumoren. Sie stellt die ausreichende Versorgung der Tumore mit Sauerstoff und Nährstoffen sicher, eine essenzielle Voraussetzung für deren Wachstum und Metastasierung (262). Die Tumorangiogenese wird durch ein Ungleichgewicht zwischen angiogenen Stimulatoren und Inhibitoren geprägt. Einerseits stimulieren Tumorzellen die Freisetzung proangiogener Faktoren wie VEGF (263, 264), FGF (265, 266), PDGF (267) und Angiopoietin (268, 269), andererseits hemmen sie die Produktion von antiangiogenen Faktoren wie Thrombospondin (270). Zudem rekrutieren Tumore immunsuppressive und entzündungsfördernde Zellen, die durch Freisetzung von proangiogenen Faktoren ebenfalls zur Angiogenese beitragen (271, 272). Eine entscheidende Rolle in der Tumorangiogenese spielt die Hypoxie, die auftritt, wenn wachsende Tumore nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt werden (273). Infolge des Sauerstoffmangels wird der Transkriptionsfaktor HIF-1 aktiviert, der die Expression von VEGF stimuliert und die Proliferation sowie Migration von Endothelzellen fördert (59, 273, 274).

Zahlreiche Studien belegen, dass diese Mechanismen auch in Fibrosarkomen zur Angiogenese beitragen und dass diese Tumore auf eine ausgeprägte vaskuläre Versorgung angewiesen sind (275-281). Dies deckt sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit, die ebenfalls eine deutliche vaskuläre Versorgung der Fibrosarkome aufzeigen konnte (siehe Abbildung 11 und Abbildung 20).

Thrombin ist ein weiterer wichtiger Regulator der Angiogenese. Es fördert die Ausschüttung der vaskulären Wachstumsfaktoren VEGF (156) und Angiopoietin-1 (222) aus Thrombozyten, sowie Angiopoietin-2 (223), MMP-1 und MMP-2 aus Endothelzellen (224). Darüber hinaus können auch Krebszellen durch Thrombin-Stimulation VEGF sekretieren (225, 226). Thrombin induziert zudem die Expression der VEGF-Rezeptoren Flt-1 und KDR auf Endothelzellen (227) und aktiviert Thrombozyten, die ihrerseits Wachstumsfaktoren freisetzen und die Angiogenese weiter fördern (228, 229). Des Weiteren stimuliert Thrombin in Tumoren die Sekretion des Chemokins GRO- $\alpha$ , das durch Bindung an den CXCR2-Rezeptor die Tumorangiogenese fördert (230, 231). In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen zeigt auch die vorliegende Arbeit eine proangiogene Wirkung von Thrombin. In einem *in vivo* Modell, in dem rekombinantes Thrombin wiederholt in die Ohren von B6 Mäusen injiziert wurde, konnte ein signifikant höheres Fluoreszenzsignal des Angiogenese-Markers AngioSense im Vergleich zu den mit DPBS behandelten Kontrollohren nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19).

Interessanterweise zeigte Tumor-intrinsisches Prothrombin einen gegenteiligen Effekt. Fibrosarkome mit unterdrückter Prothrombin-Expression wiesen ein signifikant stärkeres AngioSense-Signal auf als Tumore ohne Prothrombin-Depletion (siehe Abbildung 20). Dies

deutet darauf hin, dass Prothrombin in diesem speziellen Kontext eine hemmende Wirkung auf die Angiogenese ausübt, was im Widerspruch zu den zuvor beschriebenen proangiogenen Effekten von Thrombin steht. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass Thrombin zwar selbst angiogene Prozesse fördert, bei der Proteinbiosynthese von Prothrombin und dessen Aktivierung zu Thrombin jedoch antiangiogene Prozesse induziert werden. Rhim et al. fanden heraus, dass die Prothrombin-Fragmente 1 und 2, die bei der Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin abgespalten werden, einen hemmenden Effekt auf bFGF-stimulierte Bovine Kapiplarendothelzellen (BCE-Zellen) haben und die Angiogenese in der Chorion-Allantois-Membran (CAM) von Hühnerembryonen hemmen (282). In einer nachfolgenden Studie wiesen Kim et al. darauf hin, dass die antiangiogene Wirkung von Prothrombin-Fragment 2 möglicherweise mit dessen Fähigkeit zusammenhängt, den Prothrombinase-Komplex zu hemmen (283). Auch Chan et al. konnten in vitro nachweisen, dass sowohl Prothrombin als auch Thrombin die Bildung von Röhrenstrukturen durch Endothelzellen (endothelial cell tube formation) hemmen und dass Prothrombin in einem in vivo Modell die bFGF-induzierte Angiogenese in Mäusen unterdrückt (284). Zudem berichteten Kim et al., dass die Prothrombin-Kringel 1 und 2 die Angiogenese hemmen und dadurch das Wachstum und die Metastasierung von Lewis-Lungenkarzinomen (LLC) unterdrücken (285).

Neben diesen biologischen Erklärungsansätzen sollten auch methodologische Überlegungen angestellt werden. In dem Experiment wurden genetisch modifizierte Fibrosarkome untersucht, deren Prothrombin-Expression durch Doxycyclin-induzierte RNA-Interferenz unterdrückt werden konnte. Wildtyp-Fibrosarkome wurden jedoch nicht einbezogen, sodass ein direkter Effekt von Doxycyclin nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass die Angiogenese in den Doxycyclin-behandelten Fibrosarkomen aufgrund einer Eigenwirkung des Doxycyclins stärker ausgeprägt war, da in der Literatur ausschließlich antiangiogene Wirkungen von Doxycyclin beschrieben werden (286-289). Eine weitere mögliche Erklärung bietet die in vivo Fluoreszenzmessung. Es wurde nachgewiesen, dass die Doxycyclin-behandelten Tumore, die ein höheres Fluoreszenzsignal aufwiesen, ein geringeres Tumolvolumen hatten (siehe Abbildung 20 und Abbildung 21). Es ist denkbar, dass die kleineren Tumore eine geringere Absorption aufwiesen und der Fluoreszenzmarker sich in dem geringeren Volumen konzentrierter ansammelte.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass rekombinantes Thrombin in Mausohren eine Induktion der Angiogenese bewirkte, während Tumor-intrinsische Prothrombin-Expression in Fibrosarkomen die Angiogenese hemmte. Die zugrundeliegenden Mechanismen sollten weiter untersucht werden. Darüber hinaus wäre es sinnvoll, den Einfluss von Tumor-intrinsischem Prothrombin auf die Angiogenese auch noch mit anderen Methoden zu überprüfen.

## **4.5 Limitationen der Studie und Implikationen für zukünftige Arbeiten**

Trotz der aufschlussreichen Ergebnisse der durchgeführten Versuche zur Rolle von Tumor-intrinsischem Prothrombin in Fibrosarkomen, müssen einige methodische und interpretative Einschränkungen beachtet werden, die für die Aussagekraft dieser Studie von Bedeutung sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente basieren auf der Verwendung genetisch modifizierter Fibrosarkome in einem Mausmodell, bei dem die Prothrombin-Expression durch Doxycyclin-induzierte RNA-Interferenz unterdrückt werden konnte. Dieses Mausmodell ermöglichte zwar eine gezielte Untersuchung der Effekte von Tumor-intrinsischem

Prothrombin, jedoch stellt es möglicherweise nicht das gesamte Spektrum der Tumorerogenität und der vielfältigen Interaktionen im Tumormikromilieu des menschlichen Organismus dar. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse dieser Studie im Hinblick auf ihre Übertragbarkeit auf menschliche Tumore weiter untersucht werden. Zukünftige Studien könnten zur Validierung der klinischen Relevanz beispielsweise Xenograft-Modelle heranziehen, bei denen menschliche Tumorzellen in immunsupprimierten Mäusen eingesetzt werden (290).

Das F2KD-Modell ermöglicht durch eine gezielte und zeitlich kontrollierbare Genregulation funktionelle Vergleichsstudien von Tumoren mit normaler und mit reduzierter Prothrombin-Expression. Hierbei könnten jedoch unbeabsichtigte Off-Target-Effekte die Ergebnisse möglicherweise beeinflussen. Zukünftige Studien könnten alternative Methoden, wie CRISPR/Cas-basierte Geneditierung in Betracht ziehen, um eine dauerhafte und präzisere Genregulation zu ermöglichen (291). Zudem wäre es ratsam, eine detaillierte Analyse der Off-Target-Effekte des verwendeten RNA-Interferenz-Modells durchzuführen, um potenzielle Verzerrungen der Ergebnisse zu identifizieren und zu minimieren.

Ein weiterer interessanter Ansatz für zukünftige Forschung wäre die Untersuchung langfristiger Effekte einer Prothrombin-Suppression im Tumorkontext. Die vorliegenden Experimente stellen vorwiegend Kurzzeitstudien über die Auswirkungen von Prothrombin auf Tumorstadium und Angiogenese dar. Es bleibt jedoch unklar, ob diese Effekte über längere Zeiträume hinweg anhalten und inwiefern sie das Tumorverhalten dauerhaft beeinflussen. Langzeitstudien sowie Untersuchungen von Metastasierungsraten und Tumorrezidivraten könnten in diesem Zusammenhang wichtige zusätzliche Erkenntnisse liefern.

## 4.6 Klinische Relevanz und Ausblick

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) und Internationaler Agentur für Krebsforschung (IARC) war Krebs im Jahr 2022 für schätzungsweise 9,7 Millionen Todesfälle verantwortlich. Etwa jeder fünfte Mensch erleidet im Laufe seines Lebens eine Krebserkrankung (1). Effektive und verträgliche Therapieoptionen sind daher von entscheidender Bedeutung. Chemotherapie und Strahlentherapie sind zwar etablierte Behandlungsansätze in der Krebstherapie, gehen jedoch häufig mit erheblichen Nebenwirkungen einher und bieten in vielen Fällen nur einen begrenzten Behandlungserfolg (292-297). Ein Durchbruch in der Krebstherapie gelang mit der Entwicklung der Immuntherapie, insbesondere durch die Einführung der Check-Point-Inhibitoren, die das Immunsystem darin unterstützen, Krebszellen effektiver zu erkennen und zu zerstören (298). Parallel dazu wurden zielgerichtete Therapien entwickelt, die auf spezifische genetische oder molekularbiologische Veränderungen in Tumorzellen abzielen. Ein frühes Beispiel hierfür ist Imatinib, das gezielt das BCR-ABL-Fusionsprotein bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) blockiert (299). Seither haben Wissenschaftler kontinuierlich weitere Angriffspunkte in Tumoren erforscht, um gezielte Therapeutika zu entwickeln. In jüngster Zeit rückt die Serinprotease Thrombin zunehmend in den Fokus der Krebstherapie-Forschung. Zahlreiche Studien schlagen Thrombin als potenzielles therapeutisches Ziel vor, da es eine zentrale Rolle in der Tumorstadium spielt (201, 249, 300, 301).

Die Ergebnisse dieser Dissertation identifizieren die Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin als weiteres vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Krebstherapie. Eine gezielte Behandlung, die sich gegen das in Tumoren exprimierte Prothrombin richtet, könnte

das Wachstum der Tumore hemmen und somit die Prognose von Krebspatienten verbessern. Zudem könnte eine solche Therapie auch Vorteile gegenüber einer systemischen Thrombinhemmung mit Heparin, Dabigatran oder Hirudin bieten. Insbesondere würde eine tumorspezifische Therapie das Risiko von Blutungskomplikationen verringern, das bei systemischer Gerinnungshemmung erhöht ist.

Diese Arbeit stellt somit die Grundlage für weitere Studien dar, die Tumor-intrinsische Prothrombin-Expression in verschiedenen Tumorarten zu untersuchen und die zugrundeliegenden Mechanismen umfassend zu entschlüsseln. Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte zur Entwicklung neuer gezielter Therapeutika in der Krebsbehandlung beitragen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden die Auswirkungen von tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in Fibrosarkomen auf die Blutgerinnung, das Tumorwachstum und die Angiogenese untersucht.

Prothrombin, das Zymogen des Enzyms Thrombin, spielt eine zentrale Rolle in der Blutgerinnung. In der primären Hämostase aktiviert Thrombin die Thrombozyten und in der sekundären Hämostase katalysiert es die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin, was zur Bildung von Blutgerinnseln und dem Verschluss von Wunden führt. Prothrombin wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und synthetisiert, neuere Forschungen zeigen jedoch, dass es auch in anderen Geweben sowie in verschiedenen Tumoren exprimiert wird. Abseits seiner klassischen Rolle in der Hämostase ist Thrombin an zahlreichen weiteren physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, wie der Wundheilung, Embryonalentwicklung, Angiogenese, Funktionen des Immun- und Nervensystems, Entzündungsreaktionen und der Tumorbilogie. Es wirkt dabei besonders durch die Aktivierung von Protease-aktivierten Rezeptoren (PARs), wodurch es zelluläre Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Motilität und Apoptose reguliert.

Der Zusammenhang zwischen Blutgerinnung und Krebserkrankungen ist seit Langem bekannt. Bereits im 19. Jahrhundert beschrieb Armand Trousseau die Assoziation zwischen Krebs und venösen Thrombosen, was später als Trousseau-Syndrom bekannt wurde. In den letzten Jahrzehnten wurde deutlich, dass die Blutgerinnung nicht nur eine Reaktion auf Tumore darstellt, sondern aktiv zur Tumorprogression beitragen kann. Insbesondere Thrombin wurde als Schlüsselfaktor identifiziert, der zahlreiche pro-tumoröse Effekte ausübt, etwa die Förderung von Angiogenese, Wachstum und Metastasierung von Tumoren.

Ziel dieser Dissertation war es, die Auswirkungen von Tumor-intrinsischer Prothrombin-Expression in Fibrosarkomen auf Blutgerinnung, Tumorwachstum und Angiogenese hin zu untersuchen. Zunächst konnte mittels der genetisch modifizierten D-Insight Mauslinie, die eine Identifizierung von Prothrombin-exprimierenden Zellen ermöglicht, sowie durch F2-RNA-FISH nachgewiesen werden, dass Fibrosarkome Prothrombin exprimieren. Anschließend wurden genetisch modifizierte F2KD Fibrosarkome verwendet, die durch eine Doxycyclin-induzierbare RNA-Interferenz einen gezielten Knockdown des Prothrombin-Gens erlauben. Diese Zellen wurden in B6 Mäuse injiziert, um funktionelle Vergleichsstudien von Tumoren mit unterdrückter und Tumoren mit normaler Prothrombin-Expression durchzuführen.

Es zeigte sich, dass Fibrosarkome selbst die sekundäre Hämostase beeinflussen, Tumor-intrinsisches Prothrombin jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf die Blutgerinnung hat. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der Anteil des von Tumoren exprimierten Prothrombins im Verhältnis zur Gesamtprothrombin-Konzentration zu gering ist, um eine messbare Wirkung auf die systemische Hämostase zu entfalten.

Im weiteren Verlauf wurde nachgewiesen, dass Tumor-intrinsisches Prothrombin einen signifikanten Einfluss auf die Tumorprogression hat. In vitro zeigten F2KD Fibrosarkom-Zellen mit unterdrückter Prothrombin-Expression eine verlangsamte Zellproliferation, was sich auch in einem reduzierten Tumorwachstum in vivo widerspiegelte. Fibrosarkome mit eingeschränkter Prothrombin-Expression wuchsen langsamer und blieben insgesamt kleiner als Tumore mit normaler Prothrombin-Expression.

Abschließend wurde der Einfluss auf die Angiogenese untersucht. Während rekombinantes Thrombin in einem Mausohren-Modell die Angiogenese förderte, zeigte sich durch Tumor-intrinsisches Prothrombin eine hemmende Wirkung auf die Tumorangiogenese von Fibrosarkomen. Dieser unerwartete Befund deutet auf eine komplexe, kontext- und umgebungsabhängige Rolle von Tumor-intrinsischem Prothrombin in der Tumorangiogenese hin, die weiterer Forschung bedarf.

Die vorliegende Arbeit zeigt somit, dass Fibrosarkome Prothrombin exprimieren und dass diese Tumor-intrinsische Expression signifikante Auswirkungen auf die Tumorbiologie, insbesondere auf das Tumorwachstum hat. Dadurch identifiziert diese Dissertation die Tumor-intrinsische Expression von Prothrombin als vielversprechendes therapeutisches Ziel in der Behandlung von Krebs, einer der tödlichsten Erkrankungen weltweit.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services 2024 [Available from: <https://www.who.int/news/item/01-02-2024-global-cancer-burden-growing--amidst-mounting-need-for-services>].
2. The Edwin Smith surgical papyrus: published in facsimile and hieroglyphic transliteration with translation and commentary in two volumes. Breasted JH, editor. Chicago, Ill.: University of Chicago Press; 1930.
3. Retief FP, Cilliers L. Tumours and cancers in Graeco-Roman times. S Afr Med J. 2001;91(4):344-8.
4. Lehman TA, Reddel R, Peifer AM, Spillare E, Kaighn ME, Weston A, et al. Oncogenes and tumor-suppressor genes. Environ Health Perspect. 1991;93:133-44.
5. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Cellular Oncogenes and Multistep Carcinogenesis. Science. 1983;222(4625):771-8.
6. Mareel MM, Van Roy FM, Messiaen L, Van Larebeke N, Boghaert E, editors. Correlations of Malignancy in Cultured Cells 1988; Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
7. Miller EC, Miller JA. Mechanisms of chemical carcinogenesis. Cancer. 1981;47(S5):1055-64.
8. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. Toxicologic Pathology. 2010;38(1):96-109.
9. Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO. CHAPTER 12 - Mechanisms of Viral Tumorigenesis. In: Fenner F, Bachmann PA, Gibbs EPJ, Murphy FA, Studdert MJ, White DO, editors. Veterinary Virology: Academic Press; 1987. p. 217-35.
10. Lopez LR, Bleich RM, Arthur JC. Microbiota Effects on Carcinogenesis: Initiation, Promotion, and Progression. Annual Review of Medicine. 2021;72(Volume 72, 2021):243-61.
11. JONES PA. Epigenetics in Carcinogenesis and Cancer Prevention. Annals of the New York Academy of Sciences. 2003;983(1):213-9.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
13. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74.
14. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. Cancer Discov. 2022;12(1):31-46.
15. Boyd JA, Barrett JC. Genetic and cellular basis of multistep carcinogenesis. Pharmacol Ther. 1990;46(3):469-86.

16. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(1):11-22.
17. Bos JL. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*. 1989;49(17):4682-9.
18. Aubrey BJ, Strasser A, Kelly GL. Tumor-Suppressor Functions of the TP53 Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(5).
19. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989;244(4901):217-21.
20. Hu J, Cao J, Topatana W, Juengpanich S, Li S, Zhang B, et al. Targeting mutant p53 for cancer therapy: direct and indirect strategies. *Journal of Hematology & Oncology*. 2021;14(1):157.
21. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333-9.
22. Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 2009;31(2):135-48.
23. Trosko JE, Upham BL. The emperor wears no clothes in the field of carcinogen risk assessment: ignored concepts in cancer risk assessment. *Mutagenesis*. 2005;20(2):81-92.
24. Diamond L, O'Brien TG, Baird WM. Tumor promoters and the mechanism of tumor promotion. *Adv Cancer Res*. 1980;32:1-74.
25. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
26. Kamal A, Tempest N, Parkes C, Alnafakh R, Makrydima S, Adishesh M, et al. Hormones and endometrial carcinogenesis. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*. 2016;25(2):129-48.
27. Stoscheck CM, King LE, Jr. Role of epidermal growth factor in carcinogenesis. *Cancer Res*. 1986;46(3):1030-7.
28. Degirmenci U, Wang M, Hu J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells*. 2020;9(1).
29. Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer*. 1993;72(3 Suppl):962-70.
30. Foulds L. The Experimental Study of Tumor Progression: A Review. *Cancer Research*. 1954;14(5):327-39.
31. Spandidos DA, Liloglou T, Field JK. Prognostic significance of oncogenes and tumor suppressor genes in human malignancy. *Stem Cells*. 1996;11(3):194-8.

32. Liu Y, Yin T, Feng Y, Cona MM, Huang G, Liu J, et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. *Quant Imaging Med Surg.* 2015;5(5):708-29.
33. Goustin AS, Leof EB, Shipley GD, Moses HL. Growth Factors and Cancer<sup>1</sup>. *Cancer Research.* 1986;46(3):1015-29.
34. Burtrum D, Zhu Z, Lu D, Anderson DM, Prewett M, Pereira DS, et al. A Fully Human Monoclonal Antibody to the Insulin-Like Growth Factor I Receptor Blocks Ligand-Dependent Signaling and Inhibits Human Tumor Growth in Vivo. *Cancer Research.* 2003;63(24):8912-21.
35. Grandis JR, Sok JC. Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy. *Pharmacology & Therapeutics.* 2004;102(1):37-46.
36. Sherr CJ. Cancer Cell Cycles. *Science.* 1996;274(5293):1672-7.
37. Coppola JA, Lewis BA, Cole MD. Increased retinoblastoma gene expression is associated with late stages of differentiation in many different cell types. *Oncogene.* 1990;5(11):1731-3.
38. Herwig S, Strauss M. The Retinoblastoma Protein: A Master Regulator of Cell Cycle, Differentiation and Apoptosis. *European Journal of Biochemistry.* 1997;246(3):581-601.
39. Sellers WR, Jr WGK. Role of the retinoblastoma protein in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 1997;15(11):3301-12.
40. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research.* 1961;25(3):585-621.
41. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature.* 1990;345(6274):458-60.
42. Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, et al. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo j.* 1992;11(5):1921-9.
43. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet.* 2010;11(5):319-30.
44. Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer Therapy. *Cancer.* 1994;73(8):2013-26.
45. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000;5(1):40-6.
46. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997;386(6626):671-4.
47. Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *The FASEB Journal.* 1997;11(6):457-65.

48. Behl T, Kaur I, Goel H, Kotwani A. Significance of the antiangiogenic mechanisms of thalidomide in the therapy of diabetic retinopathy. *Vascular Pharmacology*. 2017;92:6-15.
49. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285(21):1182-6.
50. Persano L, Crescenzi M, Indraccolo S. Anti-angiogenic gene therapy of cancer: Current status and future prospects. *Molecular Aspects of Medicine*. 2007;28(1):87-114.
51. Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: a chaperone escorts VEGF to the dance. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(1):39-40.
52. Holmes DIR, Zachary I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. *Genome Biology*. 2005;6(2):209.
53. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219(4587):983-5.
54. Javerzat S, Auguste P, Bikfalvi A. The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol Med*. 2002;8(10):483-9.
55. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- $\beta$  in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126(14):3047-55.
56. Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, et al. Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science*. 1990;247(4938):77-9.
57. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994;79(2):315-28.
58. Vailhé B, Feige J-J. Thrombospondins as Anti-Angiogenic Therapeutic Agents. *Current Pharmaceutical Design*. 2003;9(7):583-8.
59. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):4604-13.
60. Oguntade AS, Al-Amodi F, Alrumayh A, Alobaida M, Bwalya M. Anti-angiogenesis in cancer therapeutics: the magic bullet. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2021;33(1):15.
61. Fearon ER. Cancer progression. *Current Biology*. 1999;9(23):R873-R5.
62. Augsburger D, Nelson PJ, Kalinski T, Udelnow A, Knösel T, Hofstetter M, et al. Current diagnostics and treatment of fibrosarcoma –perspectives for future therapeutic targets and strategies. *Oncotarget*. 2017;8(61).

63. Bahrami A, Folpe AL. Adult-type fibrosarcoma: A reevaluation of 163 putative cases diagnosed at a single institution over a 48-year period. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(10):1504-13.
64. Folpe AL. Fibrosarcoma: a review and update. *Histopathology*. 2014;64(1):12-25.
65. Raza A, Siraj I, Malik S, Mohammed R, Shariff MA. A Case of Locally Advanced Fibrosarcoma in a Young Male. *Cureus*. 2023;15(8):e44095.
66. Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Sudo A. Neoplastic fever in patients with bone and soft tissue sarcoma. *Mol Clin Oncol*. 2016;5(5):631-4.
67. Davis DD, Shah SJ, Kane SM. Fibrosarcoma. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing  
Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.; 2024.
68. Mussbacher M, Kral-Pointner JB, Salzmann M, Schrottmaier WC, Assinger A. Mechanisms of Hemostasis: Contributions of Platelets, Coagulation Factors, and the Vessel Wall. In: Geiger M, editor. *Fundamentals of Vascular Biology*. Cham: Springer International Publishing; 2019. p. 145-69.
69. Stassen Marin J, Arnout J, Deckmyn H. The Hemostatic System. *Current Medicinal Chemistry*. 2004;11(17):2245-60.
70. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Reviews*. 2015;29(1):17-24.
71. Morawitz P. Die Chemie der Blutgerinnung. *Ergebnisse der Physiologie*. 1905;4(1):307-422.
72. Bächli M, Esther. Historical review. *British Journal of Haematology*. 2000;110(2):248-55.
73. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964;202(4931):498-9.
74. Davie EW, Ratnoff OD. WATERFALL SEQUENCE FOR INTRINSIC BLOOD CLOTTING. *Science*. 1964;145(3638):1310-2.
75. Boulton F. A hundred years of cascading - started by Paul Morawitz (1879-1936), a pioneer of haemostasis and of transfusion. *Transfus Med*. 2006;16(1):1-10.
76. Smith SA. The cell-based model of coagulation. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2009;19(1):3-10.
77. Hoffman M, Monroe D. A Cell-based Model of Hemostasis. *Thrombosis and haemostasis*. 2001;85:958-65.

78. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-8.
79. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32 Suppl 1:32-8.
80. Ghoshal K, Bhattacharyya M. Overview of Platelet Physiology: Its Hemostatic and Nonhemostatic Role in Disease Pathogenesis. *The Scientific World Journal.* 2014;2014(1):781857.
81. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets.* 2001;12(5):261-73.
82. Verhamme P, Hoylaerts MF. The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis. *Acta Clin Belg.* 2006;61(5):213-9.
83. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research.* 2007;100(12):1673-85.
84. Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28(3):403-12.
85. Cimmino G, Golino P. Platelet biology and receptor pathways. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6(3):299-309.
86. Beumer S, Heijnen HF, MJ IJ, Orlando E, de Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion to fibronectin in flow: the importance of von Willebrand factor and glycoprotein Ib. *Blood.* 1995;86(9):3452-60.
87. Hindriks G, Ijsseldijk MJ, Sonnenberg A, Sixma JJ, de Groot PG. Platelet adhesion to laminin: role of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> ions, shear rate, and platelet membrane glycoproteins. *Blood.* 1992;79(4):928-35.
88. Asch E, Podack E. Vitronectin binds to activated human platelets and plays a role in platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1990;85(5):1372-8.
89. Jennings LK. Mechanisms of platelet activation: need for new strategies to protect against platelet-mediated atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2009;102(2):248-57.
90. Kirchhofer D, Nemerson Y. Initiation of blood coagulation: the tissue factor/factor VIIa complex. *Curr Opin Biotechnol.* 1996;7(4):386-91.
91. Østerud B, Bjørklid E. Sources of tissue factor. *Semin Thromb Hemost.* 2006;32(1):11-23.
92. Seligsohn U, Kasper CK, Østerud B, Rapaport SI. Activated Factor VII: Presence in Factor IX Concentrates and Persistence in the Circulation After Infusion. *Blood.* 1979;53(5):828-37.

93. Morrissey JH, Macik BG, Neuenschwander PF, Comp PC. Quantitation of Activated Factor VII Levels in Plasma Using a Tissue Factor Mutant Selectively Deficient in Promoting Factor VII Activation. *Blood*. 1993;81(3):734-44.
94. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Transmission of a procoagulant signal from tissue factor-bearing cell to platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1996;7(4):459-64.
95. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RFA. Changes in membrane phospholipid distribution during platelet activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1983;736(1):57-66.
96. Lévy-Toledano S. Platelet signal transduction pathways: could we organize them into a 'hierarchy'? *Haemostasis*. 1999;29(1):4-15.
97. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 2000;96(7):2469-78.
98. Blostein MD, Furie BC, Rajotte I, Furie B. The Gla Domain of Factor IXa Binds to Factor VIIIa in the Tenase Complex\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(33):31297-302.
99. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013;93(1):327-58.
100. Ariëns RA, Lai TS, Weisel JW, Greenberg CS, Grant PJ. Role of factor XIII in fibrin clot formation and effects of genetic polymorphisms. *Blood*. 2002;100(3):743-54.
101. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*. 1996;47:315-31.
102. Morello S, Caiazza E, Turiello R, Cicala C. Thrombo-Inflammation: A Focus on NTPDase1/CD39. *Cells*. 2021;10(9):2223.
103. Esmon CT. Molecular events that control the protein C anticoagulant pathway. *Thromb Haemost*. 1993;70(1):29-35.
104. Rezende SM, Simmonds RE, Lane DA. Coagulation, inflammation, and apoptosis: different roles for protein S and the protein S–C4b binding protein complex. *Blood*. 2004;103(4):1192-201.
105. Rosenberg RD. Role of heparin and heparinlike molecules in thrombosis and atherosclerosis. *Fed Proc*. 1985;44(2):404-9.
106. Mast AE, Ruf W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy. *J Thromb Haemost*. 2022;20(6):1290-300.
107. Mohan Rao LV, Rapaport SI. Studies of a Mechanism Inhibiting the Initiation of the Extrinsic Pathway of Coagulation. *Blood*. 1987;69(2):645-51.
108. Chapin JC, Hajjar KA. Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev*. 2015;29(1):17-24.

109. Bick RL, Murano G. Physiology of Hemostasis. *Clinics in Laboratory Medicine*. 1994;14(4):677-707.
110. Bajzar L, Morser J, Nesheim M. TAFI, or plasma procarboxypeptidase B, couples the coagulation and fibrinolytic cascades through the thrombin-thrombomodulin complex. *J Biol Chem*. 1996;271(28):16603-8.
111. Chinnaraj M, Chen Z, Pelc LA, Grese Z, Bystranowska D, Di Cera E, et al. Structure of prothrombin in the closed form reveals new details on the mechanism of activation. *Scientific Reports*. 2018;8(1):2945.
112. Soriano-Garcia M, Padmanabhan K, de Vos AM, Tulinsky A. The Ca<sup>2+</sup> ion and membrane binding structure of the Gla domain of Ca-prothrombin fragment 1. *Biochemistry*. 1992;31(9):2554-66.
113. Church WR, Ouellette LA, Messier TL. Modulation of human prothrombin activation on phospholipid vesicles and platelets using monoclonal antibodies to prothrombin fragment 2. *J Biol Chem*. 1991;266(13):8384-91.
114. Acquasaliente L, Pelc LA, Di Cera E. Probing prothrombin structure by limited proteolysis. *Scientific Reports*. 2019;9(1):6125.
115. Pozzi N, Chen Z, Zapata F, Niu W, Barranco-Medina S, Pelc LA, et al. Autoactivation of thrombin precursors. *J Biol Chem*. 2013;288(16):11601-10.
116. Pozzi N, Bystranowska D, Zuo X, Di Cera E. Structural Architecture of Prothrombin in Solution Revealed by Single Molecule Spectroscopy\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2016;291(35):18107-16.
117. Pozzi N, Chen Z, Gohara DW, Niu W, Heyduk T, Di Cera E. Crystal structure of prothrombin reveals conformational flexibility and mechanism of activation. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22734-44.
118. Mannucci PM, Duga S, Peyvandi F. Recessively inherited coagulation disorders. *Blood*. 2004;104(5):1243-52.
119. Degen SJ. The prothrombin gene and its liver-specific expression. *Semin Thromb Hemost*. 1992;18(2):230-42.
120. Ceelie H, Spaargaren-Van Riel CC, De Jong M, Bertina RM, Vos HL. Functional characterization of transcription factor binding sites for HNF1-alpha, HNF3-beta (FOXA2), HNF4-alpha, Sp1 and Sp3 in the human prothrombin gene enhancer. *J Thromb Haemost*. 2003;1(8):1688-98.
121. Danckwardt S, Gantzert AS, Macher-Goeppinger S, Probst HC, Gentzel M, Wilm M, et al. p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing. *Mol Cell*. 2011;41(3):298-310.

122. Poort SR, Rosendaal FR, Reitsma PH, Bertina RM. A Common Genetic Variation in the 3'-Untranslated Region of the Prothrombin Gene Is Associated With Elevated Plasma Prothrombin Levels and an Increase in Venous Thrombosis. *Blood*. 1996;88(10):3698-703.
123. Ceelie H, Spaargaren-van Riel CC, Bertina RM, Vos HL. G20210A is a functional mutation in the prothrombin gene; effect on protein levels and 3'-end formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2004;2(1):119-27.
124. Poort SR, Njo KT, Vos HL, Bertina RM. Two novel mutations in the prothrombin gene cause severe bleeding in a compound heterozygous patient. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998;9(8):761-4.
125. Pozzi N, Di Cera E. Prothrombin structure: unanticipated features and opportunities. *Expert Rev Proteomics*. 2014;11(6):653-5.
126. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JW, Zwaal RF, Hemker HC. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J Biol Chem*. 1980;255(1):274-83.
127. Qureshi SH, Yang L, Manithody C, Rezaie AR. Membrane-dependent interaction of factor Xa and prothrombin with factor Va in the prothrombinase complex. *Biochemistry*. 2009;48(22):5034-41.
128. Wood JP, Silveira JR, Maille NM, Haynes LM, Tracy PB. Prothrombin activation on the activated platelet surface optimizes expression of procoagulant activity. *Blood*. 2011;117(5):1710-8.
129. Huntington JA. Molecular recognition mechanisms of thrombin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(8):1861-72.
130. Troisi R, Balasco N, Autiero I, Vitagliano L, Sica F. Exosite Binding in Thrombin: A Global Structural/Dynamic Overview of Complexes with Aptamers and Other Ligands. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
131. Fenton JW, 2nd. Thrombin specificity. *Ann N Y Acad Sci*. 1981;370:468-95.
132. Mathews, II, Padmanabhan KP, Tulinsky A, Sadler JE. Structure of a nonadecapeptide of the fifth EGF domain of thrombomodulin complexed with thrombin. *Biochemistry*. 1994;33(46):13547-52.
133. Boknäs N, Faxälv L, Sanchez Centellas D, Wallstedt M, Ramström S, Grenegård M, et al. Thrombin-induced platelet activation via PAR4: pivotal role for exosite II. *Thromb Haemost*. 2014;112(3):558-65.
134. Sheehan JP, Sadler JE. Molecular mapping of the heparin-binding exosite of thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(12):5518-22.
135. Lechtenberg BC, Freund SMV, Huntington JA. An ensemble view of thrombin allostery. *Biological Chemistry*. 2012;393(9):889-98.

136. Xiao J, Salsbury FR. Na<sup>+</sup>-binding modes involved in thrombin's allosteric response as revealed by molecular dynamics simulations, correlation networks and Markov modeling. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2019;21(8):4320-30.
137. Dang OD, Vindigni A, Di Cera E. An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(13):5977-81.
138. Myles T, Yun T, Hall S, Leung LK. An Extensive Interaction Interface between Thrombin and Factor V Is Required for Factor V Activation \*. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(27):25143-9.
139. Xu H, Bush LA, Pineda AO, Caccia S, Di Cera E. Thrombomodulin Changes the Molecular Surface of Interaction and the Rate of Complex Formation between Thrombin and Protein C\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(9):7956-61.
140. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature*. 2000;407(6801):258-64.
141. Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*. 1991;64(6):1057-68.
142. Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, et al. Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature*. 1997;386(6624):502-6.
143. Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, et al. Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(12):6642-6.
144. Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J. Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9208-12.
145. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53(2):245-82.
146. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997-2007.
147. Adams MN, Ramachandran R, Yau M-K, Suen JY, Fairlie DP, Hollenberg MD, et al. Structure, function and pathophysiology of protease activated receptors. *Pharmacology & Therapeutics*. 2011;130(3):248-82.
148. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant Expression and Activation of the Thrombin Receptor Protease-Activated Receptor-1 Induces Cell Proliferation and Motility in Human Colon Cancer Cells. *The American Journal of Pathology*. 2003;162(5):1503-13.
149. Song SJ, Pagel CN, Pike RN, Mackie EJ. Studies on the receptors mediating responses of osteoblasts to thrombin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37(1):206-13.

150. Tarzami ST, Wang G, Li W, Green L, Singh JP. Thrombin and PAR-1 stimulate differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost.* 2006;4(3):656-63.
151. Smirnova IV, Zhang SX, Citron BA, Arnold PM, Festoff BW. Thrombin is an extracellular signal that activates intracellular death protease pathways inducing apoptosis in model motor neurons. *Journal of Neurobiology.* 1998;36(1):64-80.
152. Connolly AJ, Ishihara H, Kahn ML, Farese RV, Coughlin SR. Role of the thrombin receptor in development and evidence for a second receptor. *Nature.* 1996;381(6582):516-9.
153. Griffin CT, Srinivasan Y, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR. A role for thrombin receptor signaling in endothelial cells during embryonic development. *Science.* 2001;293(5535):1666-70.
154. Camerer E, Barker A, Duong DN, Ganesan R, Kataoka H, Cornelissen I, et al. Local protease signaling contributes to neural tube closure in the mouse embryo. *Dev Cell.* 2010;18(1):25-38.
155. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. Role of thrombin in angiogenesis and tumor progression. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(1):63-9.
156. Möhle R, Green D, Moore MA, Nachman RL, Rafii S. Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(2):663-8.
157. Imokawa Y, Brockes JP. Selective activation of thrombin is a critical determinant for vertebrate lens regeneration. *Curr Biol.* 2003;13(10):877-81.
158. Friedmann I, Hauben E, Yoles E, Kardash L, Schwartz M. T cell-mediated neuroprotection involves antithrombin activity. *J Neuroimmunol.* 2001;121(1-2):12-21.
159. Turgeon VL, Houenou LJ. The role of thrombin-like (serine) proteases in the development, plasticity and pathology of the nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997;25(1):85-95.
160. Naldini A, Carney DH, Bocci V, Klimpel KD, Asuncion M, Soares LE, et al. Thrombin enhances T cell proliferative responses and cytokine production. *Cell Immunol.* 1993;147(2):367-77.
161. Burzynski LC, Humphry M, Pyriou K, Wiggins KA, Chan JNE, Figg N, et al. The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 $\beta$ ; by Thrombin. *Immunity.* 2019;50(4):1033-42.e6.
162. Chen D, Dorling A. Critical roles for thrombin in acute and chronic inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2009;7:122-6.
163. Danckwardt S, Hentze MW, Kulozik AE. Pathologies at the nexus of blood coagulation and inflammation: thrombin in hemostasis, cancer, and beyond. *J Mol Med (Berl).* 2013;91(11):1257-71.

164. Nierodzik ML, Karpatkin S. Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell*. 2006;10(5):355-62.
165. Dihanich M, Kaser M, Reinhard E, Cunningham D, Monard D. Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron*. 1991;6(4):575-81.
166. Arai T, Miklossy J, Klegeris A, Guo J-P, McGeer PL. Thrombin and Prothrombin Are Expressed by Neurons and Glial Cells and Accumulate in Neurofibrillary Tangles in Alzheimer Disease Brain. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2006;65(1):19-25.
167. Karlström E, Norgård M, Hultenby K, Somogyi-Ganss E, Sugars R, Andersson G, et al. Localization and Expression of Prothrombin in Rodent Osteoclasts and Long Bones. *Calcified Tissue International*. 2011;88(3):179-88.
168. Suzuki K, Tanaka T, Miyazawa K, Nakajima C, Moriyama M, Suga K, et al. Gene expression of prothrombin in human and rat kidneys: basic and clinical approach. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10 Suppl 14:S408-11.
169. Dunjic S, Cumbo M, Gvozdenov M, Tomic B, Pruner I, Radojkovic D, et al. Prothrombin expression in cancer-derived cell lines. *Archives of Biological Sciences*. 2018:46-.
170. Nourse J, Tokalov S, Khokhar S, Khan E, Schott LK, Hinz L, et al. Non-invasive imaging of gene expression and protein secretion dynamics in living mice: identification of ectopic prothrombin expression as driver of thrombosis in cancer. *bioRxiv*. 2021:2021.07.08.451623.
171. Yamahata H, Takeshima H, Kuratsu J-I, Sarker KP, Tanioka K, Wakimaru N, et al. The role of thrombin in the neo-vascularization of malignant gliomas: An intrinsic modulator for the up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Int J Oncol*. 2002;20(5):921-8.
172. Zoubine MN, Ma JY, Smirnova IV, Citron BA, Festoff BW. A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev Biol*. 1996;179(2):447-57.
173. Arneth B. Coevolution of the coagulation and immune systems. *Inflammation Research*. 2019;68(2):117-23.
174. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Critical Care Medicine*. 2000;28(9):S77-S80.
175. Dashty M, Akbarkhanzadeh V, Zeebregts CJ, Spek CA, Sijbrands EJ, Peppelenbosch MP, et al. Characterization of coagulation factor synthesis in nine human primary cell types. *Scientific Reports*. 2012;2(1):787.
176. Wilhelm G, Mertowska P, Mertowski S, Przysucha A, Strużyna J, Grywalska E, et al. The Crossroads of the Coagulation System and the Immune System: Interactions and Connections. *Int J Mol Sci*. 2023;24(16).

177. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol.* 1989;134(5):1087-97.
178. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2013;13(1):34-45.
179. López-Zambrano M, Rodriguez-Montesinos J, Crespo-Avilan GE, Muñoz-Vega M, Preissner KT. Thrombin Promotes Macrophage Polarization into M1-Like Phenotype to Induce Inflammatory Responses. *Thromb Haemost.* 2020;120(04):658-70.
180. Bock A, Kelher M, Khan S, Hansen K, Dzieciatkowska M, Silliman CC. Thrombin Activation of Protease-Activated Receptor-2 on Neutrophils Primes the Respiratory Burst. *Blood.* 2010;116(21):1119-.
181. Yanagita M, Kobayashi R, Kashiwagi Y, Shimabukuro Y, Murakami S. Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2007;364(2):318-24.
182. Hurley A, Smith M, Karpova T, Hasley RB, Belkina N, Shaw S, et al. Enhanced Effector Function of CD8+ T Cells From Healthy Controls and HIV-Infected Patients Occurs Through Thrombin Activation of Protease-Activated Receptor 1. *The Journal of Infectious Diseases.* 2012;207(4):638-50.
183. Naldini A, Carney DH, Bocci V, Klimpel KD, Asuncion M, Soares LE, et al. Thrombin Enhances T Cell Proliferative Responses and Cytokine Production. *Cellular Immunology.* 1993;147(2):367-77.
184. Shpacovitch V, Feld M, Hollenberg MD, Luger TA, Steinhoff M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol.* 2008;83(6):1309-22.
185. Kolev M, Le Friec G, Kemper C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(12):811-20.
186. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, Rittirsch D, Neff TA, McGuire SR, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med.* 2006;12(6):682-7.
187. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature Immunology.* 2010;11(9):785-97.
188. Fan Y, Zhang W, Mulholland M. Thrombin and PAR-1-AP Increase Proinflammatory Cytokine Expression in C6 Cells. *Journal of Surgical Research.* 2005;129(2):196-201.
189. Johnson K, Choi Y, DeGroot E, Samuels I, Creasey A, Aarden L. Potential mechanisms for a proinflammatory vascular cytokine response to coagulation activation. *J Immunol.* 1998;160(10):5130-5.

190. Mari B, Imbert V, Belhacene N, Far DF, Peyron JF, Pouysségur J, et al. Thrombin and thrombin receptor agonist peptide induce early events of T cell activation and synergize with TCR cross-linking for CD69 expression and interleukin 2 production. *J Biol Chem.* 1994;269(11):8517-23.
191. Kranzhöfer R, Clinton SK, Ishii K, Coughlin SR, Fenton JW, Libby P. Thrombin Potently Stimulates Cytokine Production in Human Vascular Smooth Muscle Cells but Not in Mononuclear Phagocytes. *Circulation Research.* 1996;79(2):286-94.
192. Sugama Y, Tirupathi C, offakidevi K, Andersen TT, Fenton JW, 2nd, Malik AB. Thrombin-induced expression of endothelial P-selectin and intercellular adhesion molecule-1: a mechanism for stabilizing neutrophil adhesion. *J Cell Biol.* 1992;119(4):935-44.
193. Kaplanski G, Marin Vr, Fabrigoule M, Boulay V, Benoliel A-M, Bongrand P, et al. Thrombin-Activated Human Endothelial Cells Support Monocyte Adhesion In Vitro Following Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1; CD54) and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood.* 1998;92(4):1259-67.
194. Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, et al. The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol.* 2001;167(6):3435-42.
195. Kalz J, ten Cate H, Spronk HMH. Thrombin generation and atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis.* 2014;37(1):45-55.
196. Ebrahimi S, Jaberi N, Avan A, Ryzhikov M, Keramati MR, Parizadeh MR, et al. Role of thrombin in the pathogenesis of central nervous system inflammatory diseases. *Journal of Cellular Physiology.* 2017;232(3):482-5.
197. Festoff BW, Citron BA. Thrombin and the Coag-Inflammatory Nexus in Neurotrauma, ALS, and Other Neurodegenerative Disorders. *Front Neurol.* 2019;10:59.
198. Chapman J. Thrombin in inflammatory brain diseases. *Autoimmunity Reviews.* 2006;5(8):528-31.
199. Shin H, Nakajima T, Kitajima I, Shigeta K, Abeyama K, Imamura T, et al. Thrombin receptor-mediated synovial proliferation in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995;76(3 Pt 1):225-33.
200. Chiu Y-C, Fong Y-C, Lai C-H, Hung C-H, Hsu H-C, Lee T-S, et al. Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C $\alpha$ , c-Src, NF-kappaB and p300 pathway. *Molecular Immunology.* 2008;45(6):1587-99.
201. Alexander ET, Gilmour SK. Immunomodulatory role of thrombin in cancer progression. *Molecular Carcinogenesis.* 2022;61(6):527-36.
202. Metelli A, Wu BX, Riesenberger B, Guglietta S, Huck JD, Mills C, et al. Thrombin contributes to cancer immune evasion via proteolysis of platelet-bound GARP to activate LTGF- $\beta$ . *Sci Transl Med.* 2020;12(525).

203. Regis S, Dondero A, Caliendo F, Bottino C, Castriconi R. NK Cell Function Regulation by TGF- $\beta$ -Induced Epigenetic Mechanisms. *Front Immunol.* 2020;11:311.
204. Trousseau A. Phlegmasia dolens. *Clinique Medicale de l'Hotel-Dieu de Paris.* 1865;3:490-515.
205. Varki A. Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanisms. *Blood.* 2007;110(6):1723-9.
206. Khorana AA. Malignancy, thrombosis and Trousseau: the case for an eponym. *J Thromb Haemost.* 2003;1(12):2463-5.
207. Francis JL, Biggerstaff J, Amirkhosravi A. Hemostasis and Malignancy. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(02):93-109.
208. Lima Luize G, Monteiro Robson Q. Activation of blood coagulation in cancer: implications for tumour progression. *Bioscience Reports.* 2013;33(5).
209. Remiker AS, Palumbo JS. Mechanisms coupling thrombin to metastasis and tumorigenesis. *Thrombosis Research.* 2018;164:S29-S33.
210. De Lorenzo F, Dotsenko O, Scully FM, Tymoshchuk M. The Role of Anticoagulation in Cancer Patients: Facts and Figures. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* 2006;6(6):579-87.
211. Kuderer NM, Ortel TL, Francis CW. Impact of venous thromboembolism and anticoagulation on cancer and cancer survival. *J Clin Oncol.* 2009;27(29):4902-11.
212. Haaland GS, Falk RS, Straume O, Lorens JB. Association of Warfarin Use With Lower Overall Cancer Incidence Among Patients Older Than 50 Years. *JAMA Intern Med.* 2017;177(12):1774-80.
213. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochemical Society Transactions.* 2002;30(2):173-7.
214. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(4):239-52.
215. Remiker AS, Palumbo JS. Mechanisms coupling thrombin to metastasis and tumorigenesis. *Thromb Res.* 2018;164 Suppl 1:S29-s33.
216. Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV. Protease-activated receptors (PARs)--biology and role in cancer invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2015;34(4):775-96.
217. Green D, Karpatkin S. Role of thrombin as a tumor growth factor. *Cell Cycle.* 2010;9(4):656-61.

218. Hu L, Ibrahim S, Liu C, Skaar J, Pagano M, Karpatkin S. Thrombin Induces Tumor Cell Cycle Activation and Spontaneous Growth by Down-regulation of p27Kip1, in Association with the Up-regulation of Skp2 and MiR-222. *Cancer Research*. 2009;69(8):3374-81.
219. Henrikson KP, Salazar SL, Fenton JW, Pentecost BT. Role of thrombin receptor in breast cancer invasiveness. *British Journal of Cancer*. 1999;79(3):401-6.
220. Nierodzik ML, Plotkin A, Kajumo F, Karpatkin S. Thrombin stimulates tumor-platelet adhesion in vitro and metastasis in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*. 1991;87(1):229-36.
221. Radjabi AR, Sawada K, Jagadeeswaran S, Eichbichler A, Kenny HA, Montag A, et al. Thrombin Induces Tumor Invasion through the Induction and Association of Matrix Metalloproteinase-9 and  $\beta$ 1-Integrin on the Cell Surface\*. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(5):2822-34.
222. Li JJ, Huang YQ, Basch R, Karpatkin S. Thrombin induces the release of angiotensin-1 from platelets. *Thromb Haemost*. 2001;85(2):204-6.
223. Huang Y-Q, Li J-J, Hu L, Lee M, Karpatkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of angiotensin-2 from human umbilical vein endothelial cells. *Blood*. 2002;99(5):1646-50.
224. Duhamel-Clérin E, Orvain C, Lanza F, Cazenave JP, Klein-Soyer C. Thrombin receptor-mediated increase of two matrix metalloproteinases, MMP-1 and MMP-3, in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(10):1931-8.
225. Maragoudakis ME, Tsopanoglou NE, Andriopoulou P, Maragoudakis M-EM. Effects of thrombin/thrombosis in angiogenesis and tumour progression. *Matrix Biology*. 2000;19(4):345-51.
226. Huang YQ, Li JJ, Hu L, Lee M, Karpatkin S. Thrombin induces increased expression and secretion of VEGF from human FS4 fibroblasts, DU145 prostate cells and CHRF megakaryocytes. *Thromb Haemost*. 2001;86(4):1094-8.
227. Tsopanoglou NE, Maragoudakis ME. On the mechanism of thrombin-induced angiogenesis. Potentiation of vascular endothelial growth factor activity on endothelial cells by up-regulation of its receptors. *J Biol Chem*. 1999;274(34):23969-76.
228. Sang BT, Wang CD, Liu X, Guo JQ, Lai JY, Wu XM. PDGF-BB/PDGFR $\beta$  induces tumour angiogenesis via enhancing PKM2 mediated by the PI3K/AKT pathway in Wilms' tumour. *Med Oncol*. 2023;40(8):240.
229. Crawford Y, Kasman I, Yu L, Zhong C, Wu X, Modrusan Z, et al. PDGF-C mediates the angiogenic and tumorigenic properties of fibroblasts associated with tumors refractory to anti-VEGF treatment. *Cancer Cell*. 2009;15(1):21-34.
230. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Karpatkin S. Growth Regulated Oncogene (GRO- $\alpha$ ) Is Pivotal in Thrombin-Induced Angiogenesis. *Blood*. 2005;106(11):530.

231. Caunt M, Hu L, Tang T, Brooks PC, Ibrahim S, Karpatkin S. Growth-regulated oncogene is pivotal in thrombin-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 2006;66(8):4125-32.
232. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-11.
233. Ovesný M, Křížek P, Borkovec J, Svindrych Z, Hagen GM. ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics.* 2014;30(16):2389-90.
234. Omar R, Cooper A, Maranyane HM, Zerbini L, Prince S. COL1A2 is a TBX3 target that mediates its impact on fibrosarcoma and chondrosarcoma cell migration. *Cancer Letters.* 2019;459:227-39.
235. Kohli M, Williams K, Yao JL, Dennis RA, Huang J, Reeder J, et al. Thrombin expression in prostate: a novel finding. *Cancer Invest.* 2011;29(1):62-7.
236. Elste AP, Petersen I. Expression of proteinase-activated receptor 1-4 (PAR 1-4) in human cancer. *J Mol Histol.* 2010;41(2-3):89-99.
237. Falanga A. Thrombophilia in Cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(01):104-10.
238. Kyriazi V, Theodoulou E. Assessing the Risk and Prognosis of Thrombotic Complications in Cancer Patients. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* 2013;137(9):1286-95.
239. Phillips KG, Lee AM, Tormoen GW, Rigg RA, Kolatkar A, Luttmgen M, et al. The thrombotic potential of circulating tumor microemboli: computational modeling of circulating tumor cell-induced coagulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;308(3):C229-36.
240. Lee AYY, Levine MN. Venous Thromboembolism and Cancer: Risks and Outcomes. *Circulation.* 2003;107(23\_suppl\_1):I-17-I-21.
241. Caine GJ, Stonelake PS, Lip GY, Kehoe ST. The hypercoagulable state of malignancy: pathogenesis and current debate. *Neoplasia.* 2002;4(6):465-73.
242. Nand S, Messmore H. Hemostasis in malignancy. *Am J Hematol.* 1990;35(1):45-55.
243. Yigit E, Gönüllü G, Yücel I, Turgut M, Erdem D, Cakar B. Relation between hemostatic parameters and prognostic/predictive factors in breast cancer. *Eur J Intern Med.* 2008;19(8):602-7.
244. Winther-Larsen A, Sandfeld-Paulsen B, Hvas AM. New Insights in Coagulation and Fibrinolysis in Patients with Primary Brain Cancer: A Systematic Review. *Semin Thromb Hemost.* 2022;48(3):323-37.
245. Pasma JJ, Posthuma JJ, Spronk HM. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J Thromb Haemost.* 2016;14(10):1908-16.

246. Davey MG, LÜscher EF. Actions of Thrombin and Other Coagulant and Proteolytic Enzymes on Blood Platelets. *Nature*. 1967;216(5118):857-8.
247. Coughlin SR. Protease-activated receptors and platelet function. *Thromb Haemost*. 1999;82(2):353-6.
248. Chen LB, Buchanan JM. Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(1):131-5.
249. Xue YH, Zhang XF, Dong QZ, Sun J, Dai C, Zhou HJ, et al. Thrombin is a therapeutic target for metastatic osteopontin-positive hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2010;52(6):2012-22.
250. Carney DH, Stiernberg J, Fenton JW, 2nd. Initiation of proliferative events by human alpha-thrombin requires both receptor binding and enzymic activity. *J Cell Biochem*. 1984;26(3):181-95.
251. Gospodarowicz D, Brown KD, Birdwell CR, Zetter BR. Control of proliferation of human vascular endothelial cells. Characterization of the response of human umbilical vein endothelial cells to fibroblast growth factor, epidermal growth factor, and thrombin. *J Cell Biol*. 1978;77(3):774-88.
252. Darmoul D, Gratio V, Devaud H, Lehy T, Laburthe M. Aberrant expression and activation of the thrombin receptor protease-activated receptor-1 induces cell proliferation and motility in human colon cancer cells. *Am J Pathol*. 2003;162(5):1503-13.
253. McEachron TA, Church FC, Mackman N. Regulation of thrombin-induced plasminogen activator inhibitor-1 in 4T1 murine breast cancer cells. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011;22(7):576-82.
254. Zain J, Huang YQ, Feng X, Nierodzik ML, Li JJ, Karpatkin S. Concentration-dependent dual effect of thrombin on impaired growth/apoptosis or mitogenesis in tumor cells. *Blood*. 2000;95(10):3133-8.
255. Yang Y, Stang A, Schweickert PG, Lanman NA, Paul EN, Monia BP, et al. Thrombin Signaling Promotes Pancreatic Adenocarcinoma through PAR-1-Dependent Immune Evasion. *Cancer Res*. 2019;79(13):3417-30.
256. Adams GN, Rosenfeldt L, Frederick M, Miller W, Waltz D, Kombrinck K, et al. Colon Cancer Growth and Dissemination Relies upon Thrombin, Stromal PAR-1, and Fibrinogen. *Cancer Res*. 2015;75(19):4235-43.
257. Nieman MT, LaRusch G, Fang C, Zhou Y, Schmaier AH. Oral thrombostatin FM19 inhibits prostate cancer. *Thromb Haemost*. 2010;104(5):1044-8.
258. Schulze EB, Hedley BD, Goodale D, Postenka CO, Al-Katib W, Tuck AB, et al. The thrombin inhibitor Argatroban reduces breast cancer malignancy and metastasis via osteopontin-dependent and osteopontin-independent mechanisms. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;112(2):243-54.

259. DeFeo K, Hayes C, Chernick M, Ryn JV, Gilmour SK. Use of dabigatran etexilate to reduce breast cancer progression. *Cancer Biol Ther.* 2010;10(10):1001-8.
260. Becherer PR, Mertz LF, Baenziger NL. Regulation of prostaglandin synthesis mediated by thrombin and B2 bradykinin receptors in a fibrosarcoma cell line. *Cell.* 1982;30(1):243-51.
261. Finetti F, Travelli C, Ercoli J, Colombo G, Buoso E, Trabalzini L. Prostaglandin E2 and Cancer: Insight into Tumor Progression and Immunity. *Biology (Basel).* 2020;9(12).
262. Cavallaro U, Christofori G. Molecular mechanisms of tumor angiogenesis and tumor progression. *J Neurooncol.* 2000;50(1-2):63-70.
263. Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Hinton DR, Gill PS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor-positive human tumors. *Blood.* 2001;98(6):1904-13.
264. Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W. Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature.* 1992;359(6398):845-8.
265. Christofori G, Luef S. Novel forms of acidic fibroblast growth factor-1 are constitutively exported by beta tumor cell lines independent from conventional secretion and apoptosis. *Angiogenesis.* 1997;1(1):55-70.
266. Giulianelli S, Cerliani JP, Lamb CA, Fabris VT, Bottino MC, Gorostiaga MA, et al. Carcinoma-associated fibroblasts activate progesterone receptors and induce hormone independent mammary tumor growth: A role for the FGF-2/FGFR-2 axis. *Int J Cancer.* 2008;123(11):2518-31.
267. Matei D, Emerson RE, Lai YC, Baldrige LA, Rao J, Yiannoutsos C, et al. Autocrine activation of PDGFRalpha promotes the progression of ovarian cancer. *Oncogene.* 2006;25(14):2060-9.
268. Daly C, Eichten A, Castanaro C, Pasnikowski E, Adler A, Lalani AS, et al. Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition. *Cancer Res.* 2013;73(1):108-18.
269. Zhang L, Yang N, Park J-W, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, et al. Tumor-derived Vascular Endothelial Growth Factor Up-Regulates Angiopoietin-2 in Host Endothelium and Destabilizes Host Vasculature, Supporting Angiogenesis in Ovarian Cancer1. *Cancer Research.* 2003;63(12):3403-12.
270. Lawler J. Thrombospondin-1 as an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Cell Mol Med.* 2002;6(1):1-12.
271. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 1992;3(2):65-71.
272. Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003;9(6):1144-55.

273. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2007;26(2):281-90.
274. Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM, Nicholls LG, Harris AL, Stratford IJ, et al. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(15):8104-9.
275. Detwiler KY, Fernando NT, Segal NH, Ryeom SW, D'Amore PA, Yoon SS. Analysis of hypoxia-related gene expression in sarcomas and effect of hypoxia on RNA interference of vascular endothelial cell growth factor A. *Cancer Res*. 2005;65(13):5881-9.
276. Nissen LJ, Cao R, Hedlund EM, Wang Z, Zhao X, Wetterskog D, et al. Angiogenic factors FGF2 and PDGF-BB synergistically promote murine tumor neovascularization and metastasis. *J Clin Invest*. 2007;117(10):2766-77.
277. Annese T, Ronca R, Tamma R, Giacomini A, Ruggieri S, Grillo E, et al. PTX3 Modulates Neovascularization and Immune Inflammatory Infiltrate in a Murine Model of Fibrosarcoma. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18).
278. Kalas W, Yu JL, Milsom C, Rosenfeld J, Benezra R, Bornstein P, et al. Oncogenes and Angiogenesis: down-regulation of thrombospondin-1 in normal fibroblasts exposed to factors from cancer cells harboring mutant ras. *Cancer Res*. 2005;65(19):8878-86.
279. Volpert OV, Lawler J, Bouck NP. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6343-8.
280. Hanyu A, Kojima K, Hatake K, Nomura K, Murayama H, Ishikawa Y, et al. Functional in vivo optical imaging of tumor angiogenesis, growth, and metastasis prevented by administration of anti-human VEGF antibody in xenograft model of human fibrosarcoma HT1080 cells. *Cancer Sci*. 2009;100(11):2085-92.
281. Albig AR, Neil JR, Schiemann WP. Fibulins 3 and 5 antagonize tumor angiogenesis in vivo. *Cancer Res*. 2006;66(5):2621-9.
282. Rhim TY, Park CS, Kim E, Kim SS. Human prothrombin fragment 1 and 2 inhibit bFGF-induced BCE cell growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252(2):513-6.
283. Kim BJ, Koo SY, Kim SS. A peptide derived from human prothrombin fragment 2 inhibits prothrombinase and angiogenesis. *Thromb Res*. 2002;106(1):81-7.
284. Chan B, Merchan JR, Kale S, Sukhatme VP. Antiangiogenic property of human thrombin. *Microvasc Res*. 2003;66(1):1-14.
285. Kim TH, Kim E, Yoon D, Kim J, Rhim TY, Kim SS. Recombinant human prothrombin kringles have potent anti-angiogenic activities and inhibit Lewis lung carcinoma tumor growth and metastases. *Angiogenesis*. 2002;5(3):191-201.
286. Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY, Young WL. Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal

hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke*. 2004;35(7):1715-9.

287. Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Stamp-Cole M, Scott PS, Wallace TL, Copeland J, et al. The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;36(5):418-24.

288. Cox CA, Amaral J, Salloum R, Guedez L, Reid TW, Jaworski C, et al. Doxycycline's effect on ocular angiogenesis: an in vivo analysis. *Ophthalmology*. 2010;117(9):1782-91.

289. He L, Marneros AG. Doxycycline inhibits polarization of macrophages to the proangiogenic M2-type and subsequent neovascularization. *J Biol Chem*. 2014;289(12):8019-28.

290. Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc*. 2007;2(2):247-50.

291. Qi Lei S, Larson Matthew H, Gilbert Luke A, Doudna Jennifer A, Weissman Jonathan S, Arkin Adam P, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell*. 2013;152(5):1173-83.

292. Ruhlmann CH, Iversen TZ, Okera M, Muhic A, Kristensen G, Feyer P, et al. Multinational study exploring patients' perceptions of side-effects induced by chemo-radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2015;117(2):333-7.

293. Fiets WE, van Helvoirt RP, Nortier JW, van der Tweel I, Struikmans H. Acute toxicity of concurrent adjuvant radiotherapy and chemotherapy (CMF or AC) in breast cancer patients. a prospective, comparative, non-randomised study. *Eur J Cancer*. 2003;39(8):1081-8.

294. Liu YQ, Wang XL, He DH, Cheng YX. Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. *Phytomedicine*. 2021;80:153402.

295. Pasini F, Durante E, De Manzoni D, Rosti G, Pelosi G. High-dose chemotherapy in small-cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2002;22(6b):3465-72.

296. Sengeløv L, von der Maase H. Radiotherapy in bladder cancer. *Radiother Oncol*. 1999;52(1):1-14.

297. Amer MH, Al-Sarraf M, Vaitkevicius VK. Factors that affect response to chemotherapy and survival of patients with advanced head and neck cancer. *Cancer*. 1979;43(6):2202-6.

298. Shiravand Y, Khodadadi F, Kashani SMA, Hosseini-Fard SR, Hosseini S, Sadeghirad H, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer Therapy. *Curr Oncol*. 2022;29(5):3044-60.

299. Nasr R, Bazarbachi A. [Chronic myeloid leukemia: "archetype" of the impact of targeted therapies]. *Pathol Biol (Paris)*. 2012;60(4):239-45.

300. Zhao B, Wu M, Hu Z, Ma Y, Qi W, Zhang Y, et al. Thrombin is a therapeutic target for non-small-cell lung cancer to inhibit vasculogenic mimicry formation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):117.

301. Franchini M, Mannucci PM. Thrombin and cancer: from molecular basis to therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38(1):95-101.

## 7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt [REDACTED], der mir die Möglichkeit zur Promotion eröffnet und mich während meiner gesamten Forschungsarbeit unermüdlich unterstützt hat. Seine wissenschaftliche Expertise und kontinuierliche Förderung waren von entscheidender Bedeutung für den Erfolg dieser Arbeit. Ebenso danke ich dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) für die finanzielle Unterstützung durch das "Doctoral Candidate Fellowship", das mir die Durchführung meiner Forschung in diesem Umfang erheblich erleichtert hat. Des Weiteren möchte ich mich bei [REDACTED] bedanken, der sich freundlicherweise bereit erklärt hat, als Zweitgutachter die Bewertung meiner Dissertation zu übernehmen. Seine Expertise und Zeit weiß ich sehr zu schätzen. Besonderen Dank richte ich auch an [REDACTED] für seine exzellente Betreuung während meiner Forschungsarbeit und an [REDACTED] für seine wertvolle Unterstützung bei den Tierversuchen. Großer Dank gilt auch [REDACTED], die durch ihre Durchführung der FISH-Untersuchungen entscheidende Daten für meine Arbeit geliefert hat.

Ein herzlicher Dank geht auch an alle Kolleginnen und Kollegen meiner Arbeitsgruppe sowie der Arbeitsgruppe von [REDACTED]. Sie haben mich nicht nur in die wissenschaftlichen Methoden eingearbeitet, sondern mir auch stets hilfreiche Denkanstöße gegeben und eine freundliche, produktive Arbeitsatmosphäre geschaffen. Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, meinen Freunden und meiner Partnerin, die mich während dieser intensiven Zeit stets unterstützt, motiviert und mir emotional zur Seite gestanden haben.

Vielen Dank an alle!

## 8 Tabellarischer Lebenslauf

**Ludwig Thomas Eder**

**Geburtstag:** 22.03.1994 in Augsburg

**Nationalität:** deutsch, österreichisch



### Berufserfahrung

- 07/2022 – 06/2024 **Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin**  
Hausarztpraxis Dr. R. Widmer und A. Meißner, Garching b. M.
- 05/2021 – 04/2022 **Praktisches Jahr**  
Chirurgie, Universitätsmedizin Mainz  
Allgemeinmedizin, Gemeinschaftspraxis Mainz Mitte, Dres.  
Regner und Schmitt  
Innere Medizin, Universitätsmedizin Mainz
- 10/2018 – 12/2020 **Wissenschaftliche Hilfskraft**  
Universitätsmedizin Mainz, AG Danckwardt
- 08/2013 – 03/2015 **Rettungsanitäter bzw. Rettungsassistent**  
Aicher Ambulanz Union, München

### Schulische, universitäre und berufliche Bildung

- aktuell **Promotionsvorhaben**  
Anmeldung: 29.10.2020  
Titel: Auswirkungen von Tumor-intrinsischer Prothrombin-  
Expression in Fibrosarkomen auf Blutgerinnung,  
Tumorstadium und Angiogenese  
Betreuer: Prof. Dr. Sven Danckwardt  
Stipendium: Doctoral Candidate Fellowship, CTH
- 04/2015 – 05/2022 **Studium der Humanmedizin**  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote 2,6; Approbation
- 01/2013 – 12/2014 **Ausbildung zum Rettungsassistenten**  
Medakademie München; Aicher Ambulanz Union, München

10/2012 – 01/2013

**Ausbildung zum Rettungssanitäter**

Medakademie München

09/2004 – 06/2012

**Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)**

Werner-Heisenberg-Gymnasium, Garching b. M.

Abschlussnote 1,6

**Sprachkenntnisse**

Muttersprache: Deutsch

Weitere Sprachen: Englisch

**Hobbys und Interessen**

Klavier, Surfen, Snowboarden, Gesellschaftsspiele