

Aus der Klinik für Nephrologie und internistische Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Ets-1 induzierte Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch  
Auto - Antikörper bei systemischer Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Philine Wagner

aus Berlin

Datum der Promotion: 09.12.2016

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis</b>   | <b>2</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Abstrakt Deutsch</b>   | <b>7</b>  |
| <b>Abstrakt Englisch</b>  | <b>9</b>  |
| <br>  |           |
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>10</b> |
| 1.1 Systemische Sklerose – Überblick  | 10        |
| 1.2 Pathophysiologie der systemischen Sklerose  | 11        |
| 1.3 Klinische Erscheinungsformen der systemischen Sklerose  | 12        |
| 1.4 Folgen der systemischen Sklerose  | 12        |
| 1.4.1 Vaskulopathie   | 12        |
| 1.4.2 Intravaskuläre Koagulation  | 14        |
| 1.5 Die Rolle von Vasoregulatoren in der systemischen Sklerose  | 15        |
| 1.5.1 Angiotensin II  | 15        |
| 1.5.2 Endothelin-System   | 16        |
| 1.6 Anti-AT <sub>1</sub> R- und Anti-ET <sub>A</sub> R-Antikörper vermittelte Vaskulopathien in der systemischen Sklerose | 16        |
| 1.7 Therapieformen der systemischen Sklerose  | 18        |
| 1.8 Fragestellung   | 19        |
| <br>  |           |
| <b>2. Material und Methoden</b>   | <b>20</b> |
| <b>2.1 Materialien</b>  | <b>20</b> |
| 2.1.1 Zellkultur- und Verbrauchsmaterial  | 20        |
| 2.1.2 Stimulanzen   | 21        |
| 2.1.3 Chemikalien   | 21        |
| 2.1.4 Molekularbiologische Produkte   | 23        |
| 2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer   | 24        |
| 2.1.6 Geräte  | 26        |
| <b>2.2 Methoden</b>   | <b>28</b> |
| 2.2.1 Zellkultur (HEK-293, HMEC-1)  | 28        |
| 2.2.1.1 Kultivierung HEK-293  | 28        |
| 2.2.1.2 Kultivierung HMEC-1   | 28        |
| 2.2.1.3 Kryokonservierung der Zellen  | 29        |
| 2.2.1.4 Mykoplasmentest   | 29        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.2.2     | IgG-Isolation  | 30        |
| 2.2.2.1   | Patientenmaterial  | 30        |
| 2.2.2.2   | Isolation von IgG aus Plasma   | 30        |
| 2.2.2.3   | Dialyse  | 31        |
| 2.2.3     | Quantitative Real Time-PCR (RTq-PCR)   | 31        |
| 2.2.4     | Western Blot   | 32        |
| 2.2.5     | Klonierung von Tissue Faktor Promotorfragmenten in den pGL4.10[ <i>luc2</i> ] Vektor       | 33        |
| 2.2.5.1   | Isolation von genomischer DNA aus HMEC-1   | 34        |
| 2.2.5.2   | Messung der DNA Konzentration  | 35        |
| 2.2.5.3   | Amplifizierung der TF Promotor Fragmente 856, 673 und 420 bp                               | 35        |
| 2.2.5.4   | Elektrophoretische Auftrennung der DNA mit anschließender<br>Fragmentelution               | 37        |
| 2.2.5.5   | Restriktion der TF Promotorfragmente und des pGL4.1 Vektors mit<br>anschließender Ligation | 38        |
| 2.2.5.6   | Transformation in den E.coli Stamm DH5 $\alpha$  | 39        |
| 2.2.5.7   | Mini Präparation der Plasmid-DNA   | 40        |
| 2.2.5.8   | Restriktion  | 40        |
| 2.2.5.9   | Verifizierung der Klone durch Sequenzierung  | 41        |
| 2.2.5.10  | Midi-Präparation der Plasmid-DNA   | 41        |
| 2.2.5.11  | Herstellung von Glycerinkulturen   | 42        |
| 2.2.6     | Transfektion   | 42        |
| 2.2.6.1   | Etablierung der Transfektion mit GFP-Konstrukten   | 42        |
| 2.2.6.2   | Transfektion der HEK-293 und HMEC-1 mit den pGL-Konstrukten                                | 43        |
| 2.2.7     | Dual-Luciferase Reporter Assay   | 43        |
| 2.2.8     | Statistik  | 44        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>45</b> |
| 3.1       | Übersicht der verwendeten Patientenplasmen   | 45        |
| 3.2       | Charakterisierung der HEK-293 und HMEC-1 Zellen  | 45        |
| 3.2.1     | Angiotensin- und Endothelin Rezeptor Expression in HEK-293 und HMEC-1                      | 45        |
| 3.2.2     | TF und asHTF mRNA-Expression in HEK-293 und HMEC-1 Zellen                                  | 46        |
| 3.3       | Klonierung der Tissue Faktor Promotorfragmente   | 47        |
| 3.3.1     | Isolation von genomischer DNA aus HMEC-1   | 47        |
| 3.3.2     | Optimierung der TF Promotorfragment Amplifikation mittels Gradienten PCR                   | 48        |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 3.3.3     | Amplifikation der TF Promotorfragmente für die Ligation   | 49        |
| 3.3.4     | Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide   | 50        |
| 3.3.5     | Screening der positiven Plasmide mittels Sequenzierung  | 51        |
| 3.3.6     | Optimierung der Transfektionseffizienz  | 51        |
| 3.4       | Induktion der Tissue Faktor Promotoraktivität bei HEK-293 und HMEC-1  | 52        |
| 3.4.1     | Aktivierung des TF Promotors durch Ang II und ET-1  | 52        |
| 3.4.2     | Messung der TF Promotor Aktivität des Konstrukts pGL-673 nach Stimulation mit natürlichen Liganden und Inhibierung durch AT <sub>1</sub> R- und ET <sub>A</sub> R Blocker | 54        |
| 3.4.3     | Regulation des TF-Promotors durch AT <sub>1</sub> R/ET <sub>A</sub> R-IgG   | 55        |
| 3.4.4     | Messung der AT <sub>1</sub> R/ET <sub>A</sub> R-IgG induzierten TF Promotor Aktivität mit und ohne AT <sub>1</sub> R- und ET <sub>A</sub> R Blocker                       | 56        |
| 3.4.5     | Einfluss von AT <sub>2</sub> R - und ET <sub>B</sub> R Blockern auf die AT <sub>1</sub> R/ET <sub>A</sub> R-IgG induzierte TF Promotor Aktivität bei HMEC-1               | 57        |
| 3.5       | Ets-1   | 58        |
| 3.5.1     | Ets-1 Exprimierung der HEK-293 und HMEC-1 Zellen  | 58        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>   | <b>60</b> |
| 4.1       | Zellkulturmodelle   | 60        |
| 4.1.1     | Rezeptorexprimierung  | 60        |
| 4.1.2     | Tissue Faktor Exprimierung  | 62        |
| 4.2       | Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch die natürlichen Liganden   | 63        |
| 4.3       | Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch AT <sub>1</sub> R/ET <sub>A</sub> R-IgG  | 64        |
| 4.4       | Transkriptionelle Regulation des Tissue Faktors durch Stimulation mit AT <sub>1</sub> R/ET <sub>A</sub> R-IgG und den natürlichen Liganden                                | 65        |
| 4.5       | Zusammenfassung und Ausblick  | 67        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>  | <b>70</b> |
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b>   | <b>71</b> |
|           | Eidesstattliche Versicherung  | 82        |
|           | Lebenslauf (wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht)   | 83        |
|           | Publikationen   | 85        |
|           | Vorträge und Poster   | 87        |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| AECA               | anti-endotheliale Antikörper                                       |
| Ang II             | Angiotensin II   |
| AP-1               | <i>Activator protein 1</i>   |
| asHTF              | <i>alternatively spliced Human Tissue Factor</i>                   |
| ATP                | Adenosintriphosphat  |
| AT <sub>1</sub> R  | Angiotensin II Typ 1 Rezeptor                                      |
| AT <sub>2</sub> R  | Angiotensin II Typ 2 Rezeptor                                      |
| bp                 | Basenpaare   |
| BSA                | Bovines Serumalbumin   |
| cDNA               | komplementäre Desoxyribunukleinsäure                               |
| Ct                 | <i>Cycle threshold</i>   |
| dcSSc              | diffuse systemische Sklerose                                       |
| ddH <sub>2</sub> O | doppelt destilliertes Wasser                                       |
| DMEM               | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>                          |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP               | Desoxyribonukleosidtriphosphate                                    |
| DTT                | Dithiothreitol   |
| E.coli             | <i>Escherichia coli</i>  |
| EBM                | Endothel Basal Medium  |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure                                       |
| EGF                | <i>Epidermal Growth Factor</i>                                     |
| Ets-1              | <i>v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)</i> |
| ET-1               | Endothelin-1   |
| ET <sub>A</sub> R  | Endothelin-1 Typ A Rezeptor  |
| ET <sub>B</sub> R  | Endothelin-1 Typ B Rezeptor  |
| EULAR              | European League Against Rheumatism                                 |
| EUSTAR             | European Scleroderma Trials and Research Group                     |
| FCS                | Fetales Kälberserum  |
| Fli1               | <i>Friend leukemia virus integration 1</i>                         |
| Fra2               | <i>Fos related antigen 2</i>                                       |
| fwd                | <i>forward</i>   |

|              |   |
|--------------|---|
| GAPDH        | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase            |
| GFP          | <i>Green Fluorescent Protein</i>                    |
| GP           | Glycerophosphat                                     |
| HDMEC        | <i>Human dermal microvascular endothelial cells</i> |
| HGF          | <i>Hepatocyte growth factor</i>                     |
| HEK-293      | humane embryonale Nierenzellen                      |
| HMEC-1       | humane mikrovaskuläre Endothelzellen                |
| IgG          | Immunglobulin G                                     |
| Kon          | Kontrolle   |
| lcSSc        | limitierte systemische Sklerose                     |
| LAR II       | Luciferase Assay Reagenz II                         |
| LB           | <i>lysogeny broth</i>                               |
| luc2         | <i>Firefly Luciferase</i>                           |
| mRNA         | <i>messenger RNA</i>                                |
| PAH          | primäre pulmonale Hypertonie                        |
| PAI          | <i>Plasminogen activator inhibitor</i>              |
| PBSP         | Phosphat gepufferte Salzlösung                      |
| PCR          | Polymerase-Kettenreaktion                           |
| PDGF         | <i>Platelet-derived growth factor</i>               |
| P/S          | Penicillin/Streptomycin                             |
| rev          | <i>reverse</i>                                      |
| RLU          | Relative Lichteinheiten                             |
| Sitax        | Sitaxentan  |
| SSc          | systemische Sklerose                                |
| SP1          | <i>signal protein 1</i>                             |
| SRC          | Skleroderma renal crisis                            |
| TBE          | TRIS-Borat-EDTA-Puffer                              |
| TBST         | <i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>                |
| TF           | Tissue Faktor                                       |
| TGF          | <i>Transforming growth factor</i>                   |
| THP-1 Zellen | <i>Human monocytic cell line</i>                    |
| Vals         | Valsartan   |
| VSMC         | <i>Vascular smooth muscle cells</i>                 |

## **Ets-1 induzierte Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch**

### **Auto - Antikörper bei systemischer Sklerose**

Philine Wagner

**Abstract (335 Wörter, Limit 400)**

#### **Einleitung**

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine zu den Kollagenosen gehörende Autoimmunerkrankung, die mit einer Fibrosierung der Haut und innerer Organe, immunologischen Veränderungen und Vaskulopathie einhergeht. Bekannt ist, dass agonistisch wirkende Autoantikörper (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG) gegen den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor und den Endothelin-1 Typ A Rezeptor eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der SSc spielen und mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko assoziiert sind. Neben einer gesteigerten Endothelzellproliferation und Fibrosierung begünstigt eine endotheliale Dysfunktion die Entstehung von *in situ* Thrombosen mit Ausbildung einer obliterativen Vaskulopathie, die vor allem das mikrovaskuläre System betrifft. Dem prothrombotisch wirkenden Tissue Faktor (TF) kommt dabei eine entscheidende Rolle beim Gerinnungsprozess *in vivo* zu.

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche transkriptionelle Regulation des TF Promotors durch Autoantikörper von SSc-Patienten als neuen Pathomechanismus der thrombotisch obliterativen Vaskulopathie bei der SSc aufzuklären.

#### **Methodik**

Die Experimente erfolgten mit zwei Zelllinien: menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) und immortalisierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1).

Zur Darstellung der transkriptionellen Regulation des TF wurden unterschiedlich große TF Promotorfragmente in einen pGL4.10 [*luc*] Vektor mit Firefly Luciferase-Gen kloniert und somit rekombinante Plasmide hergestellt. Die Aktivierung des TF Promotors nach Stimulation wurde mittels eines Dual-Luciferase Reporter Assays gemessen. Zur Stimulation wurden neben dem AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG die natürlichen Liganden Angiotensin II (Ang II) und Endothelin-1 (ET-1) sowie entsprechende spezifische AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub> -Rezeptorantagonisten zur Bestimmung einer rezeptorabhängigen Aktivierung eingesetzt.

#### **Ergebnisse**

Die Stimulationsexperimente zeigten, dass AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 zu einer Hochregulation des TF Promotors führen. Diese Aktivierung konnte durch spezifische AT<sub>1</sub> - und ET<sub>A</sub> -Rezeptorblocker inhibiert werden. Darüberhinaus wurde gezeigt, dass der TF eine hochspezifische Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Ets-1 aufweist (-448

bis -441 bp), über den AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 den TF Promotor aktivieren.

### **Schlussfolgerung**

AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG trägt AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>R-abhängig über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 und verstärkte TF Expression zur Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie bei der SSc bei. Hieraus ergeben sich neue Therapiemöglichkeiten.

# **Ets-1 induced Tissue Factor promotor activation by autoantibodies in systemic sclerosis**

Philine Wagner

**Abstract (word count 350, limit 400)**

## **Background**

Systemic sclerosis (SSc) is a multisystem autoimmune disease, which is characterized by skin fibrosis and fibrosis of internal organs, vascular damage and autoimmunity. Functional autoantibodies (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG) against angiotensin II type 1 receptor and endothelin-1 type A receptor play a central role in the pathogenesis of this disease and are associated with a higher risk of mortality. Endothelial dysfunction triggers not only endothelial proliferation and fibrosis but also *in situ* thrombosis, resulting in obliterative vasculopathy, especially of the microvascular system.

Tissue Factor (TF), which initiates the blood coagulation cascade *in vivo*, plays a key role in creating *in situ* thrombosis. As an underlying hypothesis, a transcriptional regulation of the TF promoter by AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG is assumed for the purpose of this research.

## **Methods**

The experiments were performed with two different cell lines:

Human embryonic kidney cells (HEK-293) as well as human microvascular endothelial cells (HMEC-1). To illustrate the transcriptional regulation of the TF, different sizes of TF promoter fragments were cloned in a pGL4.10 [*luc*] vector with a Firefly Luciferase-Gen and lead to the production of recombinant plasmids. The TF promoter activation was measured by a Dual-Luciferase Reporter Assay, which was proportional to the light emission by Firefly Luciferase. Cells were stimulated with AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG and natural ligands Angiotensin-II (Ang II) and Endothelin-1 (ET-1) and blocked with specific AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub> receptor blockers.

## **Results**

It could be shown that AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG, isolated from patients with SSc, as well as the natural ligands Ang II and ET-1 lead to an activation of the TF promoter in HMEC-1. This activation could be abolished with specific AT<sub>1</sub> and ET<sub>A</sub> receptor blockers. Furthermore, it could be proven that the TF promoter includes a highly specific binding site for the transcription factor Ets-1 (-448 to -441 bp) which was induced by AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG and natural ligands.

## **Conclusion**

In interaction with AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG, TF and Ets-1 are involved in the pathogenesis of obliterative vasculopathy by SSc via activation of AT<sub>1</sub>R and ET<sub>A</sub>R. This finding has potential to lead towards new therapy methods.

## 1 Einleitung

### 1.1 Systemische Sklerose - Überblick

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine Multiorganerkrankung, die durch Autoantikörper, Fibrosierung der Haut und inneren Organe, Entzündung sowie eine schwere obliterative Vaskulopathie charakterisiert ist. Häufig ist der Verlauf schwer mit einer mittleren 10-Jahres-Überlebensrate von 54-66% [1].

Die obliterative Vaskulopathie entsteht durch ein Zusammenspiel zwischen immunologischen und vaskulären Veränderungen. Bei der SSc ist vor allem das mikrovaskuläre System betroffen, eine makrovaskuläre Beteiligung wird jedoch auch beschrieben [2, 3].

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Patientenkohorten mit SSc fanden sich agonistisch wirkende Autoantikörper (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG) gegen den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper) und den Endothelin-1 Typ A Rezeptor (Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper). Es konnte gezeigt werden, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie der SSc spielen und mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert sind [4]. Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper sind ebenfalls sowohl bei der Präeklampsie, als auch bei der Nieren- und Herztransplantatabstoßung beschrieben worden [5, 6, 7]. Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper sind neben der systemischen Sklerose auch bei der Herztransplantatabstoßung involviert [7]. Ein Zusammenhang zwischen Gefäßschädigung und AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG ist bereits bekannt. Im Gegensatz zu den natürlichen Liganden Angiotensin II (Ang II) und Endothelin-1 (ET-1), bewirken Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper eine Endothelzellproliferation (Intimaprolieration) [8]. Durch eine Dysregulation des vaskulären Remodelings kommt es zu einer Endothelschädigung und endothelialen Dysfunktion, die zu einer Intimaprolieration, Hypertrophie der Media, einem progredienten fibrotischen Umbau der Media, Intima und Adventitia und *in situ* Thrombosen beiträgt und in einem Gefäßverschluss, der obliterativen Vaskulopathie, kumuliert [9, 10, 11]. Unter anderem kommt es dabei zu einem Koagulationsstimulus und einer Aktivierung des Gerinnungssystems [12].

Eine zentrale Rolle spielt dabei der prothrombotisch und proinflammatorisch wirkende Tissue Faktor (TF), der zusammen mit Prokonvertin den extrinsischen Pfad der Blutgerinnung bildet [13, 14]. Es konnte gezeigt werden, dass Nierenbiopsien von Patienten mit Nierentransplantatabstoßung *und* Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern eine erhöhte TF Expression aufweisen [6]. Bekannt ist, dass in der Pathogenese der Nierentransplantatabstoßung das Gerinnungssystem eine entscheidende Rolle spielt [6, 15].

Ein möglicher Pathomechanismus erhöhter TF Expression durch Autoantikörper könnte in einer transkriptionellen Regulation des TF Promotors durch Ets-1 liegen.

Ets-1, zu der Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren gehörend, ist ein kritischer Regulator für Ang II vermittelte entzündliche Prozesse an Gefäßen und ist unter anderem mit endothelialer Zellproliferation und Angiogenese assoziiert [16, 17, 18, 19].

Die Aufdeckung dieser Pathogenese könnte neue Aspekte einer spezifischen Therapie in der SSc begründen.

## 1.2 Pathophysiologie der systemischen Sklerose

Die Ätiologie der SSc konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Eine positive Familienanamnese ist mit einem häufigeren Auftreten assoziiert. Auch das Cytomegalievirus und Parvovirus B19 sind als möglicher Auslöser der Autoimmunkrankheit in der Diskussion [20, 21]. Die SSc ist durch die Trias Fibrose, Autoimmunität und Vaskulopathie gekennzeichnet [22]. In der Haut entwickelt sich eine Fibrose mit Vermehrung der Kollagenfasern Typ I und III [23]. Bei der vor allem das mikrovaskuläre System betreffenden Vaskulopathie kommt es neben einer Intimaproliferation zu einem entzündlich fibrotischen Prozess mit *in situ* Thrombosen, die zu der obliterativen Vaskulopathie führt [10, 11] (vgl. Abb.1). Eine bedeutende Rolle spielen dabei Autoantikörper, die bereits in großer Zahl identifiziert wurden und einen entscheidenden Stellenwert als Biomarker bei dieser Erkrankung einnehmen [24].

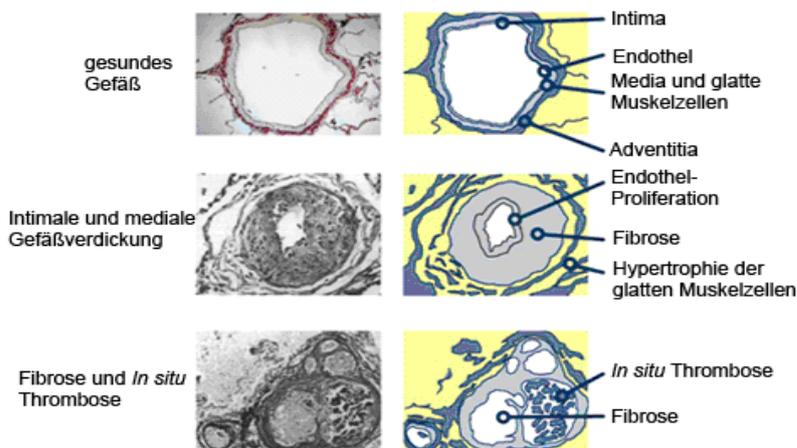


Abbildung 1: Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose

[nach PAH-info.com].

### 1.3 Klinische Erscheinungsformen der systemischen Sklerose

Die SSc, zu den Kollagenosen gehörend, ist ein Zusammenspiel von stimulierenden Autoantikörpern, Vaskulopathie und Fibrose [4]. Die SSc ist im Gegensatz zu der auf die Haut beschränkten Sklerodermie eine Multiorganerkrankung, die sich durch eine fortschreitende Fibrosierung der Haut und inneren Organe auszeichnet. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr. Frauen sind häufiger betroffen als Männer [25].

Die Erkrankung zeichnet sich durch eine Variabilität im Verlauf und in der Organbeteiligung aus [26]. Früh tritt neben einem verkürzten unteren Zungenbändchen das Raynaud-Phänomen als Erstsymptom auf [26, 27, 28]. Im Verlauf kann man unter anderem verschmälerte Finger (Madonnenfinger), eine Mikrostomie, „Rattenbissnekrosen“ als Folge des Raynaud Phänomens und ein Maskengesicht beobachten [26, 27, 28]. Der *Transforming Growth Factor* (TGF- $\beta$ ) ist ein profibrotisches Zytokin und wurde vermehrt in Hautproben von Patienten mit SSc gefunden [29].

Die Klassifikation der SSc erfolgt nach den ACR-Kriterien, ACR/EULAR-Kriterien sowie nach LeRoy [28]. Unterteilt wird die SSc in eine limitierte und diffuse Form, entsprechend der Kriterien nach LeRoy [30, 31]. Die sich durch einen langsamen Progress auszeichnende limitierte Form ist charakterisiert durch eine Fibrose distal der Ellenbogen- und Kniegelenke, ein spätes, aber häufiges Vorkommen der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) sowie eine gastrointestinale Beteiligung [30], die sich unter anderem in Refluxbeschwerden, Dysphagie, Meteorismus, Diarrhoen und Obstipation äußert [28]. Die diffuse Form ist durch einen raschen Verlauf mit Fibrosierung am Stamm und an den Akren und einem frühen Organbefall gekennzeichnet [30]. Bei der limitierten Form ist der Verlauf günstiger, mit einer Fünfjahres-Überlebensrate von 86% [30]. Selten ist die systemische Sklerose sine Sklerodermie (ssSSC), bei der nur die inneren Organe betroffen sind [32]. Eine Sonderform der limitierten SSc nimmt das CREST-Syndrom ein. Es setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der folgenden Symptome zusammen: Calcinosis, Raynaud-Syndrom, Ö(E)sophagusmotilitätsstörungen, Sklerodaktylie, Teleangiektasie [33].

### 1.4 Folgen der systemischen Sklerose

#### 1.4.1 Vaskulopathie

Die obliterative Vaskulopathie ist ein Hauptaspekt bei der SSc. Die vaskuläre Dysfunktion, die zu den frühen Erscheinungen der Erkrankung gehört, geht mit einer Dysbalance zwischen

Vasokonstriktion und Vasodilatation einher [11]. Eine endotheliale Dysfunktion ist auch bei dem systemischen Lupus erythematoses und der Rheumatoiden Arthritis beschrieben und führt durch die „Response to injury“ Hypothese zur Atherosklerose [34, 35].

Bei der SSc ist das vasokonstriktive Endothelin-1 deutlich überexprimiert, die Vasodilatoren wie Nitritoxid (NO) oder Prostaglandine sind stark vermindert [11]. Dieses Missverhältnis mündet in oxidativem Stress und einer vaskulären Ischämie [11, 36]. Endothelschädigung, Leukozytenrekrutierung mit T-Zell vermittelter Entzündung, Fibrose und *in situ* Thrombosen sind die Folge [36]. Die endotheliale Apoptose in der SSc ist vor allem mit den anti-endothelialen Antikörpern (AECA) assoziiert. Bei *human dermal microvascular endothelial cells* (HDMEC) wurde *in vitro* unter AECA positiven SSc-Seren eine endotheliale Apoptose beobachtet [37].

Betroffen sind bei der SSc vor allem die kleinen Arterien und Kapillaren [11]. Das angiographische Korrelat weist oft eine generalisierte Engstellung der Gefäße auf. Es treten unter anderem segmentale Stenosen und Verschlüsse der Digitalarterien mit schlechter Kollateralenbildung auf, die zu digitalen Ulzerationen führen [38]. Viele der Patienten mit SSc weisen als Korrelat der mikrovaskulären Schädigung ein Raynaud Syndrom auf. Die Vasospasmen des Raynaud Syndroms sind gekennzeichnet durch anfallsartige Weiß- und Blauverfärbungen der Finger und/oder Zehen [39].

Das Raynaud Syndrom verläuft meist dreiphasig (sogenanntes Tricolore Phänomen) [39]:

1. Ischämie durch Minderdurchblutung (Vasokonstriktion)
2. Zyanose durch Hypoxie
3. Reaktive Hyperämie (Vasodilatation)

Bei längerem Bestehen können Sekundärschäden der Gefäßwände mit Nekrosen und Gangrän auftreten [39]. Teleangiektasien, diese vor allem an Handinnenflächen und im Gesicht auftreten, sind ebenfalls Ausdruck von Vaskulopathien [28]. Vasospastische Durchblutungsstörungen können sich auch an den inneren Organen, wie Niere, Lunge, Herz und Magen-Darmtrakt („Raynaud-Phänomen der inneren Organe“) darstellen [11, 28].

Der Gastrointestinaltrakt ist fast immer beteiligt und kann alle Abschnitte des Darmtraktes befallen [28]. Die Beteiligung der Lunge ist neben der renalen Krise die häufigste Todesursache bei Patienten mit SSc [40]. Bei der Lungenbeteiligung kann man die Lungenfibrose und die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) unterscheiden [40]. Die Lungenfibrose äußert sich in einer restriktiven Ventilationsstörung mit Verminderung der Vitalkapazität und dem totalen

Lungenvolumen [41]. Neben der Mediahypertrophie kommt es hierbei zur Intimaproliferation oder adventitiellen Fibrose [42]. Schwerwiegend ist ebenfalls eine vaskuläre Nierenbeteiligung. Die *skleroderma renal crisis* (SRC), diese unter anderem mit einer Proteinurie, hämolytischen Anämie sowie einem schweren arteriellen Hypertonus einhergeht, kann ein oligurisches Nierenversagen mit Dialysepflicht auslösen [43]. Histopathologisch wird eine Intimaproliferation und Fibrose der Adventitia beschrieben [43, 44]. Aufgrund der vaskulären Veränderungen und Fibrosierung wird eine, jedoch eher seltene, Herzbeteiligung ebenfalls beobachtet [45, 46].

### 1.4.2 Intravaskuläre Koagulation

Ein bedeutsamer pathogenetischer Faktor der obliterativen Vaskulopathie ist der Tissue Faktor (TF). Aufgrund seiner großen Sequenzhomologie in der Sekundär- und Tertiärstruktur zum Interferon- $\alpha$ -Rezeptor wird der TF der Familie der Klasse II-Zytokinrezeptoren zugeordnet [47]. Der TF wird im Rahmen einer einheitlichen Nomenklatur als Thromboplastin, Faktor III oder CD 142 bezeichnet und ist ein an der Blutgerinnung beteiligtes Protein [48]. Als potentielle Quellen gelten Leukozyten, Thrombozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen [47]. Die wichtigsten Mechanismen der Mikropartikel-Freisetzung aus diesen Zellen sind Zellaktivierung und Apoptose [47, 49, 50]. Der Komplex aus TF und Proconvertin (Faktor VIIa) katalysiert die Umwandlung des inaktiven Stuart-Prower-Faktors (Faktor X) in die aktive Form (Xa). Der TF-VIIa Komplex bildet den extrinsischen Pfad der Blutgerinnung, der zur Bildung von Thrombin und schließlich von Fibrin führt [51]. Neben seiner Funktion als Initiator des Gerinnungssystems besitzt der TF eine wichtige Rolle als Modulator von Entzündungsreaktionen [52]. Er ist unter anderem ein Zielgen für den bei entzündlichen Prozessen eine Rolle spielenden Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B [6]. Dieser kann durch anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper aktiviert werden [6]. Die Arbeitsgruppe um Osterud konnte zeigen, dass bei dem septischen Schock inflammatorische Zytokine und angiogenetische Faktoren zu einer Expression von TF und somit zu einer vermehrten Gerinnungsaktivierung führen [53]. Die Serumspiegel der Zytokine TNF $\alpha$  und Il-6 sind bei Patienten mit SSc deutlich erhöht [54]. Darüber hinaus ist der TF an der Pathogenese der Atherosklerose und bei der Entstehung von Thrombosen beteiligt [14, 52, 55, 56]. Aufgrund einer erhöhten Aktivierung der Gerinnung, ist bei der SSc das Risiko für eine tiefe Beinvenenthrombose und Lungenarterienembolie erhöht [57].

Ein Zusammenhang zwischen dem TF und Transkriptionsfaktoren ist beschrieben worden [18,

58]. Die Arbeitsgruppe von Arderiu G. et al beobachtete eine TF induzierte Ets-1 Expression in HMEC Zellen, die in TF inaktivierten Zellen signifikant reduziert war [18].

## 1.5 Die Rolle von Vasoregulatoren in der systemischen Sklerose

### 1.5.1 Angiotensin II

Ang II ist ein vasokonstriktorisches wirkendes Peptidhormon. Es spielt eine entscheidende Rolle im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS). Die Wirkung von Ang II umfasst unterschiedliche Zielgewebe. Dazu gehören v.a. die Nieren, Gefäße, glatte Gefäßmuskelzellen, Hypophyse und das Myokard [59].

Angiotensinogen aus der Leber wird mit Hilfe von Renin aus den Juxtaglomerulären Zellen der Niere in Angiotensin I umgewandelt. Durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) aus der Lunge wird ein Dipeptid von Angiotensin I abgespalten, sodass daraus das Oktapeptid Ang II entsteht [59, 60].

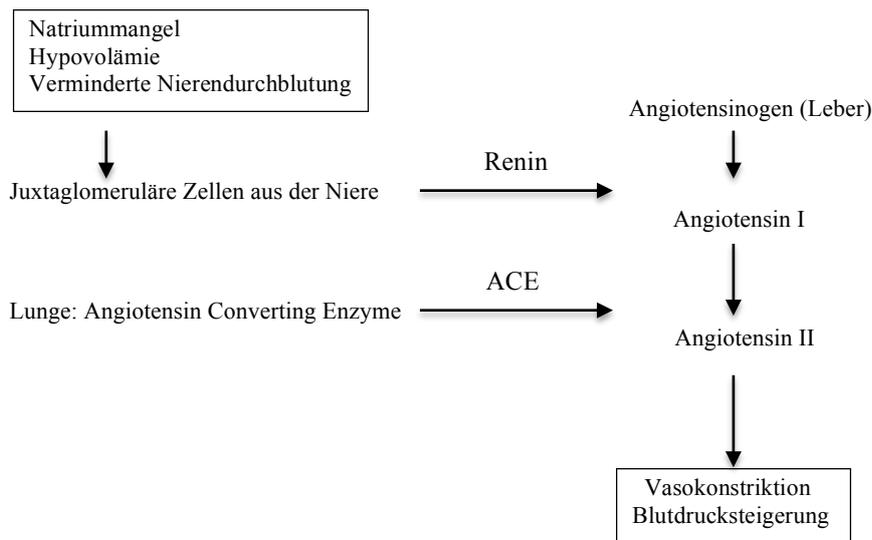


Abbildung 2: **Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)** [nach Pulm Circ 2014].

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System stellt eine wichtige Rolle bei der Blutdruckregulation dar. Ang II wirkt über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor als Vasokonstriktor blutdrucksteigernd [60]. Bei Hypovolämie oder Natriummangel wird das RAAS durch Renin-Ausschüttung gestartet [60]. Ang II ist ebenfalls als Mediator von Gefäßentzündungen und

Remodeling bekannt [16]. Eine chronische AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Stimulation durch Ang II führt am Herzen über den mitogenen Signalweg zu einer Herzmuskelhypertrophie [61, 62]. Über AT<sub>2</sub>-Rezeptoren wirkt Ang II im Rahmen eines negativen Cross-Talks antiproliferativ [63, 64].

Ang II aktiviert über NF-κB in VSMCs unter anderem die Transkription von Tissue Faktor und initiiert damit die prokoagulative Rolle des Tissue Faktors [6, 65, 66]. Neben NF-κB aktiviert Ang II andere Transkriptionsfaktoren wie *activator protein* (AP-1), der in Zellproliferation und Apoptose involviert ist [67]. Bei Patienten mit SSc ist das RAS überaktiviert. Patienten mit SSc weisen erhöhte Spiegel an Ang II und Renin auf [68, 69]. Im Serum von Patienten mit dcSSc wurden höhere Ang II Spiegel gemessen als bei Patienten mit lcSSc [68].

### 1.5.2 Endothelin-System

Die drei Endotheline, ET-1, ET-2 und ET-3, und ihre beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R, werden auch als Endothelinachse bezeichnet. Endothelin-1 (ET-1) zeichnet sich durch eine besonders potente Wirkung im Herz-Kreislauf-System aus. Es wirkt über den ET<sub>A</sub>R vasokonstriktorisch und führt zu einer verstärkten Zellproliferation [70].

Die vasokonstriktorische und damit blutdrucksteigernde Wirkung von Endothelin ist einhundertmal mal so hoch wie die des Noradrenalins. Vorrangig wird ET-1 in Endothelzellen gebildet, *in vitro* aber auch in glatten Muskelzellen [71,72]. ET-2 wird in den Epithelzellen der Niere, in Endothelzellen und Kardiomyozyten gebildet. ET-3 findet sich im Gastrointestinaltrakt und im ZNS [73].

In einer Studie von Rossi et al. konnten *in vitro* an glatten Muskelzellen von Patienten mit arterieller Hypertonie erhöhte ET-1 Konzentrationen in mRNA und Proteinen gemessen werden [74]. Bei der SSc ist die Lungenbeteiligung die häufigste Todesursache. Die Patienten entwickeln eine Lungenfibrose, die im späteren Verlauf in eine PAH münden kann [41]. Rubens et al. konnte zeigen, dass bei Patienten mit PAH erhöhte ET-1 Spiegel nachweisbar waren [75]. Bei Patienten mit SSc finden sich erhöhte ET-1 Spiegel bei Hautfibrosierung, PAH und renaler Krise [76, 77, 78, 79, 80]. Die Arbeitsgruppe um Collados et al. stellte eine mögliche Assoziation erhöhter Spiegel von ET-1 und Tissue Faktor mit der PAH dar [81].

## 1.6 Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper vermittelte Vaskulopathien in der systemischen Sklerose

Vaskulopathien sind primär nicht entzündliche Gefäßerkrankungen, die einen partiellen oder

kompletten Verschluss eines Gefäßes aufweisen [82]. Autoantikörper können häufig bei Vaskulopathien eine Rolle spielen. In über 90% sind Antinukleäre Antikörper (ANA) bei den Patienten mit SSc nachweisbar [83]. Topoisomerase I Antikörper (Anti-SCL-70) sind für die diffuse Form typisch und in nicht wenigen Fällen mit einer interstitiellen Lungenerkrankung assoziiert [84]. Zentromer-Antikörper sind bei der limitierten Form und dem CREST-Syndrom in 30-90 % nachweisbar [84].

Erhöhte Titer von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern wurden im Blut von Patienten mit diffuser und limitierter SSc gemessen [4]. Eine Involvierung und Relevanz von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern bei der SSc wurde von Riemekasten et al. dargestellt [4]. Patienten mit einem hohen Titer dieser Antikörper haben ein höheres Risiko für die Entwicklung von Komplikationen und damit höheren Wahrscheinlichkeit, zu versterben [4]. Wallukat et al. publizierte 1999, dass Patientinnen mit einer Präeklampsie, im Vergleich zu gesunden Probandinnen, Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper aufwiesen [5]. In einem neonatalen Rattenkardiomyozyten-Modell führte lediglich das isolierte IgG aus dem Serum von Präeklampsie-Patientinnen zu einer Steigerung der Kontraktionsfrequenz [5]. Ang II wirkt über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, den AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R [61]. An den Nieren finden sich mehr als 90 Prozent aller Rezeptoren vom AT<sub>1</sub>-Typ [61]. Dragun et al. konnte einen Zusammenhang zwischen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern der Subklasse IgG 1 und 3 und einer akuten, therapierefraktären, vaskulären Nierentransplantatabstoßung, verbunden mit arterieller Hypertonie, zeigen [6]. Kill et al. beschrieb, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper bei der SSc *in vitro* und *in vivo* einen profibrotischen und proinflammatorischen Effekt aufweisen [85]. Hiemann et al. stellte einen Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern, Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern und Vaskulopathien bei Patienten nach Herztransplantation dar [7]. LaMarca et al. publizierte 2009, dass bei der schwangerschaftsbedingten Hypertension ein Zusammenhang zwischen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und Endothelin-1 besteht [86]. Endothelin wirkt über die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren ET<sub>A</sub> und ET<sub>B</sub>. Die Stimulation von ET<sub>A</sub>R führt zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskulatur, während ET<sub>B</sub>R vor allem auf dem Gefäßendothel lokalisiert sind und zur Freisetzung von Vasodilatoren wie NO und Prostacyclin führen [73]. Nicht rezeptoraktivierende Autoantikörper findet man beispielsweise bei dem zu den Kollagenosen gehörendem systemischen Lupus erythematoses. Hier bewirken Antiphospholipid-Antikörper am Gefäßendothel unter anderem eine Hemmung des Prostacyclins und steigern

somit das thrombogene Potential [87]. Antonioli et al. zeigte, dass bei 60 Sklerodermie-Patienten unter 5 von 8 Thrombosefällen u.a. Cardiolipin-Antikörper nachgewiesen werden konnten [88].

### **1.7 Therapieformen der systemischen Sklerose**

Die Behandlung der SSc fokussiert sich auf die Vielzahl der betroffenen Organsysteme wie Lunge, Niere, Gastrointestinaltrakt und Herz. Pharmakologisch wird die Unterdrückung der Autoimmunität durch Immunsuppressiva und die Verringerung der Folgen der Vaskulopathie durch Rezeptorblockaden des Endothelin- und Renin-Angiotensin-Systems verfolgt. Ein Beispiel für einen unselektiven  $ET_A/ET_B$ -Rezeptorblocker stellt Bosentan dar, der nach der Empfehlung von EUSTAR Anwendung bei der PAH findet [89, 90]. Die Behandlung der renalen Krise erfolgt mit ACE Inhibitoren [90]. Gemäß EULAR sind bei der SSc Calciumkanalblocker die First-line-Therapie für das Raynaud Phänomen und intravenöse Prostanoiden für aktive digitale Ulcera [90].

## 1.8 Fragestellung

Die systemische Sklerose definiert sich über die Trias Vaskulopathie, Fibrose und Autoimmunität. Bei der systemischen Sklerose spielt die obliterative Vaskulopathie die führende pathophysiologische Rolle. Sie ist gekennzeichnet durch eine Verdickung sowohl der Intima, als auch der Media, Fibrosierung und *in situ* Thrombose, die letztendlich zum Gefäßverschluss führt. Vorausgehend ist hier eine endotheliale Schädigung, die auf einem Ungleichgewicht von vasoaktiven und vasokonstriktiven Faktoren, zugunsten der vasokonstriktiven Faktoren, beruht.

Bei diesen Mikrothrombosen, die als ein häufiges pathomorphologisches Korrelat der Gefäßveränderungen bei Patienten mit systemischer Sklerose zu werten sind, kommt es zu einem Koagulationsstimulus und einer Aktivierung des Gerinnungssystems. Der Tissue Faktor ist dabei massgeblich involviert. Parallel kommt es bei den Patienten mit systemischer Sklerose zu einer Überaktivierung des Renin-Angiotensin-Systems.

Bei einem großen Teil der Patienten mit systemischer Sklerose können Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG) nachgewiesen werden. Sie wirken agonistisch an den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R, führen zu einer zusätzlichen Verstärkung der Pathologie der systemischen Sklerose und sind mit einem höheren Mortalitätsrisiko bei dieser Erkrankung verbunden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der transkriptionellen Regulation des Tissue Faktors durch Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG sowie den natürlichen Liganden Angiotensin II und Endothelin-1.

Die folgenden Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Definition der Verbindung und Interaktion zwischen den natürlichen Liganden Angiotensin II und Endothelin-1 und AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG
2. Rezeptorspezifität der Interaktion zwischen Tissue Faktor und AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG
3. Definition und Charakterisierung des an der Regulation des Tissue Faktors beteiligten Transkriptionsfaktors
4. Zelltypspezifität der transkriptionellen Regulation

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Zellkultur- und Verbrauchsmaterial

|  |                       |
|--|-----------------------|
| Deckgläser                             | Roth                  |
| Dialyseschläuche                       | Roth                  |
| Falcons 15 ml                          | BD Falcon             |
| Falcons 50 ml                          | BD Falcon             |
| Insulinspritze                         | Becton Dickinson S.A. |
| Kryotubes                              | Roth                  |
| Neubauer-Zählkammer                    | Optic Labor           |
| Parafilm                               | Pechiney              |
| Pasteurpipetten                        | Brand                 |
| Petrischalen                           | Roth                  |
| Pinzette                               | Roth                  |
| Pipettenspitzen 0.5-10 µl              | Sarstedt              |
| Pipettenspitzen 10-200 µl              | Sarstedt              |
| Pipettenspitzen 200-1000 µl            | Sarstedt              |
| Protein G Sepharose 4 fast flow Säule  | GE Healthcare         |
| Röhrchen mit Deckel, steril            | Sarstedt              |
| Safe Lock Tubes 0,5 ml                 | Eppendorf             |
| Safe Lock Tubes 1,5 ml                 | Eppendorf             |
| Safe Lock Tubes 2 ml                   | Eppendorf             |
| serologische Pipetten, steril 5 ml     | BD Falcon             |
| serologische Pipetten, steril 10 ml    | BD Falcon             |
| serologische Pipetten, steril 25 ml    | BD Falcon             |
| serologische Pipetten, steril 50 ml    | BD Falcon             |
| Sterilfilter 0,2 µm                    | Roth                  |
| Sterilfilter 0,45 µm                   | Roth                  |
| Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>  | Sarstedt              |
| Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup> | Sarstedt              |
| Zellkulturplatten 6 Loch               | TPP/BD Falcon         |
| Zellkulturplatten 12 Loch              | TPP/BD Falcon         |

|                         |               |
|-------------------------|---------------|
| Zellkulturschalen 6 cm  | TPP/BD Falcon |
| Zellkulturschalen 10 cm | TPP/BD Falcon |
| Zellkulturschalen 15 cm | TPP/BD Falcon |
| Zellschaber             | Sarstedt      |
| Zellzähler              | Roth          |

### 2.1.2 Stimulanzen

#### *Agonisten*

|                              |               |
|------------------------------|---------------|
| Humanes Angiotensin II       | Sigma-Aldrich |
| Humanes Endothelin-1         | Sigma-Aldrich |
| <i>Humanes IgG (Kon-IgG)</i> | Sigma-Aldrich |

Humanes Immunglobulin G wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen. Es enthält die IgG Subklassen in den Anteilen IgG<sub>1</sub> 66%, IgG<sub>2</sub> 23%, IgG<sub>3</sub> 7% und IgG<sub>4</sub> 4%. Es wurde bei -80°C gelagert und diente als Negativkontrolle.

#### *Humanes IgG (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R- IgG)*

Die Patienten mit systemischer Sklerose wurden in der Rheumatologie und Immunologie der Charité sowie der Abteilung für Nephrologie und internistische Intensivmedizin der Charité Campus Virchow Klinikum akquiriert. Alle Patientenserum, die verwendet wurden, wiesen positive Antikörperkonzentrationen (Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper, Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper) von 20-25 Units auf. Durch die Firma CellTrend GmbH (Luckenwalde) konnte eine genaue Titerbestimmung mittels eines validierten ELISA Tests erfolgen. Die Proben für die Experimente dieser Arbeit wurden bei -80°C gelagert. Eine Zustimmung der Patienten für die Nutzung der Blutbestandteile für die Forschung lag vor.

#### *Rezeptorblocker*

|            |                      |
|------------|----------------------|
| Valsartan  | Novartis             |
| Sitaxentan | Encysive Pharma Inc. |
| BQ 788     | Alexis Biochemicals  |
| PD 123,319 | Sigma-Aldrich        |

### 2.1.3 Chemikalien

|         |       |
|---------|-------|
| Agar    | BD    |
| Agarose | Serva |

|   |                |
|---|----------------|
| BICIN   | Roth           |
| Bis-Tris  | AppliChem      |
| Borsäure  | Roth           |
| BSA   | Serva          |
| Chloroform  | Merck          |
| Diethylpyrocarbonat (DEPC)                                | Sigma          |
| DMEM 4.5 g/l  | PAA            |
| Dithiothreitol (DTT)                                      | AppliChem      |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)                       | Roth           |
| EGF   | Sigma-Aldrich  |
| Endothel Basal Medium (EBM)                               | PAA            |
| Ethanol (absolut)   | Roth           |
| Ethidiumbromid  | Sigma          |
| Fetales Kälberserum                                       | PAA            |
| Gel Red   | Roth           |
| Gelatine  | AppliChem      |
| Glycerin  | Roth           |
| Glycin  | Serva          |
| Hydrocortison   | Sigma-Aldrich  |
| Incidin   | Roth           |
| Isoamylalkohol  | Merck          |
| Isopropanol   | Merck          |
| Kaliumchlorid   | Merck          |
| L-Glutamin  | Biochrom AG    |
| Magermilchpulver  | AppliChem      |
| Methanol  | Merck          |
| Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)                        | AppliChem      |
| Natriumchlorid  | Merck          |
| PBS, steril (ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup> ) | PAA            |
| Penicillin/Streptomycin 100x                              | Biochrom AG    |
| Pepton  | MP Biomedicals |
| Phenol  | Roth           |
| Polyethylenglykol   | Roth           |

|                            |               |
|----------------------------|---------------|
| Proteinmarker              | AppliChem     |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth          |
| Tris                       | Roth          |
| Trizol                     | Invitrogen    |
| Trypanblau                 | Sigma-Aldrich |
| Trypsin/EDTA               | Biochrom AG   |
| Tween 20                   | AppliChem     |
| Urea                       | Sigma         |
| Yeast                      | MP Biomedical |

### 2.1.4 Molekularbiologische Produkte

#### *I. Enzyme, Kits, Standards und Reagenzien*

|                                     |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| Ampli TaqDNA Polymerase             | Applied Biosystems |
| dNTP's                              | Promega            |
| MgCl <sub>2</sub>                   | Applied Biosystems |
| Mulv Reverse Transkriptase          | Applied Biosystems |
| Oligo d(T) <sub>16</sub>            | Applied Biosystems |
| PCR-Buffer 10x                      | Applied Biosystems |
| PCR Mykoplasma Test Kit             | AppliChem          |
| Primer                              | Tib Molbiol        |
| Random Hexamers                     | Applied Biosystems |
| RNase Inhibitor                     | Invitrogen         |
| RNaseZap                            | Sigma              |
| RNA-Isol Reagenz                    | 5Prime             |
| T4 DNA Ligase                       | Promega            |
| TurboFect <sup>TM</sup>             | Invitrogen         |
| MicroAmp Optical 96 well            | Biozym Scientific  |
| Nucleobond Xtra Midi Plus Kit       | Machery-Nagel      |
| PEQGold Gel Extraction Kit          | Qiagen             |
| GeneAmp RNA PCR Core Kit            | Applied Biosystems |
| Power Sybr® Green PCR Master Mix    | Applied Biosystems |
| Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit | Promega            |

## II. Plasmide

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| pGL4.10 [ <i>luc2</i> ] | Promega  |
| pGL4 - 420              |          |
| pGL4 - 666              |          |
| pGL4 - 856              |          |
| Renilla reniformis      |          |
| GFP                     | Clontech |

## III. Restriktionsendonukleasen

|                |                     |
|----------------|---------------------|
| <i>HindIII</i> | New England Biolabs |
| <i>KpnI</i>    | New England Biolabs |
| <i>XhoI</i>    | New England Biolabs |
| <i>SpeI</i>    | New England Biolabs |

## IV. Bakterien

Sämtliche Arbeiten mit Bakterien wurden mit *Escherichia coli* (*E.coli*) entsprechend der Richtlinien für GVO (Genetisch Veränderte Organismen) durchgeführt. Dabei wurde der Stamm *E.coli* DH5 $\alpha$  mit dem Genotyp *fhuA2*  $\Delta$ (*argF-lacZ*)U169 *phoA* *glnV44*  $\phi$ 80  $\Delta$ (*lacZ*)M15 *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17* eingesetzt.

### 2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer

#### Couling-Lösung

0,2 %ige autoklavierte Gelatine

#### Vollmedium für HEK-293

500 ml DMEM, 2 mM Glutamin, 10% FCS, 10 mg/ml Streptomycin, 10 000 Units/ml Penicillin, 1 mM Pyruvat, 10 mM Hepes

#### Minimalmedium für HEK-293

500 ml DMEM, 2 mM Glutamin, 0,5% FCS, 10 mg/ml Streptomycin, 10 000 Units/ml Penicillin, 1 mM Pyruvat, 10 mM Hepes

#### Vollmedium für HMEC-1

500 ml Endothel Basal Medium, 5 % FCS  
10 nM Hydrocortison (100  $\mu$ l vom 50  $\mu$ M Stock)

5 ml Penicillin/Streptomycin (100x Stock Streptomycin: 10 mg/ml, Penicillin: 10.000 Units/ml)  
5 ml L-Glutamin 200 mM (final: 2mM), 10 ng/ml hEGF (200 µl vom 25 µg/ml Stock)

### **Minimalmedium für HMEC-1**

500 ml Endothel Basal Medium, 1 % FCS  
5 ml L-Glutamin 200 mM (final: 2mM)  
5 ml Penicillin/Streptomycin (100x Stock Streptomycin: 10 mg/ml, Penicillin: 10.000 Units/ml)

### **5x Laemmli Puffer**

250 mM Tris-HCl (ph 7,5), 500 mM DTT, 30% Glycerol, 5% SDS , 0,25% Bromphenolblau

### **LB-Medium**

5g/l Yeast (Hefe), 10 g/l Pepton, 10 g/l NaCl, aqua dest, 100 µg/ml Ampicillin

### **LB-Medium mit Agar**

15 g/l Agar, 5 g/l Yeast, 10 g/l Pepton, 10 g/l NaCl, aqua dest, 100 µg/ml Ampicillin

### **1x MOPS Puffer**

50 mM MOPS, 50 mM Tris, 1 mM EDTA ph 8,0, 0.1% SDS  
ph 7,7

### **1 x PBS**

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 9 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ph 7,3

### **1x TBE-Puffer**

89 mM Tris- Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA ph 8,0

### **1x TBS-Puffer**

50mM Tris, 150 mM NaCl  
ph 7,6-8,0

### **1x TBS-T Puffer**

50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20  
ph 7,6-8,0

### **1x Transferpuffer**

25 mM BICIN, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA ph 8,0, 10% Ethanol

### **Puffer für DLRA**

LAR II Reagenz: Luciferase Assay Substrat in 10 ml Luciferase Assay Puffer II lösen  
Stop & Glo Reagenz: 1 Volumen Stop & Glo Substrat auf 50 Volumen Stop & Glo Puffer

### **Puffer für IgG-Isolation**

Elutionspuffer (ph 2,7)

0,1 mol/l Glycin-HCl

Bindungspuffer (ph 7,0)

0,02 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Neutralisationspuffer (ph 9,0)

1 mol/l Tris-HCl

Dialysepuffer (10 fach)

Lösung 1: 8,9 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O in 500 ml H<sub>2</sub>O lösen

Lösung 2: 3,45 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O in 250 ml H<sub>2</sub>O lösen

Lösung 3: Lösung 2 zu Lösung 1, bis ph 7,2 erreicht

Lösung 4: 45,0 g NaCl in 500 ml Lösung 3 auflösen

### **2.1.6 Geräte**

Blotdetektionseinheit

DNA-Elektrophorese

Einkanalpipette 0,5-1000 µl

Eismaschine

Elisa-Reader

Feinwaage

Fluoreszenzmikroskop

Gefrierschrank – 20°C

Syngene Bio Imaging

OWL Separationssystem

Brand

Ziegra

Thermo Scientific

Ohaus

Carl Zeiss

Liebherr

|                           |                        |
|---------------------------|------------------------|
| Gefrierschrank – 80 °C    | Heraeus                |
| Heizblock                 | VWR                    |
| Incubating Orbital Shaker | VWR                    |
| Inkubator                 | Thermo Scientific      |
| Kühlzentrifuge            | Eppendorf              |
| Laborwaage                | Sartorius AG           |
| Luminometer               | BMG Labtech            |
| Magnetrührer              | IKA Werke              |
| Megafuge                  | Thermo Scientific      |
| Mehrkanalpipette          | Brand                  |
| Mikroskop                 | Carl Zeiss AG          |
| Minishaker (Vortexer)     | VWR                    |
| Nanodrop                  | Peqlab Biotechnologie  |
| Peltier Thermal PTC-200   | MJ Research            |
| Perfusor                  | B. Braun               |
| ph Elektrode Ag/AgCl      | VWR                    |
| ph Messgerät              | VWR                    |
| Proteinelektrophorese     | BioRad                 |
| Real Time PCR System      | Applied Biosystem 7500 |
| RNA-Elektrophorese        | VWR                    |
| Rolltmischer              | VWR                    |
| Schütteltisch             | Heidolph               |
| Sterilbank                | Thermo Scientific      |
| Stickstofftank            | AirLiquide             |
| Thermal Cyclor PX2        | Electron Corporation   |
| Thermocycler              | Thermo Scientific      |
| Transferkammer            | BioRad                 |
| Wasserbad                 | Unitherm               |
| Western Blot Medul        | Invitrogen             |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur (HEK-293, HMEC-1)

Die Experimente erfolgten mit zwei Zelllinien: menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) und immortalisierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1).

Die HEK-293 Zellen stammen aus dem Labor von Frau Prof. Dr. med. Duska Dragun, die HMEC-1 Zellen von Frau Prof. Dr. med. Gabriela Riemekasten. Beide Zelllinien exprimieren den nativen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R. Sie stellen keine überexprimierenden Zelllinien dar.

HEK-293 ist eine Zelllinie, die als Transformationsprodukt aus einer menschlichen embryonalen Nierenzelle (Human Embryonic Kidney) mit Teilen des menschlichen Adenovirus 5 hervorging und somit eine künstliche Krebszelle darstellt. Die HEK-293 Zellen sind hypotriploide Epithelzellen, welche adhärent wachsen und sich sowohl durch eine einfache Kultivierung als auch eine effiziente Transfizierung auszeichnen.

HMEC-1 besitzen die morphologischen, phänotypischen und funktionellen Eigenschaften von normalen humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Ursprung ist das menschliche Praeputium. Sie sind mit dem SV40 T Antigen transfiziert und weisen somit die Charakteristika einer immortalisierten und schnellwachsenden Zelllinie auf.

#### 2.2.1.1 Kultivierung HEK-293

Die Kultivierung der HEK-293 Zellen erfolgte auf Zellkulturplatten, -schalen und -flaschen. In einem Inkubator wurde bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> Begasung inkubiert. Das DMEM Vollmedium und Trypsin/EDTA wurden vor Gebrauch bei Raumtemperatur oder im Wasserbad auf 37°C gebracht. Für die Passagierung der Zellen wurde Medium abgesaugt und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA für 4 min bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium bei 1200 min<sup>-1</sup> pelletiert, anschließend in 15 ml frischem Vollmedium resuspendiert und nach vorheriger Zählung ausgesät (x Zellen/ cm<sup>2</sup>).

Stimulationsbedingungen: Stimulation für 2 h mit Angiotensin II (1 µmol/l) und Endothelin-1 (100 nmol/l) unter DMEM Minimalmedium. Stimulation für 2 h mit 1,5 mg/ml AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und 1,5 mg/ml Kontroll-IgG unter DMEM Minimalmedium .

#### 2.2.1.2 Kultivierung HMEC-1

Die Kultivierung der HMEC-1 Zellen erfolgte auf zuvor mit 0,2% Gelatine beschichteten Zellkulturplatten und - flaschen. In einem Inkubator wurde bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das

EBM Vollmedium und Trypsin/EDTA wurde vor Gebrauch auf Raumtemperatur oder im Wasserbad auf 37°C gebracht. Für die Passagierung der Zellen wurde Medium abgesaugt und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA für 4 min bei 37 °C/5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 5 ml Medium bei 1200 min<sup>-1</sup> pelletiert, anschließend in 15 - 20 ml frischem Vollmedium resuspendiert und nach vorheriger Zählung ausgesät (x Zellen/ cm<sup>2</sup>).

Stimulationsbedingungen: Stimulation für 2 h mit Angiotensin II (1 µmol/l) und Endothelin-1 (100 nmol/l) unter EBM Minimalmedium. Stimulation für 2 h mit 1,5 mg/ml AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und 1,5 mg/ml Kontroll-IgG unter EBM Minimalmedium.

### ***2.2.1.3 Kryokonservierung der Zellen***

Um kultivierte Zellen einzufrieren, wurde nach Abnahme von Medium einmal mit PBS gewaschen und für 4 min bei 37°C/5 % CO<sub>2</sub> trypsinisiert. Die Zellen wurden in 8 ml Vollmedium aufgenommen und für 3 min bei 1200 min<sup>-1</sup> zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2,5 ml 10% DMSO resuspendiert, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C aufbewahrt. Beim Auftauen wurden die Zellen schnell in frisches Vollmedium überführt.

### ***2.2.1.4 Mykoplasmentest***

Um die Kontamination der verwendeten Zellen mit Vertretern der Klasse der Mollicutes auszuschließen, wurde nach Anleitung des Herstellers in regelmäßigen Abständen eine PCR mit einem Mykoplasmen-Detektions-Kit von Applichem durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde 48 Stunden auf den Zellen belassen, bevor eine Menge von weniger als einem Milliliter abgenommen, in ein steriles Reagenzgefäß überführt und bei 250 xg kurz zentrifugiert wurde, um eukaryotische Zellen und Zellbestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde anschließend 20 min bei 20 000 xg zentrifugiert, um die möglicherweise vorhandenen Mykoplasmen zu zentrifugieren. Das Pellet wurde in 50 µl Flüssigkeit bei 99 °C für 5 min gekocht, um die Bakterien aufzubrechen und die DNA für die Reaktion zugänglich zu machen. Anschließend wurde entsprechend der Angaben des Herstellers die PCR-Reaktion vorbereitet und durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mittels einer gelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente analysiert. Für kontaminierte Zellen bestand die Möglichkeit einer Behandlung mit Ciprofloxacin oder Primocin. 2 Wochen nach Antibiose wurde die PCR wiederholt. In allen Experimenten wurden nur Zellen verwendet, bei denen die PCR negativ ausfiel.

## 2.2.2 IgG-Isolation

Für die Experimente wurden die Immunglobuline (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG, Ko-IgG) über HiTrap Protein G HP Säulen isoliert. Das Prinzip beruht auf der sogenannten Affinitätschromatographie. Die Säulen bestehen aus 5 ml Sepharose, die mit einem rekombinant hergestellten Protein G gekoppelt ist. Das Protein G besitzt die Eigenschaft, eine hohe Affinität zum F<sub>C</sub>-Teil der IgG-Isotypen 1,2,3,4 zu haben. Die Eluierung der Immunglobuline erfolgte daher bei pH 2,7, da bei geringem pH die Affinität des Protein G zum F<sub>C</sub>-Teil sinkt und somit die Herauslösung der Immunglobuline aus der Säule möglich ist.

### 2.2.2.1 Patientenmaterial

Zur Isolation der Immunglobuline der Klasse G wurde sowohl das Plasma von Patienten mit systemischer Sklerose, als auch das von gesunden Probanden (Kontrollgruppe) verwendet. Aus dem Plasma der Patienten mit systemischer Sklerose wurden mittels eines Solid-phase Assays von der Firma Cell Trend in Luckenwalde (Deutschland) die Titer der Anti-AT<sub>1</sub>R-körper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper gemessen. Das Plasma wurde aufgetaut, für 20 min bei 3000 min<sup>-1</sup> zentrifugiert und anschließend mit einer Filtereinheit von 0,45 µm filtriert. Vor der Isolation wurde das Plasma 1:1 mit Bindungspuffer verdünnt.

### 2.2.2.2 Isolation von IgG aus Plasma

Für die Isolation wurden folgende Puffer verwendet: Bindungspuffer, Elutionspuffer und Neutralisationspuffer. Alle drei Puffer wurden vor Gebrauch steril filtriert. Bis auf den Elutionsschritt wurde die gesamte Isolation in einem Perfusor durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 25 ml Bindungspuffer bei einer Maximalgeschwindigkeit von 99ml/h im Perfusor äquilibriert. Danach wurde die Säule mit 30 ml Plasma:Bindungspuffer beladen. Nach dem ersten Durchlauf erfolgte ein zweiter Durchlauf und anschließend ein Waschschrift mit 50 ml Bindungspuffer. Die nachfolgende Eluierung der Immunglobuline (bezogen auf 15 ml Plasma) wurde manuell und nicht mit dem Perfusor durchgeführt. Mit 15 ml Elutionspuffer (ph 2,7) wurde das IgG aus der Säule eluiert. Dabei erfolgte eine Unterteilung in 3 Fraktionen. Die ersten 3 ml wurden verworfen (kein IgG enthaltend), die nächsten 7 ml aufgehoben und die restlichen 5 ml ebenfalls verworfen. Das Eluat von 7 ml wurde sofort mit 700 µl Neutralisationspuffer versetzt, um die Zersetzung der Immunglobuline zu verhindern. Die

Säule wurde mit 50 ml Bindungspuffer reäquilibriert. Anschließend konnte eine neue Probe isoliert werden oder die Säule wurde mit 10 ml 0,1 %  $\text{NaN}_3$  und mit 15 ml 20% Ethanol gewaschen. Säulen, die stark in Gebrauch waren, wurden mit 5 mol/l Guanidin-Hydrochlorid gewaschen. Die Lagerung der Säulen erfolgte bei 4°C.

### 2.2.2.3 Dialyse

Für die Dialyse wurde der Dialysepuffer 10-fach konzentriert verwendet. Nachdem die Dialyseschläuche im Wasserbad erhitzt wurden, wurden die Schläuche in ein 2 Liter fassendes Becherglas mit DMEM low glucose (ohne P/S und Glutamin) überführt und das Eluat mit den gewonnenen Immunglobulinen in die Schläuche gefüllt. Die Dialyse erfolgte im Kühlraum bei 4 °C und dauerte circa 2 d. In dieser Zeit erfolgte alle 4-5 h ein Mediumwechsel. Nach der Dialyse erfolgte die Messung der IgG-Konzentrationen im Zentrallabor der Charité Berlin (CVK) als auch die Messung der Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und der Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper mittels eines Solid-phase Assays durch die Firma Celltrend in Luckenwalde.

### 2.2.3 Quantitative Real Time-PCR (RTq-PCR)

Die Real Time-PCR ist eine Echtzeit PCR, die auf dem Prinzip der Polymerase –Kettenreaktion (PCR) beruht und zur Nukleinsäurequantifizierung dient. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt und wird während der exponentiellen Phase des PCR-Zyklus erfasst. Proportional mit der Fluoreszenz nimmt die Menge der Target-DNA zu. Für die Real-Time PCR wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Applied Biosystems) verwendet. Entsprechend der Primeretablierung erfolgte der Mastermix-Ansatz. Die Wassermenge wurde dem finalen Mastermix-Volumen von 13 µl angepasst.

Tabelle 1: allgemeiner PCR-Ansatz

| Reagenz          | Menge [µM]         | Volumen [µl]     |
|------------------|--------------------|------------------|
| SYBR Green       |                    | 6,75             |
| sense-Primer     | 1,0/0,5/0,25/0,125 | 2,0/1,0/0,5/0,25 |
| antisense-Primer | 1,0/0,5/0,25/0,125 | 2,0/1,0/0,5/0,25 |
| cDNA             | 10 ng              | 1                |
| a.dest           |                    | ad 13 µl         |

Tabelle 2: allgemeines RTq-PCR Protokoll

| Schritt         | Temperatur [°C] | Zeit [min:sec] | Zyklen |
|-----------------|-----------------|----------------|--------|
| Initialisierung | 50              | 2:00           | x 40   |
| Denaturierung   | 95              | 10:00          |        |
| Annealing       | 60              | 00:15          |        |
| Elongation      | 60              | 1:00           |        |

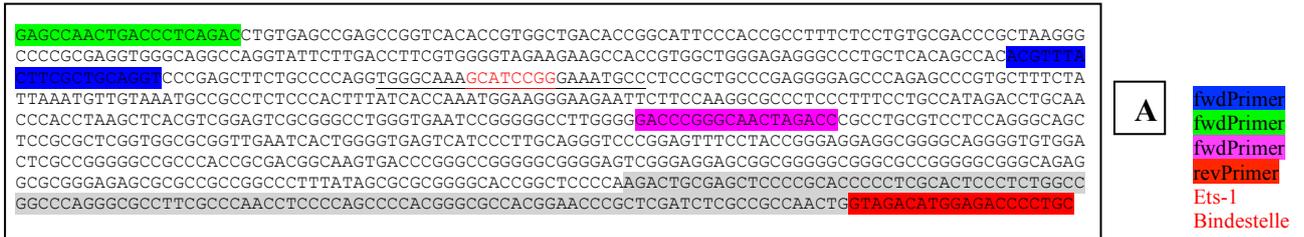
Ausgewertet wurde mittels der  $\Delta C_t$ -Methode, unter Verwendung des  $C_T$ -Wertes (Cycle Threshold), der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Das Housekeeping Gen GAPDH wurde dabei als Referenzwert genommen.

#### 2.2.4 Western Blot

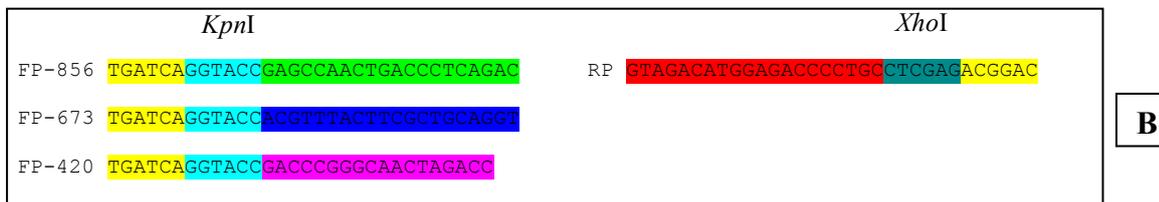
**Proteinbestimmung:** Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach Lowry mit dem  $D_C$  Protein Assay Kit durchgeführt. Als Reaktionsgefäß wurde eine 96-Well Platte verwendet, in die 5  $\mu$ l Lysis Puffer, je 5  $\mu$ l einer Standardreihe aus BSA-Lösung (0,25, 0,5, 1,5, 2,0 mg/ml) und 5  $\mu$ l Probe vorgelegt wurden. Anschließend wurde in jedes Well 25  $\mu$ l Reagenz AS (1 ml Reagenz A und 20  $\mu$ l Reagenz S) und 200  $\mu$ l Reagenz B hinzugegeben. Nach 15 min Schütteln erfolgte die photometrische Auswertung in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 690 nm.

**Western Blot Analyse:** Die Proteine wurden mit 1 x Lämmli-Puffer und 20 mmol/l DTT versetzt und bei 95°C für 5 min gekocht. Pro Gel wurde 5  $\mu$ l eines Protein Markers eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese Gelen (5%iges Sammelgel und 10%iges Trenngel). Die Geltaschen wurden mit 20-30  $\mu$ g Protein beladen. Die Elektrophorese erfolgte mit 150 V für 1,5 h. Das anschließende Blotten erfolgte bei 30 V und wurde durchgeführt, um die Proteine von dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran zu transferieren. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 h in 5%-iger Milchpulverlösung geblockt, um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht. Dem folgend wurde drei Mal für je 5 min mit TBST gewaschen, anschließend mit dem Sekundärantikörper 1 h lang inkubiert und nochmals für 10 min mit TBST gewaschen. Entwickelt wurde auf Röntgenfilmen mit dem Chemilumineszenzverfahren (ECL).

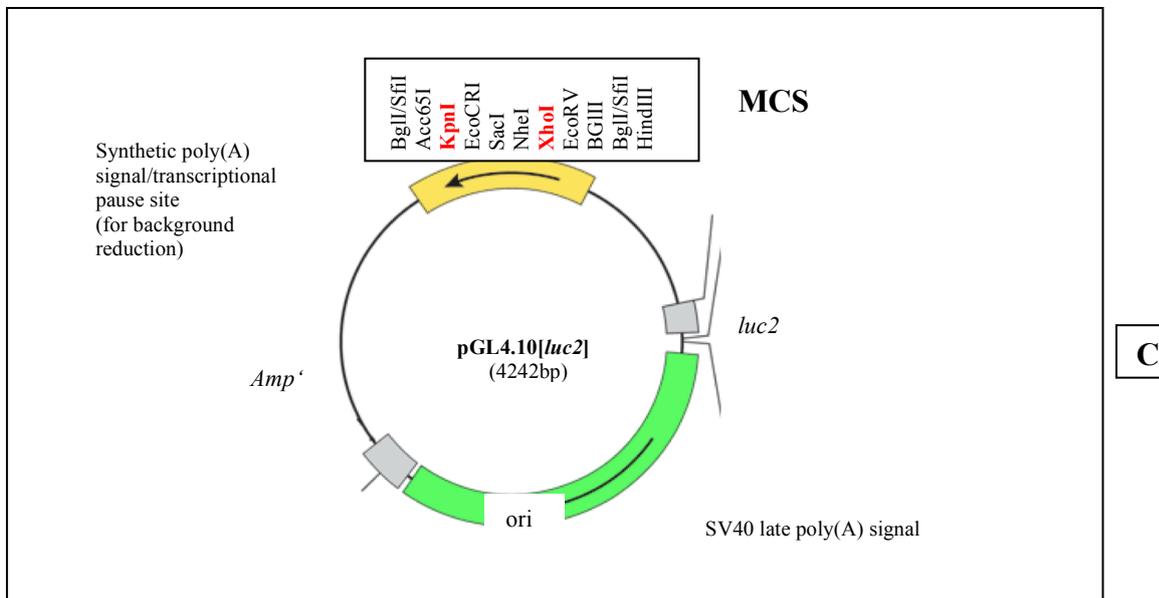
## 2.2.5 Klonierung von Tissue Faktor Promotorfragmenten in den pGL4.10 [*luc2*] Vektor



Amplifikation der Inserts



Ligation der Inserts



Restriktion / Sequenzierung der rekombinanten Plasmide

**Abbildung 3: Klonierungsstrategie: Isolation von genomischer DNA aus HMEC-1 (A). Amplifikation der Inserts mittels PCR (B) und Klonierung der Inserts in den pGL4.10[luc2] Vektor nach enzymatischem Doppelverdau mit KpnI / XhoI (C).**

(A),(B): Aus immortalisierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) wurde genomische DNA isoliert, mittels einer PCR wurden die verschiedenen Tissue Faktor Promotor Fragmente der Größen 856 bp, 673 bp und 420 bp amplifiziert. Die 5'-Deletionskonstrukte des Tissue Faktor-Promotors der Größe 856 bp (full length) und 673 bp enthalten eine relevante Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Ets-1. Das Fragment 420 bp enthält keine Ets-1 Bindestelle im Promotor. In Abbildung A ist die Ets-1 Bindestelle rot markiert, die verschiedenen Bindungsstellen der Primer sind farblich hervorgehoben. Die Primer enthalten Restriktionsschnittstellen: Die forward Primer weisen eine KpnI-Schnittstelle, der reverse Primer eine XhoI Schnittstelle auf (B). Die gelb markierten TGATCA-Sequenzen stellen zusätzliche Nukleotide dar, die von großer Bedeutung für die Effizienz der Restriktionsenzyme sind. Ligation (C): Mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI wurden sowohl die amplifizierten Tissue Faktor Promotor Fragmente als auch der kein Insert enthaltende Leervektor pGL4.1[luc2] geschnitten. Mit Hilfe der DNA-Ligase entstanden rekombinante Plasmide mit unterschiedlichen Fragmenten. Im Vektor pGL4.1 [luc2] ist dem Tissue Faktor Gen ein Firefly Luciferase Gen [luc2] nachgeschaltet. Bei einer Tissue Faktor Aktivierung wird das Luciferase Enzym gebildet und es kommt unter Umwandlung von Luciferin zu Oxyluciferin zu einer Emission von Licht. Je mehr Luciferase Enzym gebildet wird, um so mehr Licht wird emittiert. Das Fragment 420 bp verfügt nicht über eine Ets-1 Bindestelle, sodass es weder zu einer Tissue Faktor Aktivierung noch Licht-Emission kommen kann.

#### ***2.2.5.1 Isolation von genomischer DNA aus HMEC-1 Zellen***

Aus HMEC-1 Zellen wurde genomische DNA isoliert. Ziel-DNA waren die Tissue Faktor Promotor Fragmente der Größen 856 bp, 673 bp und 420 bp, mit denen alle Experimente durchgeführt wurden. Gemäß dem 5Prime Protokoll wurde auf 100 mg abgeschabte Zellen 1ml Isol-RNA Lysis Reagenz gegeben. Danach erfolgte eine komplette Homogenisierung (20-40 s) und eine Inkubation bei Raumtemperatur (5 min). Auf das homogene Lysat wurde anschließend auf 1 ml Lysis-Reagenz 200 µl Chloroform hinzugegeben. Das Gemisch wurde gründlich für 15s gemischt und bei Raumtemperatur 2-3 min inkubiert. Anschließend erfolgte für 15 min mit 12.000 xg bei 4°C die Zentrifugation, bei der 3 Phasen entstanden: die wässrige, obere Phase, die weiße Zwischenphase und die rote, organische Phase.

Die wässrige Phase wurde entfernt und 300 µl 100 % Ethanol zu der Zwischenphase und organischen Phenolphase hinzugegeben. Die Probe wurde vorsichtig durch Inversion gemischt, anschließend für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert und für 2 min mit 2000 xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zu dem DNA-Pellet 1 ml Natriumcitrat hinzugegeben. Die Probe wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend vorsichtig für 5 min durch Inversion gemischt. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 min mit 2000 xg bei 4°C und die Verwerfung des Überstandes. Der Waschschriff wurde zweimal wiederholt. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 75 % Ethanol vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde vorsichtig für 5 min durch Inversion gemischt und für 5 min bei 2000 xg bei 4°C zentrifugiert. Danach konnte der komplette Ethanol-Überstand entfernt und das DNA-Pellet für 5-15 min luftgetrocknet werden. Das getrocknete Pellet wurde in 8 mM NaOH gelöst und für 10 min mit 14.000 xg bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messung der OD (Optische Dichte) verwendet. Die isolierte DNA (500 ng) wurde auf ein 0,5%-iges Agarosegel aufgetragen und bei 100 Volt für 1h elektrophoretisch aufgetrennt.

#### ***2.2.5.2 Messung der DNA-Konzentration über die optische Dichte***

Der Überstand aus der DNA-Isolierung wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Über die optische Dichte (Absorptionswert) wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop Spektralphotometer ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm vermessen. Für die Messung der DNA-Konzentration wurde 1 µl von der Probe verwendet. Die Reinheit der DNA korrelierte mit dem  $A_{260}/A_{280}$  nm Quotienten von  $1,8 \pm 0,2$ .

#### ***2.2.5.3 Amplifizierung der Tissue Faktor Promotor Fragmente 856, 673 und 420 bp (konventionelle PCR)***

Die Amplifizierung der genomischen DNA-Fragmente erfolgte mittels der konventionellen PCR (Polymerase-Kettenreaktion). Der PCR-Prozess, in einem Thermocycler durchgeführt, wird durch eine bestimmte Anzahl von Zyklen definiert, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. Der erste Schritt ist die Denaturierung, bei der die DNA-Doppelstränge der Original-DNA (Template) bei 95°C aufgetrennt werden. Daran schließt sich die Anlagerung der Primer (Annealing) an das Template an. Die Temperatur, die hierbei gewählt wird, ist primerspezifisch. Um die optimale Annealing-Temperatur für die Primer zu ermitteln, wurde eine Gradienten PCR mit 40 Zyklen durchgeführt (Gradient: 50,1°C- 65,2°C). Im dritten Schritt erfolgt die Elongation

(Amplifikation). Die DNA-Polymerase beginnt am 3'-Ende des Primers, folgt dem DNA-Einzelstrang und bildet somit einen komplementären DNA-Strang. Dies führt zur Amplifikation der Einzelstränge.

Die verwendeten forward Primer wiesen eine KpnI-Schnittstelle, der reverse Primer eine XhoI Schnittstelle auf. Als Polymerase wurde die AccuPrime™ Taq DNA Polymerase verwendet, da es sich um GC-reiche Promotor Fragmente handelt.

Tabelle 3: Gradienten-PCR Ansatz mit dem AccuPrime™ Taq DNA Polymerase System

| Reagenz                       | Volumen [µl] |
|-------------------------------|--------------|
| 10X AccuPrime™ PCR Buffer II  | 2,5          |
| Primer Mix (10 µM)            | 0,5          |
| Template DNA (1-200 ng)       | 0,1-20       |
| AccuPrime™ Taq DNA Polymerase | 0,5          |
| ddH <sub>2</sub> O            | ad 25 µl     |

Tabelle 4: allgemeines PCR-Protokoll

| Schritt       | Temperatur [°C] | Zeit [min:sec] | Zyklen |
|---------------|-----------------|----------------|--------|
| Denaturierung | 94              | 2:00           | x 40   |
| Denaturierung | 94              | 00:15-00:30    |        |
| Annealing     | 65              | 00:15-00:30    |        |
| Elongation    | 72              | 1:00           |        |
| Pause/Ende    | 4               | ∞              |        |

Tabelle 5: Primersequenzen

| Gen               | Primer             | 5'-3'-Primersequenzen                        | Annealing-T [°C] | Zyklen | Fragmentgröße (bp) |
|-------------------|--------------------|--|------------------|--------|--------------------|
| AT <sub>1</sub> R | sense<br>antisense | AGTCGGCACCAGGTGTATTT<br>ATCACCACCAAGCTGTTTCC | 60               | 36     | 211                |

|                   |                    |   |    |    |     |
|-------------------|--------------------|---|----|----|-----|
| AT <sub>2</sub> R | sense<br>antisense | TTCCCTCCATGTTCTGACC<br>AAACACACTGCGGAGCTTCT       | 60 | 38 | 191 |
| ET <sub>A</sub> R | sense<br>antisense | GATAGCCAGTCTTGCCCTTG<br>CAGAGGTTGAGGACGGTGAT      | 60 | 34 | 177 |
| ET <sub>B</sub> R | sense<br>antisense | GCGAAACGGTCCCAATATC<br>CCACGGAGGCTTTCTGTATG       | 60 | 38 | 161 |
| Ets-1             | sense<br>antisense | ACCCAGCCTATCCAGAATCC<br>ATGAAGCTGGGCTCTGAGAA      | 60 | 34 | 106 |
| TF                | sense<br>antisense | TGAAGGATGTGAAGCAGACG<br>TTCTCCTGGCCCATACACTC      | 60 | 34 | 94  |
| asHTF             | sense<br>antisense | GGATGTTTTTGGCAAGGACTTAC<br>CAGGATGATGACAAGGATGATG | 60 | 22 | 124 |
| GAPDH             | sense<br>antisense | CATCACCATCTTCCAGGAGCG<br>TGACCTTGCCACAGCCTTG      | 60 | 22 | 443 |
| TF 856            | sense<br>antisense | GAGCCAACTGACCCTCAGAC<br>GTAGACATGGAGACCCCTGC      | 65 | 40 | 868 |
| TF 673            | sense<br>antisense | ACGTTTACTTCGCTGCAGGT<br>GTAGACATGGAGACCCCTGC      | 65 | 40 | 685 |
| TF 420            | sense<br>antisense | GACCCGGAACTAGACC<br>GTAGACATGGAGACCCCTGC          | 65 | 40 | 432 |

#### ***2.2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA auf Agarose-Gelen mit anschließender Fragmentelution***

Um die DNA-Fragmentgröße zu ermitteln, erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA in einem 1%-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid in 1x TBE-Puffer.

Anschließend wurden die Fragmente aus dem Agarosegel nach dem Protokoll von peqGOLD MicroSpin Gel Extraction (PEQLAB) extrahiert: Dafür wurden unter langwelligem UV-Licht die entsprechenden Ethidiumbromid gefärbten DNA-Banden herausgeschnitten. Die Gelstücke wurden gewogen, unter Zugabe von 500 µl GP-Puffer in ein frisches, vorgewogenes 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 60°C unter mehrmaligem Mischen (alle 2-3 min) inkubiert. Nach dem vollständigen Lösen der Agarose wurde, da der GP-Puffer eine rötliche Farbe aufwies, 10 µl einer 2M Na-Acetat Lösung (pH 5,2) unter Mischen hinzugegeben, sodass ein Farbumschlag in gelb erreicht wurde. Nach Hinzufügen von 250 µl GP-Puffer wurden 750 µl der DNA/Agarose/GP-Pufferlösung auf eine PerfectBind MicroSpin-Zentrifugensäule pipettiert.

Die Säule wurde anschließend in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 10.000 xg zentrifugiert und der Säulendurchfluss verworfen. Danach erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit dem CG-Waschpuffer unter Verwerfen des Säulendurchflusses. Anschließend wurde die Säule in dem geleerten 2 ml Reaktionsgefäß für 1 min bei 10.000 xg getrocknet. Die Elution erfolgte in einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß unter Zugabe von 20 µl Elutionspuffer. Nach 2 min Inkubation wurde für 1 min bei 10.000 xg zentrifugiert. Der Elutionsschritt wurde wiederholt. Über die optische Dichte wurde die DNA-Konzentration am NanoDrop-Spektralphotometer ND-1000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bei 260 nm vermessen.

#### ***2.2.5.5 Restriktion der TF Promotorfragmente und des pGL4.1 Vektors mit anschließender Ligation***

Die nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahierten Fragmente mussten in den Zielvektor (pGL4.10 Vektor) eingefügt und ligiert werden. Zunächst wurde eine Restriktion mit Restriktionsenzymen durchgeführt. Diese DNA schneidenden Enzyme erkennen spezifische Sequenzen aus 4-8 Basenpaaren und spalten in dieser Region eine Phosphodiesterbindung. Der pGL4.1 Vektor wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI geschnitten. Die Tissue Faktor Promotorfragmente 856 bp, 673 bp und 420bp (Inserts) wurden mit den gleichen Enzymen KpnI und XhoI geschnitten. Dabei entstanden „blunt ends“. Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 h im Thermocycler inkubiert. Die Überprüfung der Restriktion erfolgte mit einem 1%-igen Agarosegel in 1x TBE-Puffer für 1 h bei 80 V.

Tabelle 6: Restriktionansatz

| Reagenz            | Volumen<br>[µl] |
|--------------------|-----------------|
| ddH <sub>2</sub> O | 9               |
| 10x Puffer 1       | 2               |
| 10x BSA            | 2               |
| KpnI               | 1               |
| XhoI               | 1               |
| DNA(50 ng)         | 5               |

Durch den Verdau konnten die Inserts in den Vektor integriert werden. Die Ligation wurde durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert. Bei der Ligation wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der DNA-Segmente durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verbunden, sodass es zu einer kovalenten Bindung zwischen Vektor-DNA und Insert-DNA kommt. Die Ligation wurde mit der T4- DNA-Ligase (Promega) nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 7:

|                                   |                       |
|-----------------------------------|-----------------------|
| Vektor DNA                        | 100 ng                |
| Insert DNA                        | 17 ng                 |
| Ligase<br>10xPuffer               | 1 $\mu$ l             |
| T4-DNA-<br>Ligase(weiss<br>units) | 0,1-1 u               |
| Nuclease freies<br>Wasser         | 10 $\mu$ l<br>(Final) |

Es erfolgte eine Inkubation bei RT für 3 h und eine Zwischenlagerung auf Eis vor der nachfolgenden Transformation.

### 2.2.5.6 Transformation in den *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$

Die Plasmide wurden in kompetente *E.coli* Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  eingebracht. Die Transformation wurde mittels Elektroporation durchgeführt. Bei der Elektroporation wird die Zellmembran durch einen kurzen elektrischen Impuls permeabilisiert, sodass die Zellen DNA aus der Umgebung aufnehmen können. Zu den elektrokompetenten Bakterien wurden 10  $\mu$ l des entsalzten Ligationsansatzes gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit 25  $\mu$ F, 2,5 kV und 600  $\Omega$ . Unter Zugabe von 1 ml gekühltem LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die transformierten *E.coli* Bakterien bei 37°C für 2 h unter Schütteln inkubiert. Jeweils 100 $\mu$ l und 900 $\mu$ l des Transformationsansatzes wurden auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Bakterien mit dem aufgenommenen Plasmid konnten auf dem mit Ampicillin versetzten LB-Medium mit Agar überleben, da das Plasmid über ein Antibiotikum-Resistenzgen verfügt. Am nächsten Tag wurden mit den auf den Selektionsplatten gewachsenen

einzelnen Kolonien LB-Selektionsmedien angeimpft und über Nacht bei 220 rpm 37°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Isolation der rekombinanten Plasmide mittels Mini-Präparation.

#### **2.2.5.7 Mini-Präparation der Plasmid-DNA**

Die Mini-Präparation der rekombinanten Plasmid-DNA erfolgte mit dem peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II (PEQLAB). Die Übernachtskultur wurde für 5 min bei 10.000 xg zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde mit 250 µl Lösung I/Rnase A durch sorgfältiges Mischen resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 250 µl Lösung II versetzt und 10 mal invertiert, bis ein klares Lysat entstand. Zu dem aufgeklärten Lysat wurde 350 µl Lösung III hinzugefügt und 10 mal invertiert, bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildete. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 xg für 10 min. Ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß wurde mit einer PerfectBind DNA – Säule bestückt und mit dem klaren Überstand befüllt. Nach der Zentrifugation bei 10.000 xg für 1 min wurde der Säulendurchfluss verworfen und der Vorgang wiederholt. Danach wurde die Säule mit 500 µl Plasmid-Puffer gewaschen und bei 10.000 xg für 1 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit 750 µl Wash-Puffer und eine Zentrifugation bei 10.000 xg für 1min. Der Säulendurchfluss wurde jeweils verworfen. Durch eine nachfolgende zweiminütige Zentrifugation bei 10.000 xg wurde die DNA getrocknet. Die Elution erfolgte anschließend mit 80 µl Elution-Puffer. Dafür wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 5.000 xg für 1 min zentrifugiert. Um die Effizienz zu steigern, wurde der Vorgang wiederholt. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde am NanoDrop Spektralphotometer bei 260 nm vermessen.

#### **2.2.5.8 Restriktion**

Nach der Mini-Präparation der Plasmid-DNA erfolgte die Restriktion mit den Restriktionsendonukleasen SpeI und Hind III, um die pGL-856, pGL-673 und pGL-420 bp Konstrukte in Insert und Restvektor zu verdauen. Als Kontrolle wurde bei dem pGL4.1 Vektor original (ohne Insert) ebenfalls eine Restriktion durchgeführt. Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 h im Thermocycler inkubiert. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung in einem 1%-igen TBE-Agarosegel für 1 h bei 80 V.

Tabelle 8: Restriktionansatz

| Reagenz            | Volumen [ $\mu$ l] |
|--------------------|--------------------|
| ddH <sub>2</sub> O | 9                  |
| 10x Puffer 2       | 2                  |
| 10x BSA            | 2                  |
| SpeI               | 1                  |
| Hind III           | 1                  |
| DNA (50 ng)        | 5                  |

### ***2.2.5.9 Verifizierung der Klone durch Sequenzierung***

Durch die Sequenzierung konnte die Nukleotid-Abfolge in den Vektor-Insert-Konstrukten bestimmt werden und erlaubte somit die Verifizierung der Klone. Die Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977), die Auswertung mit dem Programm Chromas. Hierfür wurden 700 ng Plasmid-DNA mit jeweils 20 pmol forward und reverse Primer (1:10 verd.) gemischt und auf ein Finalvolumen von 7  $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O angepasst. Zur Sequenzierung wurden die Proben in 0,2 ml Reaktionsgefäßen zu SEQLAB Göttingen versandt.

### ***2.2.5.10 Midi-Präparation der Plasmid-DNA***

Die Midi-Präparation erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit der Firma Machery-Nagel. Zunächst wurde eine Übernachtskultur angesetzt, indem in 100 ml LB-Medium ohne Agar (mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin) eine einzelne Kolonie einer Agarplatte überführt wurde. Die Kultur wurde auf einem Schüttler bei 37°C und 220 rpm über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4000 xg für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 8 ml Resuspensionspuffer/RNase A resuspendiert. Anschließend wurde 8 ml Lysis Puffer zu der Suspension gegeben. Die Mischung wurde vorsichtig für 5 min invertiert und für 4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zwischenzeitlich wurde eine NucleoBond® Xtra Säule mit NucleoBond® Xtra Filter mit 12 ml Äquilibrierungspuffer äquilibriert. Nach der Lyse wurde die Suspension mit 8 ml Neutralisationspuffer neutralisiert und anschließend 10 – 15 mal invertiert. Danach erfolgte die Beladung der Säule. Dafür wurde die Suspension nochmals 3 mal invertiert und das geklärte Lysat unmittelbar auf den äquilibrierten Filter gegeben. Nach diesem Schritt erfolgte das Waschen der Säule und des Filters mit 5 ml Äquilibrierungspuffer. Der Filter wurde danach

verworfen und die Säule anschließend mit 8 ml Waschpuffer gereinigt. Nun erfolgte die Elution mit 5 ml zuvor bei 50°C erhitztem Elutionspuffer. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumen Isopropanol präzipitiert, gründlich gemischt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Präzipitat wurde langsam durch eine Spritze mit einem NucleoBond® Finalizer gedrückt und der Überstand anschließend verworfen. Das Waschen des Präzipitats erfolgte über den Finalizer mit 2 ml 70%igem Ethanol. Getrocknet wurde, indem mehrmals Luft durch den Finalizer gepresst wurde. Mit 500 µl TRIS Puffer erfolgte langsam die Elution der DNA über den NucleoBond® Finalizer. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend die Konzentration der DNA am Nano Drop bei 260 nm vermessen.

### **2.2.5.11 Herstellung von Glycerinkulturen**

Die Konstrukte wurden in Glycerinkulturen für Midi Präparationen haltbar gemacht. Dafür wurden unter sterilen Bedingungen Kryotubes mit 320 µl 99% Glycerol und 480 µl Bakteriensuspension gut vermischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

## **2.2.6 Transfektion**

### **2.2.6.1 Etablierung der Transfektion mit GFP-Konstrukten**

Die HEK- und HMEC- Zellen wurden mit peGFP (C1-C3, N1-N3)- Vektoren transfiziert, um die geeignete DNA- und TurboFect™ Menge für die Transfektion mit den pGL-Konstrukten zu etablieren. Die HEK-293 Zellen, ausgesät in 12-Well-Platten, und die HMEC-1 Zellen, ausgesät in 6-Well Platten, wurden mit den peGFP-Vektoren transfiziert. Es wurden dabei zwei verschiedene Transfektionsverhältnisse untersucht: die DNA-Mengen 0,25 µg und 0,5 µg mit den jeweiligen TurboFect™ Mengen 0,75 µl und 1 µl. Die Auswertung erfolgte unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskopes.

Tabelle 9: Etablierung der Transfektion für HEK-293 Zellen mit GFP-Konstrukten

|     |                                      |                                      |                                      |
|-----|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 1:1 | 1,0 µl TurboFect<br>0,5µg peGFP-C1   | 1,0 µl TurboFect<br>0,5µg peGFP-C2   | 1,0 µl TurboFect<br>0,5µg peGFP-C3   |
| 1:3 | 0,75 µl TurboFect<br>0,25µg peGFP-C1 | 0,75 µl TurboFect<br>0,25µg peGFP-C2 | 0,75 µl TurboFect<br>0,25µg peGFP-C3 |

### **2.2.6.2 Transfektion der HEK-293 und HMEC-1 Zellen mit den pGL-Konstrukten**

*Transfektion der HEK-293 Zellen:* Die Zellen wurden auf 150.000/  $\mu\text{l}$  pro Well in einer 12 Well Platte ausgesät und 2 d unter DMEM Vollmedium mit einmaligem Mediumwechsel wachsen gelassen. Die Transfektion mit den Konstrukten pGL-856, pGL-673 und pGL-420 erfolgte in der Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}$  unter DMEM Minimalmedium für 3 h. Die TurboFect<sup>TM</sup> Menge betrug jeweils 1  $\mu\text{l}$ . Die Co-Transfektion erfolgte mit Renilla reniformis, einem Kontrollplasmid, welches die Effizienz der Transfektion anzeigt. Eingesetzt wurde es ebenfalls in der Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}$ , 1:10 verdünnt. Über Nacht wurden die Zellen mit Vollmedium versetzt. Am nächsten Tag erfolgte Mediumwechsel und die Zellen wurden unter Minimalmedium mit den jeweiligen Stimulanzen für 2 h inkubiert. Bei Versuchen mit Rezeptorblockern erfolgte eine Inkubation mit den Blockern 1 h vor der Inkubation mit den Stimulanzen.

*Transfektion der HMEC-1-Zellen:* Die Zellen wurden auf 150.000/  $\mu\text{l}$  pro Well in einer 6 Well Platte ausgesät und 2 Tage unter EBM Vollmedium mit einmaligem Mediumwechsel wachsen gelassen. Die Transfektion mit den Konstrukten pGL-856, pGL-673 und pGL-420 erfolgte in der Konzentration von 1,25  $\mu\text{g}$  unter EBM Minimalmedium für 3 h. Die TurboFect<sup>TM</sup> Menge betrug jeweils 2,5  $\mu\text{l}$ . Das Kontroll-Plasmid Renilla reniformis wurde ebenfalls in der Konzentration von 1,25  $\mu\text{g}$ , 1:100 verdünnt, eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen über Nacht mit Vollmedium versetzt. Am nächsten Tag erfolgte Mediumwechsel und die Zellen wurden unter Minimalmedium mit den jeweiligen Stimulanzen für 2 h inkubiert. Bei Versuchen mit Rezeptorblockern erfolgte eine Inkubation mit den Blockern 1 h vor der Inkubation mit den Stimulanzen.

### **2.2.7 Dual-Luciferase Reporter Assay**

Der Dual-Luciferase® Reporter Assay bietet die Möglichkeit, die Aktivität von zwei Enzymen, Firefly Luziferase (*Photinus pyralis*) und Renilla Luziferase (*Renilla reniformis*), nacheinander im selben Ansatz zu messen. Die Firefly Luziferase aus dem Leuchtkäfer (Glühwürmchen) hat eine Molekularmasse von 61 kDa und besteht aus 550 Aminosäuren. Firefly wandelt Luziferin mit Hilfe von  $\text{Mg}^{2+}$ , ATP und Sauerstoff zu Oxyluziferin und AMP um. Bei diesem Vorgang wird Licht emittiert. Chemisch stellt die Reaktion eine oxidative Decarboxylierung dar. Die Renilla Luziferase aus der Seequalle hat eine Molekularmasse von 36 kDa. Renilla wandelt Coelenterazin mit Hilfe von Sauerstoff zu Coelenteramid und Licht um. ATP wird bei dieser

Reaktion nicht benötigt. Die Firefly Luziferase emittiert ein grünelbliches Licht (550-570 nm), die Renilla Luziferase ein bläuliches Licht (480nm). Der pGL4 Vektor, der für die Experimente genutzt wurde, enthält das Firefly Luziferase Gen als Reporter Gen. Das Kontrollplasmid enthält das Renilla Luziferase Gen. Die Lichtemission bei Ablauf der Reaktion ist der Aktivierung des Luziferase Gens proportional.

**Probenvorbereitung:** Zunächst wurden die zu messenden Zellen 1x in PBS gewaschen, abgeschabt und mit 100 µl 1:5 verdünntem Passivem Lysis Puffer versetzt. Sie wurden für 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 5 min in flüssigem Stickstoff gelagert. Weitere 5 min wurden die Proben bei 37°C inkubiert. Beide Schritte wurden wiederholt. Für die Messung wurde der Überstand nach Zentrifugation verwendet

**Messung und Auswertung:** Die Messung erfolgte am Luminometer (FLUOstar Optima von BMG Labtech). Nachdem 20-30 µl des Lysats in das jeweilige Well der 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert wurde, wurde 50 µl LAR II unter Mischen hinzugefügt. Anschließend erfolgte die erste Messung (innerhalb von 2-3 min), bei der die Aktivität der Firefly Luziferase gemessen wurde. Danach wurde 50 µl Stop & Glo Reagenz unter Mischen hinzugefügt und die zweite Messung erfolgte. Hierbei kam es zur Messung der Aktivität der Renilla Luziferase als Referenz. Die ermittelte Relative Luziferase Aktivität ergab sich aus dem Quotienten der Relativen Lichteinheiten (RLU), die für die Firefly Luziferase und die Renilla Luziferase gemessen wurden.

MW und SEM wurden graphisch dargestellt und anhand der Relativen Luziferase Aktivität konnte auf die Tissue Faktor Promotoraktivität geschlossen werden.

### 2.2.8 Statistik

Die Ergebnisdarstellung erfolgte als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM), die statistische Auswertung mittels One way Anova.

Eine statistische Signifikanz ergab sich ab einem Wert von  $p < 0,05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Übersicht der verwendeten Patientenplasmen

|   | Patient 1                            | Patient 2                 | Patient 3          | Patient 4 | Patient 5                    |
|---|--------------------------------------|---------------------------|--------------------|-----------|------------------------------|
| Geschlecht                                | weiblich                             | weiblich                  | weiblich           | weiblich  | weiblich                     |
| Anti-AT <sub>1</sub> R-Antikörper (Units) | 17,82                                | 16,63                     | 17,97              | 28,93     | 21,84                        |
| Anti-ET <sub>A</sub> R-Antikörper (Units) | 19,21                                | 21,51                     | 20,65              | 18,19     | 22,6                         |
| Beginn Raynaud Phänomen                   | Vor 2006                             | 2002                      | 2010               | 2008      | 2001                         |
| Beginn Hautbeteiligung                    | Vor 2006                             | 2003                      | 2010               |           | 2001                         |
| Beginn Organbefall                        | Nieren seit 2009, Ösophagus vor 2009 | Leber und Lunge seit 2003 | Hepatomegalie 2010 |           |                              |
| Lungenfibrose                             | Ja                                   | Nein                      | Ja (basal)         | Nein      | Ja                           |
| Hypertonie                                | Nein                                 | Nein                      | Nein               | Ja        | Ja (RR >300 mmHg systolisch) |

#### 3.2 Charakterisierung der HEK-293 und HMEC-1 Zellen

##### 3.2.1 Angiotensin-und Endothelin Rezeptor Expression in HEK-293 und HMEC-1

Für die Anwendbarkeit der Hypothese, dass das Tissue Faktor Gen durch Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper induziert wird, mußten die HEK-293 und HMEC-1 Zellen genau charakterisiert werden. Dabei war es wichtig zu analysieren, ob die Zellen die entsprechenden Rezeptoren exprimieren. Hierfür wurden sowohl HEK-293 als auch HMEC-1 Zellen auf 6-Well Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 80 % isoliert. Nach der Isolation der RNA erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR.

Sowohl in HEK-293 als auch in HMEC-1 konnte die Expression der AT<sub>1</sub>R, AT<sub>2</sub> R, ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R nachgewiesen werden (vgl. Abb.4).

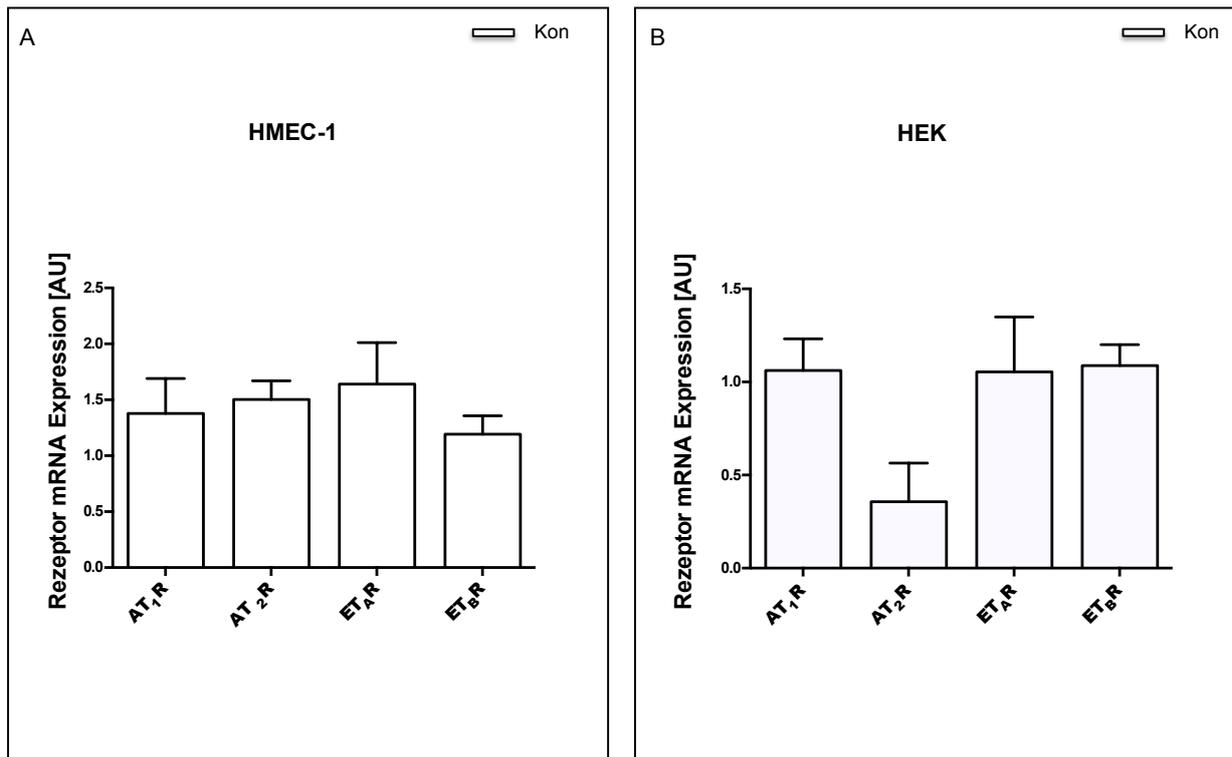


Abbildung 4: **AT<sub>1</sub>R und AT<sub>2</sub>R sowie ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R mRNA-Expression in HMEC-1 (A) und HEK-293 (B).** Die RNA der Zellen wurde mittels Isol-RNA Lysis Reagenz isoliert, 500 ng RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Expression wurde durch Real-Time PCR bestimmt und auf die GAPDH mRNA-Expression normalisiert.

### 3.2.2 TF und asHTF mRNA-Expression in HEK-293 und HMEC-1 Zellen

Die HEK-293 und HMEC-1 Zellen wurden auf Expressierung des Tissue Faktors (TF) und des Alternatively spliced Human Tissue Faktors (asHTF) auf mRNA Ebene untersucht. In einer Zeitreihe wurden die beiden Zelllinien 1 h, 6 h und 12 h mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG (1,5 mg/ml) stimuliert. Nach der Isolation der RNA erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR. Abb. 5 zeigt, dass in beiden Zelllinien, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, eine signifikant erhöhte TF und asHTF mRNA-Expression nach 1 h nach Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG gemessen werden konnte. Nach 6 h und 12 h kam es bei HEK-293 und HMEC-1 zu einer Herabregulierung der TF- und asHTF mRNA- Expression.

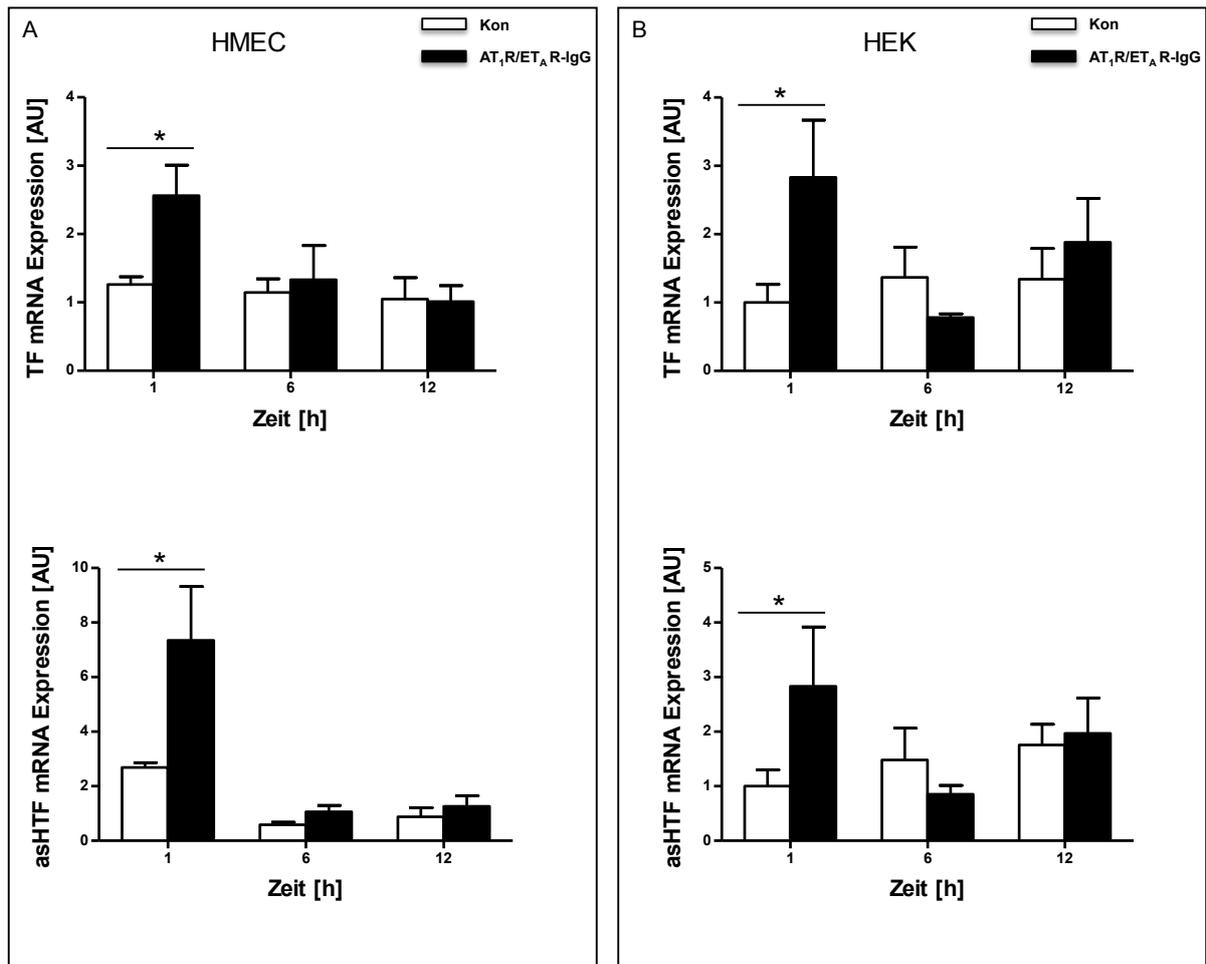


Abbildung 5: **Zeitabhängige TF und asHTF Expression in HMEC-1 (A) und HEK-293 (B) auf mRNA-Ebene.** Die Zellen wurden 1 h, 6 h und 12 h mit 1,5 mg/ml AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG stimuliert. Die RNA wurde mittels Isol-RNA Lysis Reagenz isoliert und 500 ng RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die TF und asHTF mRNA-Expression wurde durch Real-Time PCR bestimmt und auf die GAPDH mRNA-Expression normalisiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova (\*p < 0,05 vs Kontrolle, n=4).

### 3.3 Klonierung der Tissue Faktor Promotorfragmente

#### 3.3.1 Isolation von genomischer DNA aus HMEC-1

Aus HMEC-1 Zellen wurde genomische DNA isoliert. Ziel-DNA waren die Tissue Faktor Promotor Fragmente der Größen 856 bp, 673 bp und 420 bp. Der Tissue Faktor Promotor der Fragmente 856 bp und 673 bp verfügt über eine Bindestelle für den aktivierenden

Transkriptionsfaktor Ets-1. Das Fragment 420 bp enthält keine Ets-1 Bindestelle im Promotor (vgl. Abb.6).

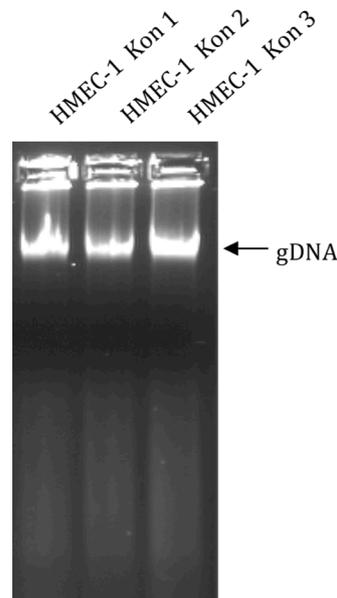


Abbildung 6: **Isolation von genomischer DNA aus HMEC-1.**

Die Isolation der genomischen DNA aus HMEC-1 (Kon 1-3 = drei verschiedene unbehandelte HMEC-1 Schalen) erfolgte mit der 5 Prime-Isol-RNA Lysis Reagent. 500 ng der gereinigten genomischen DNA wurde mit einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (1 h bei 100V).

### 3.3.2 Optimierung der TF Promotorfragment Amplifikation mittels Gradienten PCR

Die Tissue Faktor Promotorfragmente 856 bp, 673 bp und 420 bp wurden mittels einer konventionellen PCR amplifiziert. Für die Optimierung der Amplifikation wurde ein Gradient von 50,1 °C – 65,2 °C gewählt. Die verwendeten forward Primer verfügten über eine KpnI-Restriktionsschnittstelle, der reverse Primer über eine XhoI- Schnittstelle (vgl. Abb.7).

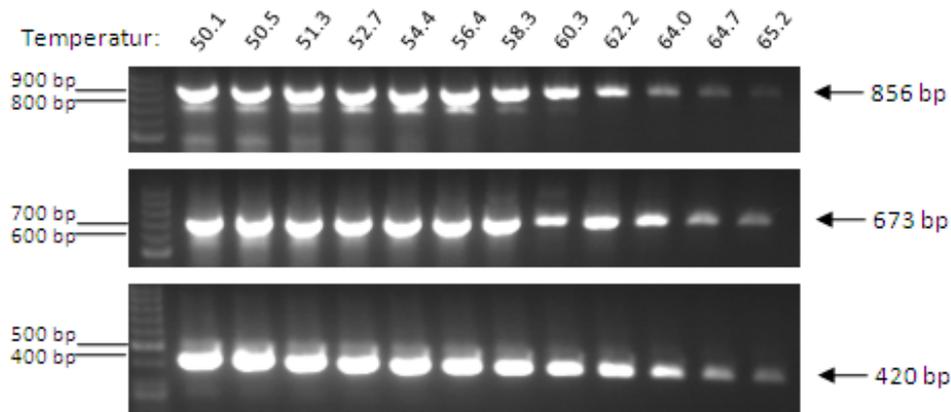


Abbildung 7: **Amplifikation der TF Promotorfragmente mittels Gradienten PCR.**

Für die Amplifikation der TF Promotorfragmente wurden 20 ng genomische DNA aus unbehandelten HMEC-1 eingesetzt. Dabei wurde ein Gradient zwischen 50,1°C und 65,2°C für die Annealing Temperatur gewählt. Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgte mit einem 1%igen Agarosegel (1 h bei 80V).

### 3.3.3 Amplifikation der TF Promotorfragmente für die Ligation

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA auf einem Agarose Gel erfolgte die anschließende Extrahierung der Fragmente. Für die Ligation wurden mit den Restriktionsenzymen KpnI und XhoI sowohl die amplifizierten Tissue Faktor Promotor Fragmente als auch der Leervektor pGL4.1[*luc2*] geschnitten. Die komplementären Enden ("blunt ends") von Vektor - und Insert-DNA wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase miteinander hybridisiert. Damit entstanden rekombinante Plasmide, die für die Transformation von *E.coli* Bakterien des Stammes DH5 $\alpha$  eingesetzt wurden (vgl. Abb.8).

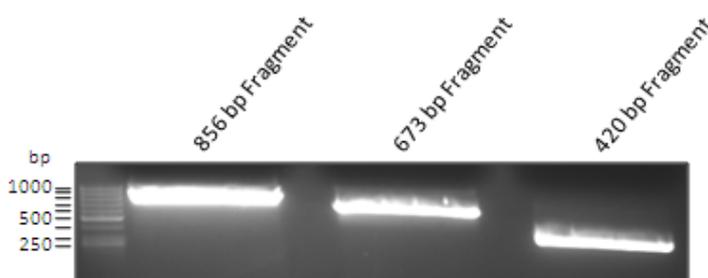


Abbildung 8: **Aufreinigung der TF Promotorfragmente.**

Nach Auftrennung in einem präparativen Gel wurden die XhoI / KpnI geschnittenen Inserts und der geschnittene pGL4.10[luc2] Vektor extrahiert (Ansätze mit dem QIAquick Gel Extraction Kit isoliert). Das aufgereinigte Plasmid pGL4.10[luc2] (4242 bp) wurde mit den verschiedenen Inserts ligiert (856 bp, 673 bp und 420 bp) und für die Transformation von DH5 $\alpha$  Zellen eingesetzt.

### 3.3.4 Restriktionsverdau der rekombinanten Plasmide

Die aus DH5 $\alpha$  E.coli Bakterien isolierten positiven Klone wurden mit den Restriktionsendonukleasen SpeI und HindIII in Insert und Restvektor verdaut. Dies diente zur Überprüfung der rekombinanten Promotor Plasmide. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1%igem Agarosegel. Als Kontrolle wurde der pGL4.1 original Vektor ohne Insert ebenfalls verdaut. Die Amplikons der Insert positiven Plasmide wiesen nach Auftrennung im Agarosegel die erwartete Höhe, bezogen auf den entsprechenden DNA-Ladder (1kb), auf (vgl. Abb.9).

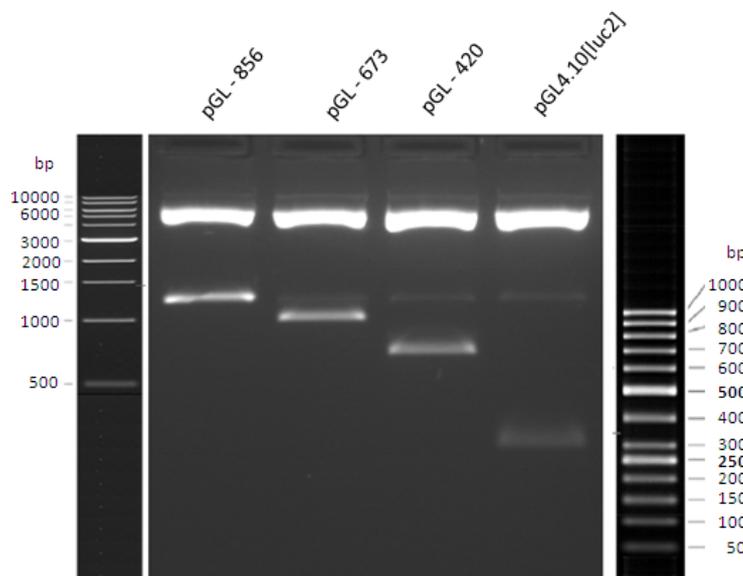


Abbildung 9: **Restriktionsverdau der positiven Klone.**

Die aus positiven DH5 $\alpha$  E. coli Zellen isolierten Plasmide wurden für den Restriktionsverdau eingesetzt. Zum Linearisieren der rekombinanten pGL4.10-Promoter Plasmide (Promega, Mannheim) wurden 100  $\mu$ g Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen SpeI / HindIII verdaut. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1%-igen Agarosegel für 1 h bei

80 V. Das Produkt ohne Insert wurde bei 281 bp erwartet, Amplikons von Insert-positiven Klonen bei 1124bp (pGL-856), 941bp (pGL-673) und bei 688bp (pGL-420).

### 3.3.5 Screening der positiven Plasmide mittels Sequenzierung

Mittels der Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode konnten die Klone verifiziert werden, indem die Nukleotid-Abfolge der rekombinanten Plasmide pGL-856, pGL-673 und pGL-420 bestimmt wurde. Mit der Sequenzierung sollte sicher gestellt werden, dass an der für die Experimente entscheidenden Ets-1 Bindestelle keine Klonierungsfehler vorzufinden waren.

### 3.3.6 Optimierung der Transfektionseffizienz

Die Transfektion der HEK-293 und HMEC-1 Zellen erfolgte zunächst mit peGFP Konstrukten, um die geeignete DNA- und TurboFect™ Menge für die Transfektion mit den pGL Konstrukten zu etablieren. Abb. 10 stellt die Transfektionsoptimierung für die HEK-293 Zellen mittels der Fluoreszenz Mikroskopie dar.

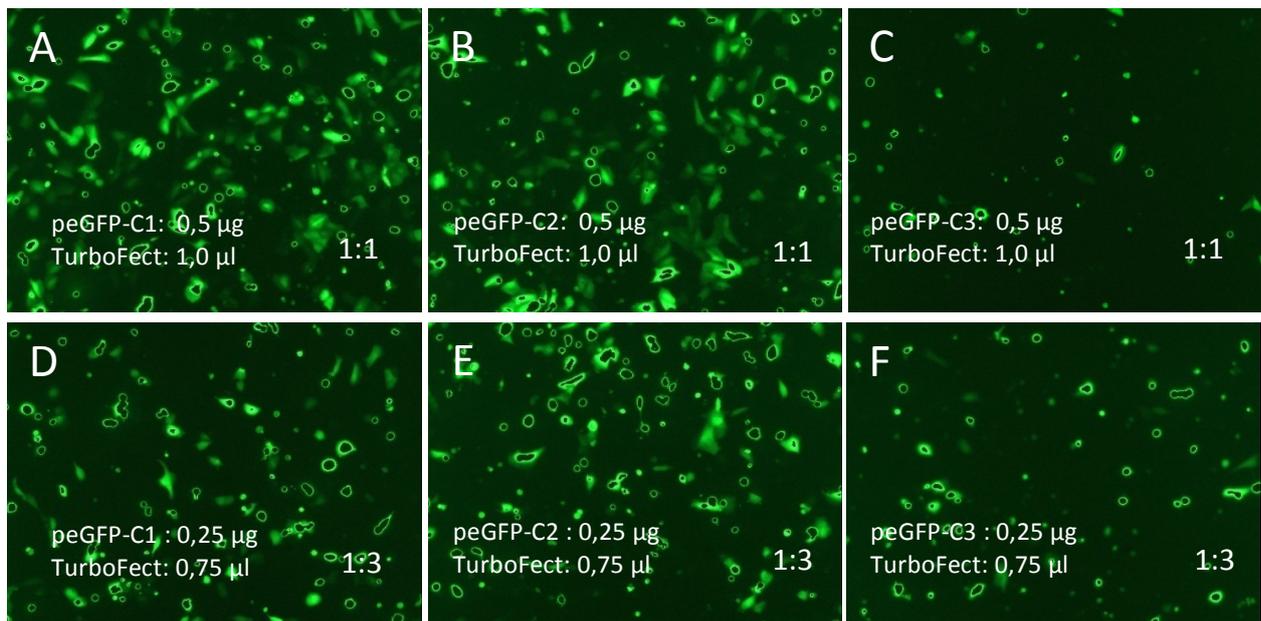


Abbildung 10: **Optimierung der Transfektionseffizienz für HEK-293 Zellen.**

HEK-293 Zellen wurden in einer Dichte von 150.000 Zellen/Well in einer 12-Well ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Transfektion für 24 h mit den angegebenen Kombinationen von peGFP-C1-C3 und TurboFect inkubiert. Aufnahmen erfolgten mittels der Fluoreszenz-Mikroskopie.

### **3.4 Induktion der Tissue Faktor Promotoraktivität bei HEK-293 und HMEC-1**

#### **3.4.1 Aktivierung des TF Promotors durch Ang II und ET-1**

Die HEK-293 und HMEC-1 Zellen wurden sowohl mit dem Leervektor pGL4.10 [*luc2*] als auch mit pGL-420, pGL-673 und pGL-856 für 3 h transfiziert. Nach 16 h wurde unter DMEM Minimalmedium bzw. EBM Minimalmedium für 2 h mit den natürlichen Liganden ET-1 und Ang II stimuliert. Dabei wurde für ET-1 die Konzentration von 100 nmol/l und für Ang II die Konzentration von 1 µmol/l gewählt. Als Kontrolle dienten transfizierte, unbehandelte Zellen (Basal). Die 5'-Deletionskonstrukte pGL-673 und pGL-856 verfügen über eine Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Ets-1, das Konstrukt pGL-420 nicht.

In beiden Zelllinien führten die Liganden Ang II und ET-1, im Vergleich zu der Kontrolle, bei pGL-673 und pGL-856 zu einer signifikanten Aktivierung des Tissue Faktor Promotors. Die Stimulation des Konstrukts pGL-420 und des Leervektors pGL4.10 bewirkte keine Aktivierung des Tissue Faktor Promotors, sodass die RLU hier entsprechend auf Basalniveau liegt.

Die Aktivierung des Tissue Faktor Promotor Gens bewirkt eine Bildung des Firefly Luziferase Enzyms und somit eine grünelbe Lichtemission. Die Relative Luziferase Aktivität (vgl. Abb.11) ist der Aktivität des Tissue Faktor Promotors proportional und ergibt sich aus dem Quotienten der Relativen Lichteinheiten (RLU) für die Firefly Luziferase und den RLUs der Renilla Luziferase.

Da sich die höchste Promotoraktivität nach Stimulation mit den Liganden bei pGL-673 zeigte, wurde dieser für die nachfolgenden Versuche verwendet.

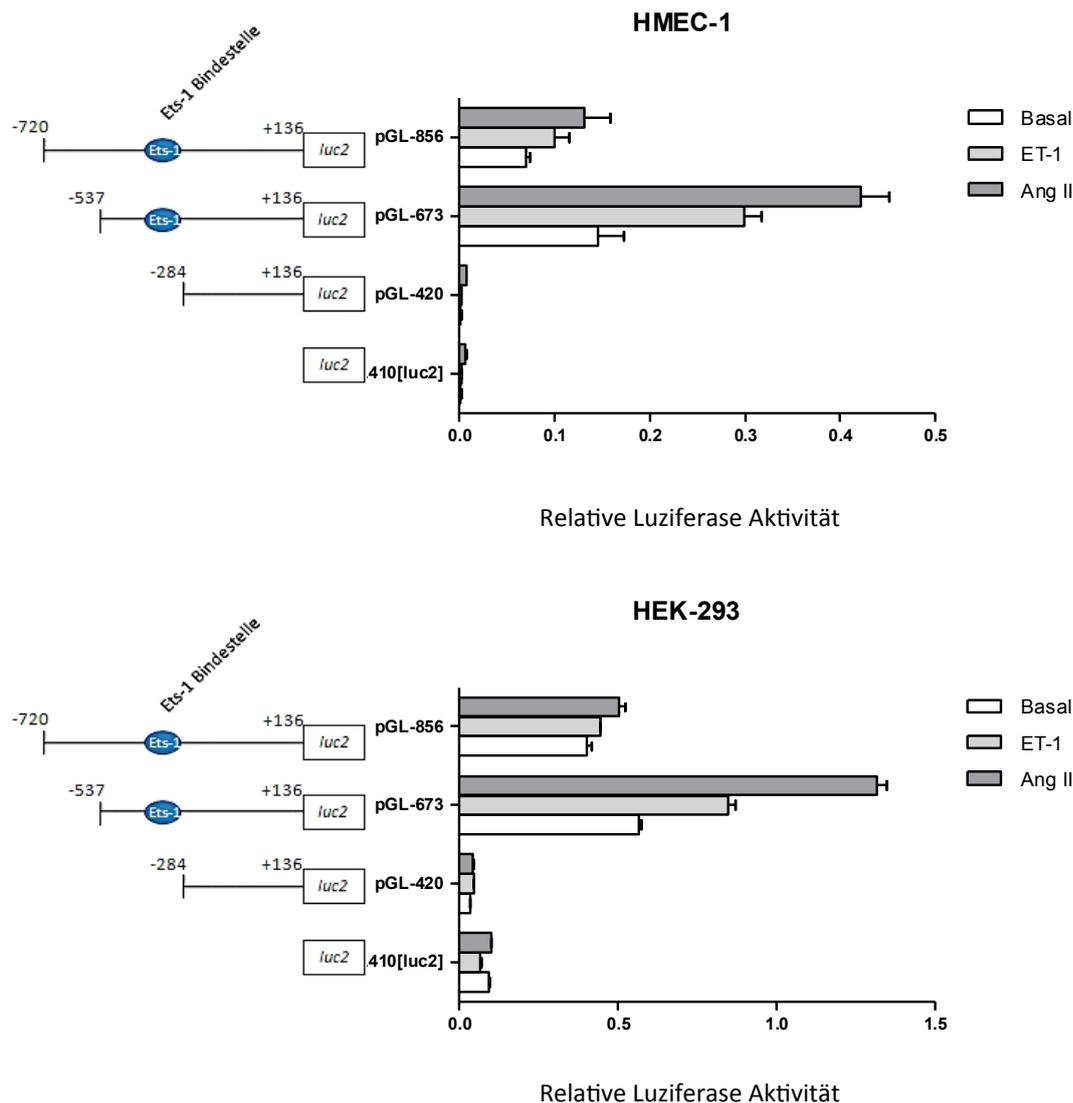


Abbildung 11: **Darstellung der Relativen Luziferase-Aktivität in HMEC-1 und HEK-293 in Abhängigkeit von verschiedenen 5'-Deletionskonstrukten des Tissue Faktor Promotors.**

Die dargestellten Aktivitäten repräsentieren die Induktion der Expression, durch die drei verschiedenen Promotorfragmente im Vergleich zu dem promotorlosen pGL4.10[*luc2*] Vektor und zu den Stimulationen mit ET-1 und Ang II. Die ermittelten Aktivitäten ergeben sich aus dem Quotienten der Relativen Lichteinheiten (RLU), die für die Firefly-Luziferase gemessen wurden und den RLUs der Renilla-Luziferase. Die angegebene Nummerierung der schematisch dargestellten Promotorbereiche entspricht dem 5'-Ende des jeweiligen TF Promotor-Konstrukts in Relation zum Transkriptionsstartpunkt. Das 3'-Ende aller untersuchten Fragmente erstreckte sich jeweils bis zur Position +136 (im Tissue Faktor Gen). Die Position der potentiell aktiven Ets-1 Bindestelle an Position -448 bis -441 ist ebenfalls angegeben. Die dargestellten Werte

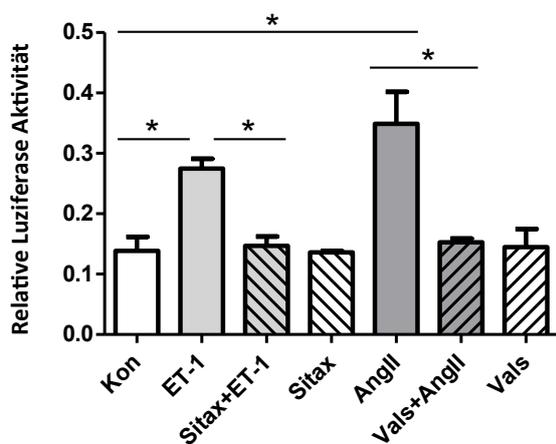
entsprechen den gemessenen Aktivitäten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Stimuliert wurde mit den natürlichen Liganden Ang II (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und ET-1 (100 nmol/l) für 2 h.

Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova (\* $p < 0,05$  vs Kontrolle,  $n=2$ ).

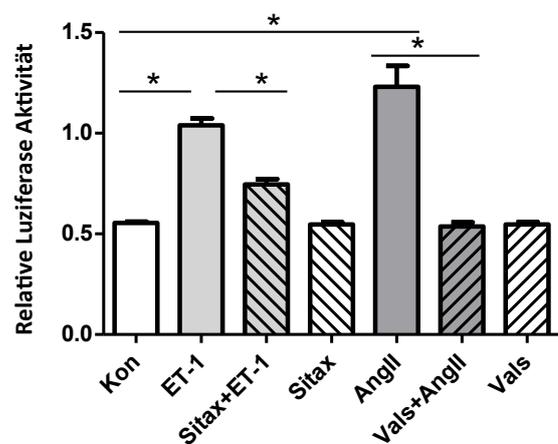
### 3.4.2 Messung der TF Promotor Aktivität des Konstrukts pGL-673 nach Stimulation mit natürlichen Liganden und Inhibierung durch $\text{AT}_1\text{R}$ - und $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ - Blocker

Die HEK-293 und HMEC-1 Zellen wurden im folgendem Experiment mit pGL-673 transfiziert. Die Zellen wurden unterschiedlich behandelt. Bei der Hälfte der Zellen erfolgte die Stimulation für 2 h jeweils mit den natürlichen Liganden Angiotensin II (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und Endothelin-1 (100 nmol/l). Der andere Teil der Zellen wurde für 1 h mit den Blockern Sitaxentan ( $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ -Blocker) und Valsartan ( $\text{AT}_1\text{R}$ -Blocker) präinkubiert. Die Blocker wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Anschließend wurden die mit Blockern präinkubierten Zellen ebenfalls für 2 h jeweils mit Angiotensin II (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und Endothelin-1 (100 nmol/l) stimuliert. Als Kontrolle dienten transfizierte, unbehandelte Zellen. Bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, bewirkten in beiden Zelllinien die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 eine signifikante Tissue Faktor Promotor Aktivierung, die in beiden Zelllinien signifikant durch den  $\text{AT}_1\text{R}$ -Blocker Valsartan sowie  $\text{ET}_\text{A}\text{R}$ -Blocker Sitaxentan auf Kontrollniveau inhibiert werden konnte.

Die Zellen, die lediglich mit den Blockern inkubiert wurden, zeigten keine Tissue Faktor Promotor Aktivität und lagen auf Kontrollniveau (vgl. Abb.12).



A



B

**Abbildung 12: Darstellung der Relativen Luziferase-Aktivität in HMEC-1 (A) und HEK-293 (B) in Abhängigkeit von dem 5'-Deletionskonstrukt pGL-673 des Tissue Faktor Promotors.**

Die dargestellten Aktivitäten repräsentieren die Induktion der Expression, durch das Promotorfragment im Vergleich zu dem promotorlosen pGL4.10[*luc2*] Vektor und zu den Stimulationen mit ET-1 und Ang II. Die ermittelten Aktivitäten ergeben sich aus dem Quotienten der Relativen Lichteinheiten (RLU), die für die Firefly-Luziferase gemessen wurden und den RLU's der Renilla-Luziferase. Die dargestellten Werte entsprechen den gemessenen Aktivitäten aus drei voneinander unabhängigen Experimenten, die jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Stimuliert wurde mit den natürlichen Liganden Ang II (1  $\mu\text{mol/l}$ ) und ET-1 (100  $\text{nmol/l}$ ) für 2 h. Präinkubation für 1 h mit dem selektivem ET<sub>A</sub>R-Blocker Sitaxentan und AT<sub>1</sub>R-Blocker Valsartan in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$ .

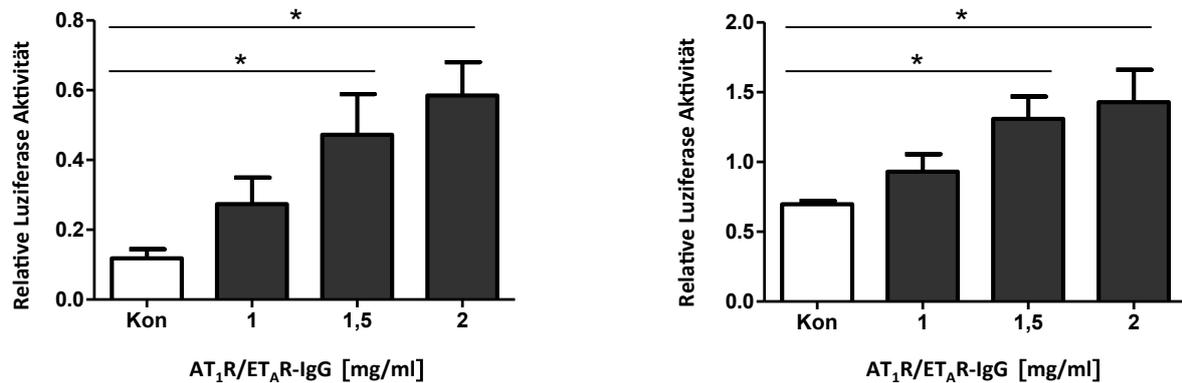
Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova (\* $p < 0,05$  vs Kontrolle,  $n=2$ ).

### **3.4.3 Regulation des Tissue Faktors durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG**

Das Hauptziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper positive IgG's aus dem Blut von Patienten mit systemischer Sklerose zu einer Ets-1 induzierten Tissue Faktor Promotor Aktivierung führen. Hierfür wurden HEK-293 und HMEC-1 Zellen mit dem Konstrukt pGL-673 transfiziert und mit dem AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG der Konzentrationen 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml und 2 mg/ml für 2 h stimuliert. Das AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG führte dosisabhängig zu einer unterschiedlich hohen Promotor Aktivität. Als Kontrolle dienten transfizierte, unbehandelte Zellen.

Die signifikant höchsten Promotor Aktivitäten ergaben sich mit den AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG-Konzentrationen von 1,5 mg/ml und 2,0 mg/ml, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (vgl. Abb.13).

Für alle nachfolgenden Versuche mit HEK-293 und HMEC-1 Zellen wurde daher die Konzentration von 1,5 mg/ml für AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG verwendet.



A

B

Abbildung 13: AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG dosisabhängige TF Promotorregulation in HMEC-1 (A) und HEK-293 (B). Darstellung der Relativen Luziferase-Aktivität in HMEC-1 und HEK-293 in Abhängigkeit von dem 5'-Deletionskonstrukt pGL-673 des Tissue Faktor Promotors.

Stimulation für 2 h mit dem AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG der Konzentrationen 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml und 2 mg/ml.

Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova (\*p < 0,05 vs Kontrolle, n=2).

#### 3.4.4 Messung der AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG induzierten Promotor Aktivität mit und ohne AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>R- Blocker

Die HEK-293 und HMEC-1 Zellen wurden mit dem Konstrukt pGL-673 transfiziert.

Am nachfolgenden Tag erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Präinkubation für 1 h mit den Blockern Sitaxentan und Valsartan. Anschließend wurden die mit Blockern präinkubierten Zellen für 2 h jeweils mit 1,5 mg/ml AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und 1,5 mg/ml Kontroll-IgG stimuliert. Bei dem anderen Teil der Zellen erfolgte lediglich eine Stimulation jeweils mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und Kon-IgG. Als Kontrolle dienten transfizierte, unbehandelte Zellen. In beiden Zelllinien führte AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG zu einer signifikanten Aktivierung des Tissue Faktor Promotors und war signifikant durch Valsartan und Sitaxentan auf Kontrollniveau inhibierbar. Das Kon-IgG aus dem Plasma von gesunden Patienten führte nicht zu einer Aktivierung des Tissue Faktor Promotors (vgl. Abb.14).

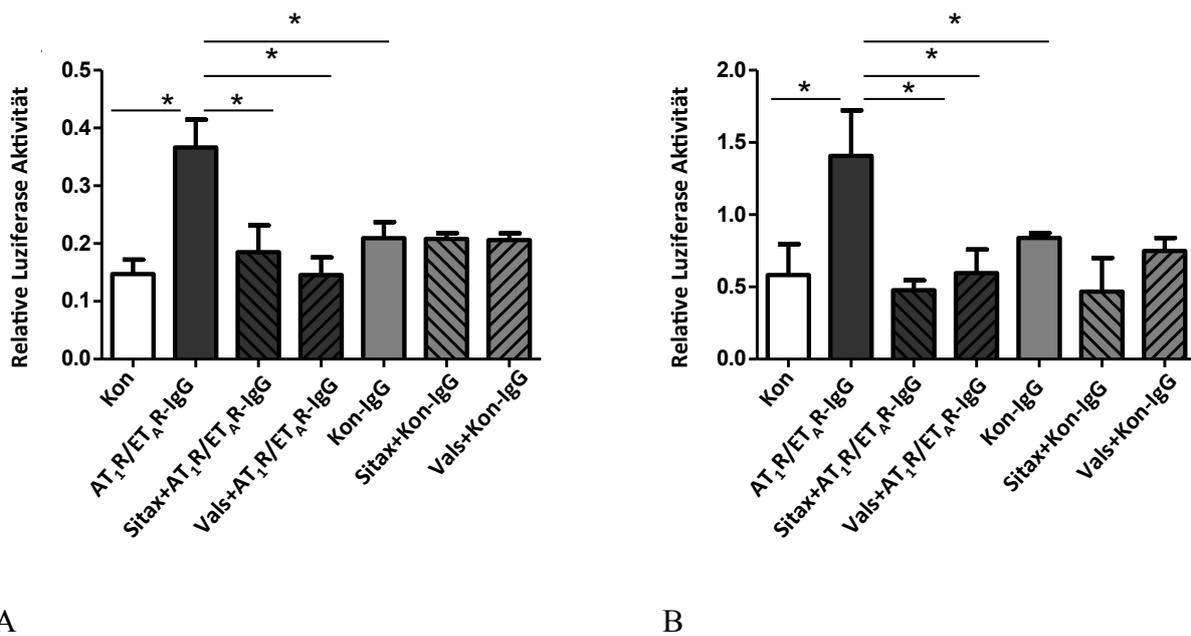


Abbildung 14: **Darstellung der Relativen Luziferase-Aktivität in HMEC-1 (A) und HEK-293 (B) in Abhängigkeit von dem 5'-Deletionskonstrukt pGL-673 des Tissue Faktor Promotors.** Stimulation für 2 h mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG (1,5 mg/ml) und Kon-IgG (1,5 mg/ml). Präinkubation für 1 h mit dem selektivem ET<sub>A</sub>R-Blocker Sitaxentan und AT<sub>1</sub>R-Blocker Valsartan in einer Konzentration von 10 µmol/l.

Die statistische Auswertung erfolgte mit One Way Anova (\*p < 0,05 vs Kontrolle, n=2).

### 3.4.5 Einfluss von AT<sub>2</sub>R-Blockern und ET<sub>B</sub>R-Blockern auf die AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG induzierte TF Promotor Aktivität bei HMEC-1

Die HMEC-1 wurden mit pGL-673 transfiziert. Am nächsten Tag erfolgte bei einem Teil der Zellen eine Präinkubation für 1 h mit dem ET<sub>B</sub>R-Blocker BQ 788 und dem AT<sub>2</sub>R-Blocker PD 123,319. Anschließend wurden die vorgeblockten Zellen für 2 h mit 1,5 mg/ml AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG stimuliert. Bei dem anderen Teil der Zellen erfolgte lediglich eine Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG. Da bei den vorangegangenen Experimenten kein Unterschied zwischen transfizierten, unbehandelten Zellen und mit Kontroll-IgG stimulierten Zellen zu erkennen war, wurden bei dem folgendem Experiment transfizierte, unbehandelte Zellen als Kontrolle verwendet. AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG führte zu einer deutlichen Aktivierung des Tissue Faktor Promotors. Sowohl der ET<sub>B</sub>R Blocker als auch der AT<sub>2</sub>R Blocker hatten im Vergleich zu dem ET<sub>A</sub>R Blocker Sitaxentan und dem AT<sub>1</sub>R Blocker Valsartan keinen signifikant inhibierenden Effekt auf das AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG (vgl. Abb.15).

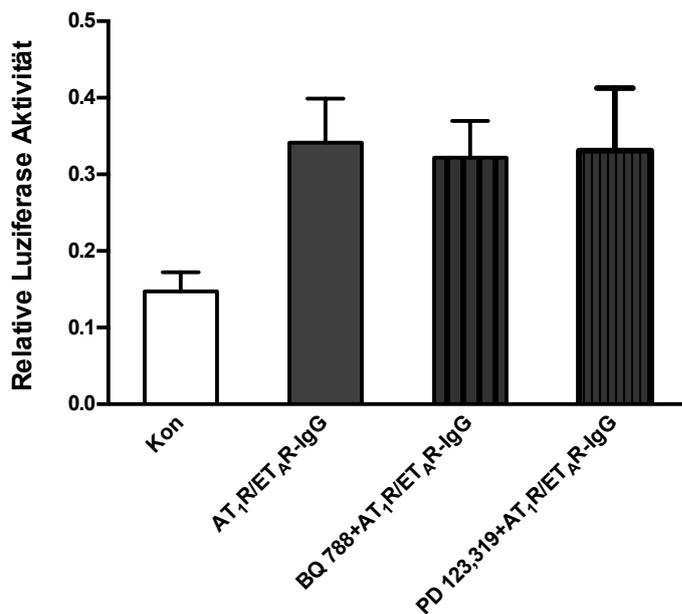


Abbildung 15: **Einfluss von AT<sub>2</sub>R- und ET<sub>B</sub>R Blockern auf die AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG induzierte TF Promotorinduktion in HMEC-1.** Darstellung der Relativen Luziferase-Aktivität in HMEC-1 Zellen in Abhängigkeit von dem 5'-Deletionskonstrukt pGL-673 des Tissue Faktor Promotors. Stimulation für 2 h mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG (1,5 mg/ml). Präinkubation für 1 h mit dem ET<sub>B</sub>R-Blocker BQ 788 und AT<sub>2</sub>R-Blocker PD 123,319 in einer Konzentration von 10 µmol/l. Die Statistische Auswertung erfolgte jeweils mit One Way Anova (\*p < 0,05 vs Kontrolle, n=1).

### 3.5 Ets-1

Durch *in silico* Analysen konnte festgestellt werden, dass innerhalb des TF Promotors eine hochspezifische Bindestelle für Ets-1 vorhanden ist, sodass die höchste Wahrscheinlichkeit für die Bindung eines Transkriptionsfaktors bei Ets-1 gesehen wurde.

#### 3.5.1 Ets-1 Expressierung der HEK-293 und HMEC-1 Zellen

Um die Hypothese einer Ets-1 induzierten Aktivierung des Tissue Faktor Promotor Gens durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG zu überprüfen, wurden HEK-293 Zellen und HMEC-1 Zellen auf eine Expressierung des Transkriptionsfaktors Ets-1 auf mRNA- und Proteinebene untersucht. In einer Zeitreihe wurden die Zellen 1 h, 6 h und 12 h mit 1,5 mg/ml AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG stimuliert. Nach der Isolation der RNA erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels qRT-PCR und die Analyse der Protein-Expression mittels Western Blot. Die signifikant höchste Ets-1

Expressierung, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle, erfolgte nach 1 h. Dies traf sowohl auf beide Zelllinien als auch auf die mRNA – und Proteinebene zu (vgl. Abb.16).

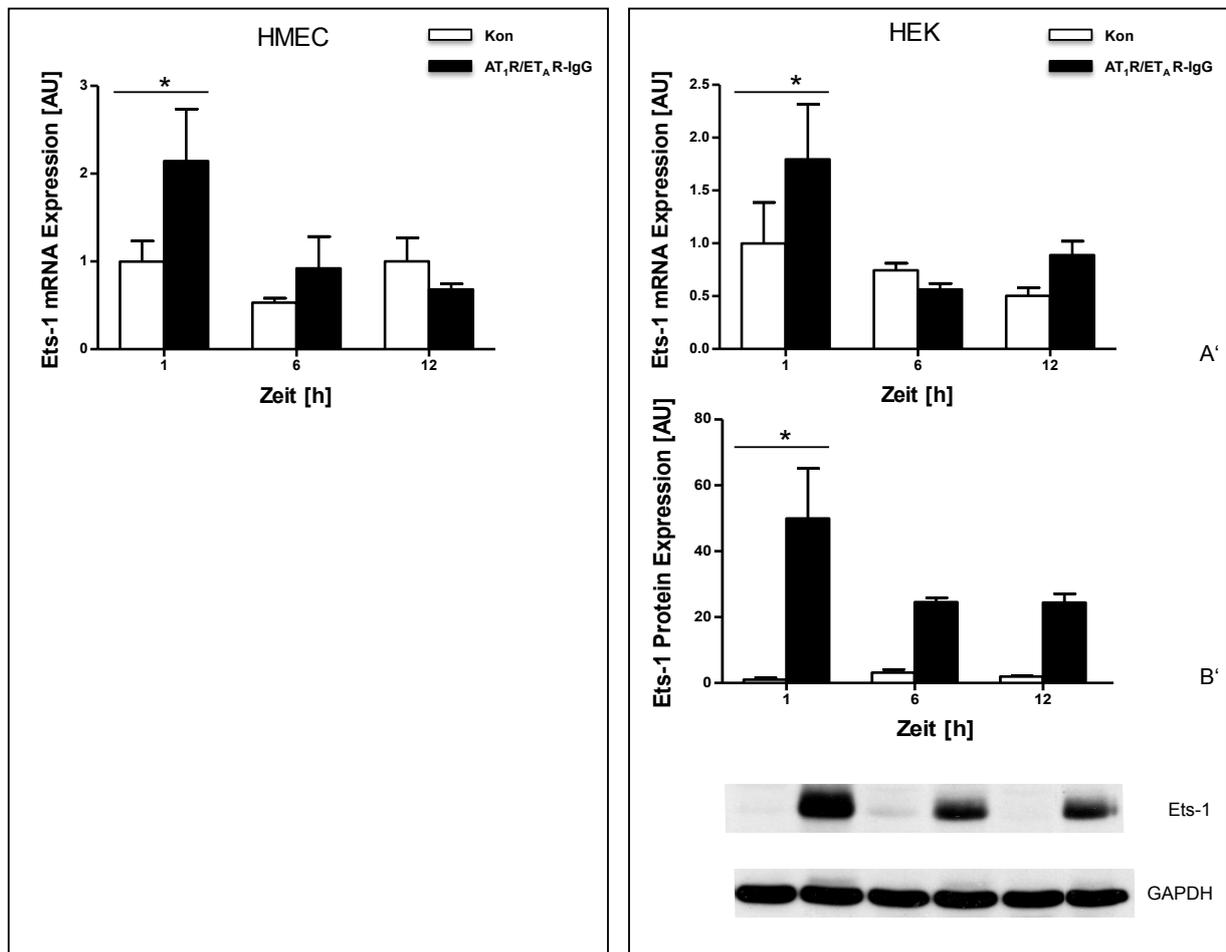


Abbildung 16: **Zeitabhängige Ets-1 Expressierung bei HMEC-1 und HEK-293 Zellen auf mRNA-Ebene (A') und auf Proteinebene (B')**. Die Zellen wurden 1 h, 6 h und 12 h mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG (1,5mg/ml) stimuliert.

A': Die RNA wurde mittels Isol-RNA Lysis Reagenz isoliert, 500 ng RNA mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Ets-1 mRNA-Expression wurde durch Real-Time PCR bestimmt und auf die GAPDH mRNA-Expression normalisiert.

B': Die Ets-1 Protein-Expression wurde mittels einer Western Blot Analyse analysiert und auf die GAPDH Protein Expression normalisiert.

Die Statistische Auswertung erfolgte jeweils mit One Way Anova (\*p < 0,05 vs Kontrolle, n=3).

## 4 Diskussion

Die systemische Sklerose (SSc), auch progressive systemische Sklerose (pSS) genannt, ist eine Autoimmunkrankheit mit heterogenem Erscheinungsbild, die durch die Trias von Autoimmunität, Fibrosierung von Haut und inneren Organen sowie einer obliterierenden Vaskulopathie gekennzeichnet ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Annahme immunologisch bedingter Gefäßveränderungen durch autoimmune Rezeptoraktivierung bei Patienten mit systemischer Sklerose zu bestätigen.

Hierfür wurde der Pathomechanismus der transkriptionellen Regulation des Tissue Faktor Promotors untersucht. Dem Tissue Faktor kommt als Initiator des Gerinnungssystems eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose zu.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit  $AT_1R/ET_A R$ -IgG und den natürlichen Liganden Ang II und ET-1 zu einer Hochregulation des Tissue Faktor Promotors führt und dass die Tissue Faktor Aktivierung transkriptionell reguliert wird.

Die Ergebnisse ließen sich an zwei unterschiedlichen Zellkulturmodellen bestätigen.

### 4.1 Zellkulturmodelle

#### 4.1.1 Rezeptorexprimierung

In der vorliegenden Arbeit wurde an zwei Zelllinien, menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1), untersucht, ob eine transkriptionelle Regulation des Tissue Faktor Promotors durch  $AT_1R/ET_A R$ -IgG und die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 vorliegt. Beide Zelllinien sind immortalisierte Zellkulturen.

Da Endothelzellen an Vaskulopathien maßgeblich beteiligt sind, eignete sich die HMEC-1 Zelllinie im Hinblick auf die Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose besonders für die vorliegenden Experimente [4, 7, 8, 91].

HMEC-1 Zellen wurden für die Experimente dieser Arbeit als valides Modell gewählt, da hierbei die Expression der  $AT_1R$  und  $ET_A R$  im Gegensatz zu einer Primärkultur über mehrere Passagen stabil bleibt. Ein Wachstumsarrest in höheren Passagen als häufiges Problem der immortalisierten Zelllinie konnte in den Experimenten nicht festgestellt werden [92].

Bei dem  $AT_1R/ET_A R$ -IgG handelt es sich um agonistisch wirkende Autoantikörper gegen den

AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R (Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper). Die Rezeptoren stellen G-Protein gekoppelte Rezeptoren dar. Autoantikörper gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind ebenfalls bei Patienten mit ideopathischer dilatativer Kardiomyopathie und bei Patienten mit maligner Hypertonie bekannt [93, 94].

Eine Involvierung dieser Antikörper bei der systemischen Sklerose wurde von Riemekasten et al. dargestellt [4]. Dabei wurden Serum Proben von 478 Patienten auf Antikörper gegen den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R mittels eines Solid Phase Assays getestet. Unter Verwendung dieses Assays konnten in dem AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG hohe Titer gegen den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R nachgewiesen werden. Ebenfalls konnte mittels Immunpräzipitation gezeigt werden, dass AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG mit positiven Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern im ELISA mit dem AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R präzipitiert, wohingegen das IgG von Antikörper-negativen gesunden Kontrollpersonen zu keiner Immunpräzipitation an den untersuchten Rezeptoren führte [4].

Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper sind nicht spezifisch für die systemische Sklerose. Erhöhte Spiegel beider Rezeptoren findet man, im Vergleich zu gesunden Probanden, auch bei anderen Erkrankungen aus dem „rheumatischen Formenkreis“, wie der Rheumatoiden Arthritis oder dem primären Sjögren Syndrom [4].

Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper spielen bei der systemischen Sklerose jedoch eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie und sind mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert [4, 24].

Für die Anwendbarkeit der Hypothese, dass das Tissue Faktor Gen durch Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper induziert wird, wurden in der vorliegenden Arbeit die verwendeten HMEC-1 und HEK-293 Zellen im Vorfeld genau charakterisiert. In initialen Versuchsreihen wurde zunächst untersucht, ob die verwendeten Zelllinien HEK-293 und HMEC-1 den AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R exprimieren. In beiden Zelllinien konnte eine signifikante mRNA-Rezeptorexpression für AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R gemessen werden. Dies wurde ähnlich auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt [85, 95]. Der Fokus der Arbeit liegt auf der Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose.

Dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper in Zusammenhang mit Vaskulopathien stehen, ist bereits bekannt [6, 85, 96]. Kill et al. beschrieb, dass AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG's bei systemischer Sklerose *in vitro* und *in vivo* einen profibrotischen und proinflammatorischen Effekt aufweisen [85]. In HMEC's zeigte sich in Assoziation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG neben erhöhten Spiegeln von Il-8, eine Neutrophilen-Migration, Fibrose und reduzierte Wundheilung [85]. Dragun et al. bewies 2005 [6], dass Autoantikörper der Klassen IgG 1 und 3 mit

Bindungsfähigkeit an den  $AT_1R$  eine pathophysiologische Rolle in der akuten therapierefraktären, vaskulären Nierentransplantatabstoßung, verbunden mit arterieller Hypertonie, spielen. Hierbei wurden neonatale Kardiomyozyten von Ratten verwendet, die den  $AT_1$  Rezeptor exprimieren. Nach Zugabe des IgG's betroffener Patienten, die Anti- $AT_1R$ -Antikörper aufwiesen, konnte in einem Bioassay eine erhöhte Kontraktionskraft (Beats/min) gemessen werden, sowohl vor der Transplantation als auch zum Zeitpunkt der Abstoßung. Mittels des  $AT_1$ -Rezeptorblockers Losartan konnten diese Effekte geblockt werden [6]. In nierentransplantierten Ratten konnte man 7 Tage nach einer Anti- $AT_1R$ -Antikörper Infusion nur in diesen Nieren Anzeichen von Endarteriitis und intravaskulärer Entzündung sehen, nicht aber in den mit Kontroll-IgG behandelten Ratten [6]. Auch die Arbeitsgruppe um Hiemann stellte einen Zusammenhang zwischen erhöhten Spiegeln von Anti- $AT_1R$ -Antikörpern, Anti- $ET_A$ R-Antikörpern und Vaskulopathien bei Patienten nach Herztransplantation dar [7].

Eine Involvierung von Anti- $AT_2R$ -Antikörpern und Anti- $ET_B$ R-Antikörpern ist bei der systemischen Sklerose bisher nicht beschrieben, jedoch erfolgte in dieser Arbeit vergleichend die Untersuchung der Expression dieser Rezeptoren an beiden Zelllinien. Es konnte dargestellt werden, dass ebenfalls der  $AT_2R$  und  $ET_B$ R exprimiert wird. Über die physiologische Bedeutung des  $AT_2$  Rezeptors liegt bisher nicht viel vor. Er ist der vorherrschende Rezeptor am menschlichen Herzen. An Endothelzellen von Koronararterien führt die Aktivierung des  $AT_2$ -Rezeptors zu einer Wachstumshemmung, während durch  $AT_1$ -Rezeptoren eine Wachstumsstimulation vermittelt wird [97]. Die Stimulation von  $ET_A$ -Rezeptoren führt zu einer Vasokonstriktion von glatten Muskelzellen, wohingegen über  $ET_B$ -Rezeptoren, vor allem von Endothelzellen exprimiert, eine Vasodilatation vermittelt wird [73, 98].

#### 4.1.2 Tissue Faktor Expressierung

Von großer Bedeutung für die Versuche war die Expressierung des Tissue Faktors, die in beiden Zelllinien nachweisbar war.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf mRNA-Ebene in HMEC-1 und HEK-293 durch Stimulation mit  $AT_1R/ET_A$ R-IgG die Tissue Faktor (TF) und *alternatively spliced Human Tissue Factor* (asHTF) Expressierung nach 1 h am stärksten induziert war. Die Arbeitsgruppe um Mackman beschrieb ebenfalls *in vitro* eine erhöhte Tissue Faktor Expressierung in Zellen, allerdings in COS-7 Zellen [99].

Um die transkriptionelle Regulation des TF besser zu verstehen, wurden die unterschiedlich großen TF Promotorfragmente in einen pGL4.10 [*luc*] Vektor kloniert und somit rekombinante

Plasmide hergestellt. Dies erlaubte es, den Mechanismus der TF Promotoraktivierung durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG im Vergleich zu den natürlichen Liganden exakt aufzuklären und damit eine pathogenetische Rolle der autoimmunen Rezeptoraktivierung bei Patienten mit SSc näher zu beschreiben.

Der TF ist ein proinflammatorisch und prothrombotisch wirkendes transmembranäres Glykoprotein, der zusammen mit Proconvertin den extrinsischen Pfad der Blutgerinnung bildet [47]. Neben seiner physiologischen Funktion als Initiator des Gerinnungssystems *in vivo* besitzt der TF eine wichtige Rolle als Modulator von Entzündungsreaktionen. Der TF ist ein Zielgen für den bei entzündlichen Prozessen eine Rolle spielenden Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, dieser durch Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper aktiviert werden kann [6]. Er ist neben der Entstehung an der Atherosklerose auch am Prozess der Thrombose beteiligt [55]. Unter pathologischen Bedingungen, wie bei einer endothelialen Schädigung, kommt es zu einer erhöhten Expression von Tissue Faktor durch vaskuläre Zellen mit einer vermehrten Freisetzung von Tissue Faktor positiven Mikropartikeln [100]. Somit kann dem Tissue Faktor eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Thrombose zugesprochen werden, da *in situ* Thrombosen bei der systemischen Sklerose neben der Endothelzellproliferation und Fibrosierung bei der obliterativen Vaskulopathie zu finden sind [6, 100, 101]. Cerinic et al. zeigte, dass bei der systemischen Sklerose als Folge einer Beeinträchtigung der Fibrinolyse auch Faktoren wie der von Willebrand Faktor, PAI oder der gewebespezifische Plasminogenaktivator erhöht sind und somit die Gerinnung stärker aktiviert ist [12, 102].

Bei dem septischen Schock ist der Tissue Faktor ein kritischer Mediator bei der Entwicklung der disseminierten intravasalen Koagulation (DIC). Prozesse der Koagulation und Fibrinolyse sind hierbei dysreguliert [53].

## **4.2 Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch die natürlichen Liganden**

### **Ang II und ET-1**

In der vorliegenden Arbeit wurden die HEK-293 und HMEC-1 Zellen mit den pGL-Konstrukten transfiziert und zunächst mit den natürlichen Liganden Ang II und ET-1 stimuliert. Bekannt ist im Rahmen der vaskulären Dysfunktion, dass erhöhte Spiegel von Ang II und ET-1 bei Patienten mit systemischer Sklerose vorliegen [36, 68, 79].

Ang II ist als vasokonstriktorisches Peptidhormon bei Gefäßentzündungen, Hypertension und Remodelingprozessen involviert [16], sodass eine Korrelation zu der obliterativen Vaskulopathie

bei der systemischen Sklerose anzunehmen ist. In dieser Arbeit konnte in beiden Zelllinien bei pGL-673 und pGL-856 eine signifikante TF Promotor Aktivierung durch Stimulation mit Ang II festgestellt werden. Die höchste TF Promotor Aktivität zeigte sich bei dem Konstrukt pGL-673, sodass dieses für die weiteren Experimente verwendet wurde. Hinsichtlich der Aktivität des TF führte Ang II in beiden Zelllinien, vergleichend zu ET-1, zu einem stärkeren Effekt. Bekannt ist, dass Ang II über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B die Transkription von TF aktiviert und somit die prothrombotische Eigenschaft des TF induziert [6, 65, 66].

ET-1 hat ebenfalls vasokonstriktorische Eigenschaften und bewirkt eine verstärkte Zellproliferation [70]. SSc Patienten entwickeln oft im Rahmen eines fibrotischen Umbaus der Lunge eine PAH [41]. Bestätigt ist, dass bei einer PAH erhöhte ET-1 Spiegel nachweisbar und dass ET-1 und TF bei der PAH möglicherweise miteinander assoziiert sind [75, 81]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine TF Aktivierung durch ET-1 gezeigt werden, allerdings in weniger starkem Maße als im Vergleich zu Ang II. Die TF Aktivierung konnte signifikant durch den selektiven ET<sub>A</sub>R-Blocker Sitaxentan und AT<sub>1</sub>R-Blocker Valsartan inhibiert werden.

### 4.3 Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG

In weiteren Experimenten erfolgte in beiden Zelllinien die Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG. In der vorliegenden Arbeit wurde mit IgG-Dosen von 1,5 mg/ml gearbeitet, da sich die signifikant höchsten Promotor Aktivitäten mit den AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG Konzentrationen von 1,5 mg/ml und 2,0 mg/ml ergaben.

Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle und dem Kontroll-IgG von gesunden Probanden konnte eine signifikante Aktivierung des TF Promotors durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG festgestellt werden, die durch den Einsatz des selektiven ET<sub>A</sub>R-Blockers Sitaxentan und AT<sub>1</sub>R-Blockers Valsartan signifikant inhibierbar war. Valsartan führt vor allem bei der renalen Krise bei der SSc zu einem deutlich besseren Outcome [103].

An den HMEC Zellen wurde ebenfalls der inhibierende Effekt von ET<sub>B</sub>R und AT<sub>2</sub>R-Blockern geprüft. Diese hatten jedoch keinen signifikanten hemmenden Einfluss auf die Tissue Faktor Aktivierung. Dragun et al. beschrieb ebenfalls, dass lediglich der AT<sub>1</sub>R-Blocker Losartan in AT<sub>1</sub>R exprimierenden neonatalen Kardiomyozyten einen hemmenden Effekt hatte, der AT<sub>2</sub>R-Blocker PD 123,319 dagegen nicht [6]. Dies bestätigt, dass Autoantikörper von Patienten mit SSc über die Aktivierung der spezifischen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R die TF Expression regulieren und einen gleichen Wirkmechanismus wie die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 besitzen [4].

Ein Zusammenhang zwischen Autoantikörpern, TF und Vaskulopathie wurde auch von Dragun

et al. beschrieben [6]. Biopsien aus Nieren bei Patienten mit vaskulärer Nierentransplantatabstoßung *und* dem Vorliegen von Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern wiesen eine erhöhte Expression von TF auf. Durch den AT<sub>1</sub>R Blocker Losartan und Plasmapherese konnte die TF Expression signifikant reduziert werden [6]. Dechend et al. zeigte, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Ang II bei Präeklampsie Patientinnen über eine AT<sub>1</sub>R Stimulation in der Plazenta eine erhöhte TF Expression bewirken, die zur Pathogenese der Präeklampsie beitragen könnte [104].

#### **4.4 Transkriptionelle Regulation des Tissue Faktor Promotors durch Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und den natürlichen Liganden Ang II und ET-1**

In dieser Arbeit wurde zudem erstmals eine direkte Bindung zwischen einem Transkriptionsfaktor und dem TF Promotor untersucht, im Hinblick auf dessen Aktivierung durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und die natürlichen Liganden Ang II und ET-1.

Bei der systemischen Sklerose wird eine dysregulierte Expression von mehreren Transkriptionsfaktoren beobachtet. Das *Fos related antigen 2* (Fra2), zu der *Activator protein 1* (AP-1) Familie gehörend, wurde *in vitro* in SSc Fibroblasten durch Stimulation mit TGF- $\beta$  und PDGF deutlich überexprimiert [105]. Die Arbeitsgruppe um Maurer et al zeigte, dass Fra2 in den Hautbiopsien der Patienten mit systemischer Sklerose deutlich erhöht und neben den fibrotischen Eigenschaften auch in Prozesse der Mikrovaskulopathie bei der systemischen Sklerose involviert ist [106]. Auch der Transkriptionsfaktor *Activating transcription factor 3* (ATF3) wird durch TGF- $\beta$  in SSc Fibroblasten überexprimiert [107].

Ein anderer Transkriptionsfaktor, *Friend leukemia virus integration 1* (Fli1), zu der Ets Familie gehörend, ist in Endothelzellen der Lunge bei Patienten mit systemischer Sklerose reduziert und könnte somit aufgrund der Mindereexpression mit den pulmonalen Komplikationen bei dieser Erkrankung assoziiert sein [108]. Fli1 reguliert unter anderem die Angiogenese, sodass eine Relevanz des Mangels von Fli1 bei der Vaskulopathie der systemischen Sklerose angenommen werden kann [109]. Andere Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B können den Tissue Faktor regulieren und zu tiefen Beinvenenthrombosen führen [66].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch *in silico* Analysen festgestellt werden, dass innerhalb des TF Promotors eine hochspezifische Bindestelle für den Transkriptionsfaktor Ets-1 vorliegt, sodass in der Arbeit der Fokus auf diesem Transkriptionsfaktor liegt. Die TF Promotor Fragmente der Größen 856 bp und 673 bp enthalten eine Ets-1 Bindestelle, das Fragment der

Größe 420 bp jedoch nicht. Es konnte die exakte Bindestelle für den Ets-1 Transkriptionsfaktor im TF Promotor festgestellt werden, die sich zwischen den Basenpaaren -448 bis -441 befindet.

Ets-1 ist ein Proto-Onkoprotein und gehört zu der Familie der ETS-Transkriptionsfaktoren. Ets-1 spielt bei rheumatoiden Erkrankungen, dem systemischen Lupus erythematoses und bei Krebserkrankungen eine pathogenetische Rolle [110, 111, 112]. Da Ets-1 ebenfalls in Prozesse endothelialer Zellproliferation und Angiogenese einbezogen ist, kommt ihm eine entscheidende Schlüsselrolle bei der obliterativen Vaskulopathie zu [19].

Um die Rolle von dem Transkriptionsfaktor Ets-1 in der Aktivierung des TF Promotor Gens durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG zu verifizieren, wurden die HEK-293 Zellen und HMEC-1 Zellen im Vorfeld auf eine Expressierung von Ets-1 auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Unter Verwendung einer Zeitreihe konnte festgestellt werden, dass in beiden Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene nach 1 h die signifikant höchste Ets-1 Expressierung stattfand. In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass in HMEC-1 die phosphorylierte (aktive) Form von Ets-1 im Kern und die unphosphorylierte Form im Kern und im Zytoplasma nachzuweisen war. Nach Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG ließ sich die aktive Form im Kern *und* im Zytoplasma nachweisen [8].

Die Arbeitsgruppe von Mackman et al. untersuchte ebenfalls den TF Promotor in Hinblick auf eine Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren in einem anderen Zelltyp. Hierbei wurden COS-7 Zellen transfiziert und die Transkriptionsfaktoren AP-1 und Sp1 untersucht. Sie fanden heraus, dass die Region zwischen - 278 und + 121 am entscheidendsten war für die transkriptionelle TF Promotor Aktivität [99]. Wie entscheidend ein Transkriptionsfaktor für die TF Aktivierung ist, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen dargestellt. Dechend et al. beschrieb, dass es in VSMC's, transfiziert mit Tissue Faktor Promotoren ohne AP-1 - und ohne NF-κB Bindestelle, zu keiner TF Aktivierung kam, weder durch Ang II noch durch Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper der Präeklampsie Patientinnen [104]. Müller et al. zeigte *in vitro* und *in vivo*, dass eine AT<sub>1</sub>R Blockade AP-1 und NF-κB hemmt und somit die TF Expressierung in vaskulären Zellen reduziert wurde [113].

Die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit zeigen eindeutig eine Ets-1 induzierte TF Aktivierung durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und die natürlichen Liganden Ang II und ET-1.

Ein Zusammenhang zwischen dem TF und dem Transkriptionsfaktor Ets-1 ist zudem in anderen Arbeiten dargestellt worden [58, 18, 114]. Die Arbeitsgruppe von Arderiu G. et al beschreibt allerdings eine TF induzierte Ets-1 Expression in HMEC Zellen, diese signifikant reduziert ist in

TF inaktivierten Zellen [18]. Eine andere Arbeitsgruppe bestätigt ebenfalls in THP-1 Zellen eine Korrelation zwischen Ets-1 und TF Promotor Aktivierung [114].

Ein Zusammenhang zwischen Ets-1 und SSc, wie hier in dieser Arbeit vorliegend, wurde von der Arbeitsgruppe um Jinnin aufgezeigt. Erhöhte Spiegel des *hepatocyte growth factors* (HGF) bewirkten bei SSc-Fibroblasten über eine Ets-Bindestelle eine deutlich stärkere Hochregulation von Ets-1 als bei normalen Fibroblasten [115].

Unsere Arbeitsgruppe konnte zusätzlich in EMSA Experimenten eine spezifische Bindung von Ets-1 an den TF Promotor zeigen, diese verstärkt wurde durch eine Stimulation von AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG. Supershifts lieferten dabei einen eindeutigen Beweis für eine Bindung von Ets-1 an den TF Promotor. Ebenfalls wurde in einem ChIP Assay (Chromatin-Immunpräzipitation) *ex vivo* die Bindung von Ets-1 an den TF Promotor verifiziert.

#### 4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Vaskulopathie ist bei der systemischen Sklerose maßgeblich an der Pathogenese beteiligt.

Bei 80% der Patienten stellt das Raynaud-Syndrom das erste Symptom als Korrelat der endothelialen Dysfunktion mit Vasokonstriktion dar. Die Vaskulopathie findet neben dem Raynaud Syndrom und den digitalen Ulzerationen auch Ausdruck in Dysfunktionen des Ösophagus, renalen Krisen, einer Herzinsuffizienz und pulmonalen Hypertonie [90]. Die proliferative obliterative Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose basiert auf einer vielschichtigen und komplexen Pathogenese. Überwiegend ist das mikrovaskuläre System betroffen [90].

Bei der systemischen Sklerose liegt eine obliterative Vaskulopathie vor, die durch eine Verdickung sowohl der Intima als auch der Media und eine Fibrosierung gekennzeichnet ist. Vorausgehend ist hier eine endotheliale Schädigung, die auf einem Ungleichgewicht von vasoaktiven und vasokonstriktiven Faktoren, zugunsten der vasokonstriktiven Faktoren, beruht [11]. In Folge der Endothelproliferation, dem fibrotischen Umbau von Intima, Media und Adventitia und *in situ* Thrombosen kommt es schließlich zum Gefäßverschluss, der obliterativen Vaskulopathie. Entscheidend bei der Genese der *in situ* Thrombosen ist die Involvierung des TF [14, 53], dem eine bedeutende Rolle *in vivo* bei dem Gerinnungsprozess zukommt. Bei dem Antiphospholipid Syndrom bewirken die Antiphospholipid-Antikörper auf Blut- und Endothelzellen eine Hochregulation des TF und somit eine Hyperkoagulabilität und Förderung von Thrombosen [116]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bei der systemischen Sklerose

dargestellt werden, dass Endothelzellen (HMEC-1) den TF exprimieren und somit eine tragende Rolle bei der obliterativen Vaskulopathie haben. Über den ERK1/2/Ets-1 Signalweg führen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper zu einer Endothelzellproliferation [8].

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die natürlichen Liganden Ang II und ET-1, deren Spiegel bei der SSc erhöht sind [36, 68, 79], und AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG zu einer Hochregulation des TF Promotors führen. Diese Effekte konnten durch spezifische pharmakologische Rezeptorblockaden des AT<sub>1</sub> - und ET<sub>A</sub>-Rezeptors inhibiert werden. Dies beweist, dass die agonistisch wirksamen Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper, die bei der systemischen Sklerose mit einem höheren Mortalitätsrisiko assoziiert sind [4], über die gleichen Rezeptoren wie die natürlichen Liganden regulierend wirken.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen ebenfalls einen direkten Link zwischen dem Transkriptionsfaktor Ets-1 und TF. Es konnte dargestellt werden, dass der TF eine hochspezifische Bindestelle für Ets-1 aufweist und dass eine Ets-1 induzierte TF Promotor Aktivierung durch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG und die natürlichen Liganden vorliegt. Ets-1 ist ein kritischer Regulator für die Ang II vermittelten entzündlichen Prozesse und Remodelingvorgänge an Gefäßen [16]. Neben dem prothrombotisch wirkenden TF kommt auch Ets-1 somit eine wichtige Rolle in der obliterativen Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose zu, in Zusammenspiel mit Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörpern und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörpern.

Da bei der systemischen Sklerose Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper eine zentrale Rolle bei der Pathophysiologie spielen, können Rezeptorblocker wie Valsartan und Bosentan eingesetzt werden. Wolf et al. stellte dar, dass Ang II den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B über den AT<sub>1</sub>R- und AT<sub>2</sub>R aktiviert und somit proinflammatorische Effekte von Ang II möglicherweise nicht allein durch AT<sub>1</sub>R Blocker zu inhibieren sind [117]. In einer anderen Arbeit wird beschrieben, dass zwischen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R ein Crosstalk bestehen könnte [118]. Dies wäre von bedeutender Relevanz für die Therapie der obliterativen Vaskulopathie bei der systemischen Sklerose.

Riemekasten et al. beschreibt, dass Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper bei der systemischen Sklerose zu einer PAH über eine Induktion der pulmonalen Vaskulopathie führen [119]. Bei der PAH findet Bosentan, ein dualer Endothelin Rezeptor Antagonist, Verwendung und setzt an dem vasokonstriktiven ET-1 an, um damit der Dysbalance von vasokonstriktiven und vasodilatativen Substanzen, die bei der systemischen Sklerose zugunsten der vasokonstriktiven Faktoren vorliegt, entgegenzuwirken [120]. ACE-Hemmer oder Nitrate werden nicht zur Behandlung der PAH eingesetzt, da sie unter Umständen zu einer

Verschlechterung beitragen können [121]. In der vorliegenden Arbeit wurde Sitaxentan als selektiver ET<sub>A</sub>R-Antagonist eingesetzt, dieser vor allem bei der pulmonalen Hypertonie NYHA III Anwendung fand. Das Produkt wurde allerdings nach drei damit assoziierten Todesfällen Dezember 2010 vom Markt genommen.

Ein relativ neuer Therapieansatz bildet die autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation, bei der danach unter anderem eine Kapillarneubildung beobachtet wurde, wobei diese nur sinnvoll ist, wenn die systemische Sklerose noch nicht zu weit fortgeschritten ist [122].

In der vorliegenden Arbeit wurden keine Experimente mit Ets-1- oder TF- Blockern eingesetzt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass ein Ets-1 Knockdown in HMEC-1 Zellen die TF Protein Expression nach Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG aufhob. Desweiteren konnte dargestellt werden, dass eine 15-minütige Präinkubation mit einem TF blockenden Antikörper die Endothelzellproliferation nach 1 h stündiger Stimulation mit AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG unterdrückte [101].

Inwiefern Ets-1 - und TF- Blocker in der Behandlung der systemischen Sklerose eine Rolle spielen werden, ist aktuell nicht klar abzusehen. Dennoch ist das Wissen um eine Involvierung von Ets-1 und TF in die Pathogenese dieser Erkrankung sehr bedeutend für weitere zukünftige Therapieansätze.

## 5. Zusammenfassung

Die systemische Sklerose ist eine zu den Kollagenosen gehörende Autoimmunerkrankung, die mit einer Fibrosierung, obliterativen Vaskulopathie und Autoimmunität einhergeht.

In Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe fanden sich an Patientenkohorten mit systemischer Sklerose agonistisch wirkende Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper (AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG), die eine zentrale pathophysiologische Rolle spielen und über den ERK1/2/Ets-1 Signalweg zu einer Endothelzellproliferation führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die transkriptionelle Aktivität des Tissue Faktors (TF) durch den Transkriptionsfaktor Ets-1 untersucht. Der TF ist ein zur Blutgerinnung gehörendes Protein und maßgeblich an der obliterativen Vaskulopathie der systemischen Sklerose beteiligt.

Die Versuche wurden an zwei Zelllinien, menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) und humanen mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1), durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 als auch AT<sub>1</sub>R/ET<sub>A</sub>R-IgG zu einer Ets-1 induzierten TF Promotor Aktivität führen und diese mittels des ET<sub>A</sub>R Blockers Sitaxentan und AT<sub>1</sub>R Blockers Valsartan inhibierbar ist. Die ET<sub>B</sub>R Blocker und AT<sub>2</sub>R Blocker hatten keinen inhibierenden Einfluss auf die TF Aktivierung, als Hinweis darauf, dass bei Patienten mit systemischer Sklerose Anti-AT<sub>1</sub>R-Antikörper und Anti-ET<sub>A</sub>R-Antikörper in die Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie involviert sind.

Außerdem konnte dargestellt werden, dass die TF Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor Ets-1 induziert wird. Durch Promotoranalysen konnte die Ets-1 Bindestelle auf -448 bis -441 bp eingegrenzt werden.

Da Ets-1 und der prothrombotische TF in die Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie involviert sind, ergeben sich hieraus neue Therapiemöglichkeiten für die systemische Sklerose, die eine Multiorgankrankheit darstellt und trotz der vorherrschenden Therapiemöglichkeiten noch viele ungeklärte Fragen aufwirft.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Maurer B, Walder M, Gay RE, Gay S, Distler O. [Systemic sclerosis. Objectives for the treatment]. *Z Rheumatol* 2009;68:37-43.
2. Zeng Y, Li M, Xu D, Hou Y, Wang Q, Fang Q. Macrovascular involvement in systemic sclerosis: evidence of correlation with disease activity. *Clin Exp Rheumatol*. 2012 Mar-Apr;30(2 Suppl 71):S76-80.
3. Chiang CH, Liu CJ, Huang CC, Chan WL, Huang PH, Chen TJ, Chung CM, Lin SJ, Chen JW, Leu HB. Systemic sclerosis and risk of ischaemic stroke: a nationwide cohort study. *Rheumatology (Oxford)*. 2013 Jan;52(1):161-5.
4. Riemekasten G, Philippe A, Näther M, Slowinski T, Müller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirják L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2011 Mar;70(3):530-6.
5. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jüpner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *J Clin Invest* 1999;103:945-52.
6. Dragun D, Müller DN, Bräsen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelhä M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schönemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 2005;352:558-69.
7. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, Hetzer R, Dragun D. Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation* 2012 Nov 15;94(9):919-24.
8. Näther M. Charakterisierung der autoimmun-vermittelten Signaltransduktion der Angiotensin II Typ 1 und Endothelin 1 Typ A Rezeptoren in systemischer Sklerose. 2010.
9. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology* 2009 Jun;48 Suppl 3:iii3-7.
10. Bradley J, Rabquer, Alisa E. Koch. Angiogenesis and Vasculopathy in Systemic Sclerosis: Evolving Concepts. *Curr Rheumatol Rep*. 2012 Feb;14(1):56-63.
11. Matucci-Cerinic M, Kahaleh B, Wigley FM. Review: evidence that systemic sclerosis is a vascular disease. *Arthritis and rheumatism*. 2013 Aug; 65(8):1953-1962.

12. Cerinic MM, Valentini G, Sorano GG, D'Angelo S, Cuomo G, Fenu L, Generini S, Cinotti S, Morfini M, Pignone A, Guiducci S, Del Rosso A, Kalfin R, Das D, Marongiu F. Blood coagulation, fibrinolysis and markers of endothelial dysfunction in systemic sclerosis. *Semin Arthritis Rheum* 2003;32(5):285-95.
13. 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;134:1087-97.
14. Randolph GJ, Luther T, Albrecht S, Magdolen V, Muller WA. Role of tissue factor in adhesion of mononuclear phagocytes to and trafficking through endothelium in vitro. *Blood*. 1998 Dec 1;92(11):4167-77.
15. Heidenreich S, Dercken C, August C, Koch HG, Nowak-Göttl U. High rate of acute rejections in renal allograft recipients with thrombophilic risk factors. *J Am Soc Nephrol*. 1998 Jul;9(7):1309-13.
16. Zhan Y, Brown C, Maynard E, Anshelevich A, Ni W, Ho IC, Oettgen P. Ets-1 is a critical regulator of Ang II-mediated vascular inflammation and remodeling. *J Clin Invest* 2005 Sep;115(9):2508-16.
17. Wei G, Srinivasan R, Cantemir-Stone CZ, Sharma SM, Santhanam R, Weinstein M, Muthusamy N, Man AK, Oshima RG, Leone G, Ostrowski MC. Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. *Blood* 2009 Jul 30;114(5):1123-30.
18. Arderiu G, Peña E, Aledo R, Espinosa S, Badimon L. Ets-1 transcription is required in tissue factor driven microvessel formation and stabilization. *Angiogenesis* 2012 Dec;15(4):657-69.
19. Sato Y. Role of ETS family transcription factors in vascular development and angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001 Feb;26(1):19-24.
20. Hunzelmann N, Genth E, Krieg T, Lehmacher W, Melchers I, Meurer M, Moinzadeh P, Müller-Ladner U, Pfeiffer C, Riemekasten G, Schulze-Lohoff E, Sunderkoetter C, Weber M, Worm M, Klaus P, Rubbert A, Steinbrink K, Grundt B, Hein R, Scharffetter-Kochanek K, Hinrichs R, Walker K, Szeimies RM, Karrer S, Müller A, Seitz C, Schmidt E, Lehmann P, Foeldvári I, Reichenberger F, Gross WL, Kuhn A, Haust M, Reich K, Böhm M, Saar P, Fierlbeck G, Kötter I, Lorenz HM, Blank N, Gräfenstein K, Juche A, Aberer E, Bali G, Fiehn C, Stadler R, Bartels V. The registry of the German Network for Systemic Scleroderma: frequency of disease subsets and patterns of organ involvement. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Aug;47(8):1185-92.

21. Arnsion Y, Amital H, Guiducci S, Matucci-Cerinic M, Valentini G, Barzilai O, Maya R, Shoenfeld Y. The role of infections in the immunopathogenesis of systemic sclerosis-evidence from serological studies. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Sep;1173:627-32.
22. Becker MO, Müller-Ladner U, Riemekasten G. Implementation von Leitlinien für eine Therapie der systemischen Sklerose. *Z Rheumatol.* 2010 Jun;69(4):310-7.
23. Maurer B, Stanczyk J, Jüngel A, Akhmetshina A, Trenkmann M, Brock M, Kowal-Bielecka O, Gay RE, Michel BA, Distler JH, Gay S, Distler O. MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010 Jun;62(6):1733-43.
24. Kill A, Riemekasten G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis pathogenesis. *Curr Rheumatol Rep.* 2015 May;17(5):34
25. John Varga and David Abraham. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* Mar 1, 2007; 117(3): 557–567.
26. Walker UA, Tyndall A, Czirják L, Denton C, Farge-Bancel D, Kowal-Bielecka O, Müller-Ladner U, Bocelli-Tyndall C, Matucci-Cerinic M. Clinical risk assessment of organ manifestations in systemic sclerosis: a report from the EULAR scleroderma trials and research group database. *Ann Rheum Dis.* 2007 Jun;66(6):754-63.
27. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, Bullo A, Cazzato M, Tirri E, Storino F, Giuggioli D, Cuomo G, Rosada M, Bombardieri S, Todesco S, Tirri G. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 italian patients. *Medicine (Baltimore).* 2002 Mar;81(2):139-53.
28. C. Strohbeck. Gastrointestinale Beteiligung bei Systemischer Sklerose. Uni Gießen. 2013.
29. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, Troyanskaya OG, Chi JT, Pergamenschikov A, McCalmont TH, Brown PO, Botstein D, Connolly MK. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12319-24.
30. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Criteria for the classification of early systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2001 Jul;28(7):1573-6.
31. Hachulla E, Launay D. Diagnosis and classification of systemic sclerosis. *Clin Rev Allergy Immunol* 2011 Apr;40(2):78-83.
32. Soumya Chatterjee. Systemic scleroderma. Cleveland clinic -center for continuing education. Published: August 2010.

33. Hurst RL, Berianu F, Ginsburg WW, Klein CJ, Englestad JK, Kennelly KD. Cryoglobulinemic vasculitis in a patient with CREST syndrome. *J Clin Neurosci*. 2014 May 19.
34. Murdaca G, Colombo BM, Cagnati P, Gulli R, Spano F, Puppo F. Endothelial dysfunction in rheumatic autoimmune diseases. *Atherosclerosis*. 2012 Oct; 224(2):309-317.
35. Slijkhuis W, Mali W, Appelman Y. A historical perspective towards a non-invasive treatment for patients with atherosclerosis. *Neth Heart J*. 2009 Apr;17(4):140-4.
36. David Abraham and Oliver Distler. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2007; 9(Suppl 2): S2.
37. Sgonc R, Gruschwitz MS, Boeck G, Sepp N, Gruber J, Wick G. Endothelial cell apoptosis in systemic sclerosis is induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity via CD95. *Arthritis Rheum*. 2000 Nov;43(11):2550-62.
38. Blaise S, Roustit M, Carpentier P, Seinturier C, Imbert B, Cracowski JL. The digital thermal hyperemia pattern is associated with the onset of digital ulcerations in systemic sclerosis during 3 years of follow-up. *Microvasc Res*. 2014 Jun 19;94C:119-122.
39. Ahrazoglu M, Moinzadeh P, Hunzelmann N. [Differential diagnoses of Raynaud's phenomenon]. *Dtsch Med Wochenschr* 2014 May;139(20):1064-9.
40. Hassoun PM. Lung involvement in systemic sclerosis. *Presse Med*. 2011 Jan;40(1 Pt 2):e3-e17.
41. Chung L, Farber HW, Benza R, Miller DP, Parsons L, Hassoun PM, McGoon M, Nicolls MR, Zamanian RT. Unique Predictors of Mortality in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension Associated With Systemic Sclerosis in the Reveal Registry. *Chest*. 2014 Jul 3.
42. Dr. P. Dorfmueller, M. Humbert, F. Capron. Vaskulopathien bei pulmonal arterieller Hypertonie. *Der Pathologe*. Springer. March 2006, Volume 27, Issue 2, pp 140-146.
43. Denton CP, Lapadula G, Mouthon L, Muller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. *Rheumatology (Oxford)* 2009;48 Suppl 3:iii32-5.
44. Cannon PJ, Hassar M, Case DB, Casarella WJ, Sommers SC, LeRoy EC. The relationship of hypertension and renal failure in scleroderma (progressive systemic sclerosis) to structural and functional abnormalities of the renal cortical circulation. *Medicine (Baltimore)*. 1974 Jan;53(1):1-46.
45. Desai CS, Lee DC, Shah SJ. Systemic sclerosis and the heart: current diagnosis and management. *Curr Opin Rheumatol*. 2011 Nov;23(6):545-54.

46. Chu SY, Chen YJ, Liu CJ, Tseng WC, Lin MW, Hwang CY, Chen CC, Lee DD, Chen TJ, Chang YT, Wang WJ, Liu HN. Increased risk of acute myocardial infarction in systemic sclerosis: a nationwide population-based study. *Am J Med* 2013 Nov;126(11):982-8.
47. Butenas S. Tissue factor structure and function. *Scientifica (Cairo)* 2012;2012:964862.
48. Morrissey JH. Tissue factor: A key molecule in hemostatic and nonhemostatic systems. *Int J Hematol.* 2004 Feb;79(2):103-8.
49. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000 Jul 1;96(1):170-5.
50. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL. The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002 Jun;13(4):247-53.
51. Rapaport SI. Regulation of the tissue factor pathway. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;614:51-62.
52. Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998 Mar;9 Suppl 1:S9-14.
53. Østerud B, Bjørklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost.* 2001 Dec;27(6):605-17.
54. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, Tan FK, Huang M, Diekman L, Mayes MD, Reveille JD, Agarwal SK. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R147.
55. Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Asada Y. Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2005;12(1):1-8.
56. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000 Feb 29;101(8):841-3.
57. Chung WS, Lin CL, Sung FC, Hsu WH, Yang WT, Lu CC, Kao CH. Systemic sclerosis increases the risks of deep vein thrombosis and pulmonary thromboembolism: a nationwide cohort study. *Rheumatology (Oxford).* 2014 Sep;53(9):1639-45.
58. Arderiu G, Pena E, Aledo R, Badimon L. Tissue factor-Akt signaling triggers microvessel formation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH.* 2012 Sep; 10(9):1895-1905.
59. Balakumar P, Jagadeesh G. Structural determinants for binding, activation and functional selectivity of the AT1 receptor. *J Mol Endocrinol* 2014 Oct;53(2):R71-92.
60. Maron BA, Leopold JA. The role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathobiology of pulmonary arterial hypertension (2013 Grover Conference series). *Pulm*

Circ2014 Jun;4(2):200-10.

61. Martin Middeke. Arterielle Hypertonie. Thieme Verlag. 1.Auflage 2005:9 ff.
62. Kristof Graf. Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktion für die linksventrikuläre Hypertrophie. Steinkopff Verlag. Juni 2000:15 ff.
63. Siegenthaler W. Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag. 9.Auflage 2006:664 ff.
64. Detlev Ganten, Klaus Ruckpaul, Josef Köhrle. Molekularmedizinische Grundlagen von para- und autokrinen Regulationsstörungen. Springer Verlag. 2006:391 ff.
65. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Suzuki Y, Egido J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16 Suppl 1:27-33.
66. Li YD, Ye BQ, Zheng SX, Wang JT, Wang JG, Chen M, Liu JG, Pei XH, Wang LJ, Lin ZX, Gupta K, Mackman N, Slungaard A, Key NS, Geng JG. NF-kappaB transcription factor p50 critically regulates tissue factor in deep vein thrombosis. *J Biol Chem*. 2009 Feb 13;284(7):4473-83.
67. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*. 2002 May;4(5):E131-6.
68. Kawaguchi Y, Takagi K, Hara M, Fukasawa C, Sugiura T, Nishimagi E, Harigai M, Kamatani N. Angiotensin II in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin II type 1 receptors. *Arthritis Rheum*. 2004 Jan;50(1):216-26.
69. Kovalchik MT, Guggenheim SJ, Silverman MH, Robertson JS, Steigerwald JC. The kidney in progressive systemic sclerosis: a prospective study. *Ann Intern Med* 1978; 89: 881-7.
70. Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can J Physiol Pharmacol* AA2008 Aug;86(8):485-98.
71. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
72. Yu JC, Pickard JD, Davenport AP. Endothelin ETA receptor expression in human cerebrovascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 1995;116:2441-6.
73. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-63.
74. Rossi GP, Colonna S, Pavan E, Albertin G, Della Rocca F, Gerosa G, Casarotto D, Sartore S, Pauletto P, Pessina AC. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. *Circulation* 1999;99:1147-55.

75. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* 2001 Nov;120(5):1562-9.
76. Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, Laurent GJ, McAnulty RJ. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994 Oct;11(4):439-45.
77. Silva I, Teixeira A, Oliveira J, Almeida I, Almeida R, Vasconcelos C. Predictive value of vascular disease biomarkers for digital ulcers in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol.* 2015 Jul-Aug;33(4 Suppl 91):S127-30.
78. Biondi ML, Marasini B, Bassani C, Agostoni A. Increased plasma endothelin levels in patients with Raynaud's phenomenon. *N Engl J Med* 1991; 324: 1139–40.
79. Yamane K, Miyauchi T, Suzuki N, Yuhara T, Akama T, Suzuki H, Kashiwagi H. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1992; 19: 1566–71.
80. Vancheeswaran R, Magoulas T, Efrat G, Wheeler-Jones C, Olsen I, Penny R, Black CM. Circulating endothelin-1 levels in systemic sclerosis subsets--a marker of fibrosis or vascular dysfunction? *J Rheumatol.* 1994 Oct;21(10):1838-44.
81. Collados MT, Velázquez B, Borbolla JR, Sandoval J, Massó F, Montaña LF, Guarner V.. Endothelin-1 and functional tissue factor: a possible relationship with severity in primary pulmonary hypertension. *Heart Vessels.* 2003 Mar;18(1):12-7.
82. Peter Altmeyer. *Therapielexikon Dermatologie und Allergologie. Therapie kompakt von A-Z.* Springer Verlag. 2 Auflage:957 ff.
83. Chung L, Utz PJ. Antibodies in scleroderma: direct pathogenicity and phenotypic associations. *Curr Rheumatol Rep.* 2004 Apr;6(2):156-63.
84. Spencer-Green G, Alter D, Welch HG. Test performance in systemic sclerosis: anti-centromere and anti-Scl-70 antibodies. *Am J Med* 1997 Sep;103(3):242-8.
85. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, Becker MO, Heidecke H, Worm M, Witznath M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther.* 2014 Jan 28;16(1):R29.
86. LaMarca B, Parrish M, Ray LF, Murphy SR, Roberts L, Glover P, Wallukat G, Wenzel K, Cockrell K, Martin JN Jr, Ryan MJ, Dechend R. Hypertension in response to autoantibodies to

the angiotensin II type I receptor (AT<sub>1</sub>-AA) in pregnant rats: role of endothelin-1. *Hypertension*. 2009 Oct;54(4):905-9.

87. Chaturvedi S, McCrae KR. Recent advances in the antiphospholipid antibody syndrome. *Curr Opin Hematol*. 2014 Sep;21(5):371-9.

88. Antonioli CM, Danieli E, Airo P, Cattaneo R, Tincani A. More on anticardiolipin and anti-beta 2 glycoprotein I in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2003, 62:589–590.

89. Lewis J. Rubin, M.D., David B. Badesch, M.D., Robyn J. Barst, M.D., Nazzareno Galiè, M.D., Carol M. Black, M.D., Anne Keogh, M.D., Tomas Pulido, M.D., Adaani Frost, M.D., Sébastien Roux, M.D., Isabelle Leconte, Ph.D., Michael Landzberg, M.D., and Gérald Simonneau, M.D. Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896-903.

90. Moinzadeh P, Riemekasten G, Siegert E, Fierlbeck G, Henes J, Blank N, Melchers I, Mueller-Ladner U, Frerix M, Kreuter A, Tigges C, Lahner N, Susok L, Guenther C, Zeidler G, Pfeiffer C, Worm M, Karrer S, Aberer E, Bretterklieber A, Genth E, Simon JC, Distler JH, Hein R, Schneider M, Seitz CS, Herink C, Steinbrink K, Sárdy M, Varga R, Mensing H, Mensing C, Lehmann P, Neeck G, Fiehn C, Weber M, Goebeler M, Burkhardt H, Buslau M, Ahmadi-Simab K, Himsel A, Juche A, Koetter I, Kuhn A, Sticherling M, Hellmich M, Kuhr K, Krieg T, Ehrchen J, Sunderkoetter C, Hunzelmann N. Vasoactive Therapy in Systemic Sclerosis: Real-life Therapeutic Practice in More Than 3000 Patients. *J Rheumatol*. 2016 Jan;43(1):66-74.

91. Lauer T., Kelm K. Endotheliale Dysfunktion als Ursache der kardialen Vaskulopathie. *Diabetes und Herz*. Steinkopff Verlag 2005;pp 122-139.

92. Hundt S. Immortalisierung und Charakterisierung von Zellen osteoblastischen Phänotypes und die Mechanismen der Apoptose. 2000.

93. Magnusson Y, Wallukat G, Waagstein F, Hjalmarson A, Hoebeke J. Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect. *Circulation*. 1994 Jun;89(6):2760-7.

94. Fu ML, Herlitz H, Wallukat G, Hilme E, Hedner T, Hoebeke J, Hjalmarson A. Functional autoimmune epitope on alpha 1-adrenergic receptors in patients with malignant hypertension. *Lancet*. 1994 Dec 17;344(8938):1660-3.

95. Cai Y, Wang Y, Xu J, Zuo X, Xu Y. Down regulation of ether-a-go-go-related gene potassium channel protein through sustained stimulation of AT<sub>1</sub> receptor by angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 26;452(3):852-7.

96. Dragun D, Catar R, Kusch A, Heidecke H, Philippe A. Non-HLA-antibodies targeting

- Angiotensin type 1 receptor and antibody mediated rejection. *Hum Immunol.* 2012 Dec;73(12):1282-6.
97. Regitz-Zagrosek V, Friedel N, Heymann A, Bauer P, Neuss M, Rolfs A, Steffen C, Hildebrandt A, Hetzer R, Fleck E. Regulation, chamber localization and subtype distribution of angiotensin II receptors in human hearts. *Circulation* 1995; 91:1461-1471.
98. Lüscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation.* 2000 Nov 7;102(19):2434-40.
99. Mackman N, Fowler BJ, Edgington TS, Morrissey JH. Functional analysis of the human tissue factor promoter and induction by serum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(6):2254-8.
100. Mackman N, Tilley RE, Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1687-93.
101. Catar Rusan, Philippe Aurelie, Näther Melanie, Wagner, Philine, Wischnewski, Oskar, Hegner, Björn, Eisenreich, Andreas, Rauch, Ursula, Heidecke, Harald, Kill, Angela, Riemekasten, Gabi, Dragun, Duska. Transcriptional regulation of endothelial cell proliferation induced by antibody simultaneously targeting AT<sub>A</sub> -and ET<sub>A</sub> Receptors. 2015. In submission.
102. Ames PR, Lupoli S, Alves J, Atsumi T, Edwards C, Iannaccone L, Khamashta MA, Hughes GR, Brancaccio V. The coagulation/fibrinolysis balance in systemic sclerosis: evidence for a haematological stress syndrome. *Br J Rheumatol.* 1997 Oct;36(10):1045-50.
103. Sterling G. West. *Rheumatology Secrets.* 2nd Edition. 2002
104. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, Kreuzer J, Park JK, Theuer J, Juepner A, Gulba DC, Mackman N, Haller H, Luft FC. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. *Circulation.* 2000 May 23;101(20):2382-7.
105. Reich N, Maurer B, Akhmetshina A, Venalis P, Dees C, Zerr P, Palumbo K, Zwerina J, Nevskaya T, Gay S, Distler O, Schett G, Distler JH. The transcription factor Fra-2 regulates the production of extracellular matrix in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2010 Jan;62(1):280-90.
106. Maurer B, Busch N, Jüngel A, Pileckyte M, Gay RE, Michel BA, Schett G, Gay S, Distler J, Distler O. Transcription factor fos-related antigen-2 induces progressive peripheral vasculopathy in mice closely resembling human systemic sclerosis. *Circulation.* 2009 Dec 8;120(23):2367-76.

107. Mallano T, Palumbo-Zerr K, Zerr P, Ramming A, Zeller B, Beyer C, Dees C, Huang J, Hai T, Distler O, Schett G, Distler JH. Activating transcription factor 3 regulates canonical TGF $\beta$  signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2015 Jan 14.
108. R. Han and M.Trojanowska. ERG and FLI1 in systemic sclerosis associated pulmonary complications . *ATS Journals*. Publication Date 2014.
109. Yoshihide Asano, Andreea M. Bujor and Maria Trojanowska. The impact of Fli1 deficiency on the pathogenesis of systemic sclerosis. *J Dermatol Sci*. 2010 Sep; 59(3): 10.1016.
110. Leng RX, Pan HF, Chen GM, Feng CC, Fan YG, Ye DQ, Li XP. The dual nature of Ets-1: focus to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*. 2011 Jun; 10(8):439-443.
111. Wernert N, Justen HP, Rothe M, Behrens P, Dreschers S, Neuhaus T, Florin A, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y. The Ets 1 transcription factor is upregulated during inflammatory angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Mol Med (Berl)*. 2002 Apr; 80(4):258-266.
112. Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, Stehelin D. C-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans. *The American journal of pathology*. 1992 Jan; 140(1):119-127.
113. Müller DN, Mervaala EM, Dechend R, Fiebeler A, Park JK, Schmidt F, Theuer J, Breu V, Mackman N, Luther T, Schneider W, Gulba D, Ganten D, Haller H, Luft FC. Angiotensin II (AT(1)) receptor blockade reduces vascular tissue factor in angiotensin II-induced cardiac vasculopathy. *Am J Pathol*. 2000 Jul;157(1):111-22.
114. Maryan Donovan-Peluso, Lisa Dawn George, Andrea Cortese Hassett. Lipopolysaccharide Induction of Tissue Factor Expression in THP-1 Monocytic Cells. *J Biol Chem*. 1994 Jan 14;269(2):1361-9.
115. Jinnin M, Ihn H, Mimura Y, Asano Y, Yamane K, Tamaki K. Matrix metalloproteinase-1 up regulation by hepatocyte growth factor in human dermal fibroblasts via ERK signalling pathway involves Ets-1 and fli1. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jun 21;33(11):3540-9.
116. Kinev AV, Roubey RA. TF in the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2008 Oct; 17(10):952-8.
117. Wolf G, Wenzel U, Burns KD, Harris RC, Stahl RA, Thaiss F. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-kappaB through AT1 and AT2 receptor. *Kidney Int*. 2002 Jun;61(6):1986-95.
118. Nan Zhu. Development of a molecular toolbox to study the cross-talk between

Angiotensin II type I and Endothelin-1 type A receptors in the context of obliterative vasculopathy. 2015.

119. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, Witzenrath M, Kühl AA, Heidecke H, Ghofrani HA, Tiede H, Schermuly RT, Nickel N, Hoeper MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Oct 1;190(7):808-17.

120. Riemekasten G, Sunderkötter C. Vasoactive therapies in systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)*. 2008 Feb;47(2):234-5.

121. Ulrich Costabel, Claus Kroegel. *Klinische Pneumologie: Das Referenzwerk für Klinik und Praxis*. Thieme. 1 Auflage 2014:600 ff.

122. U.A. Walker, P. Knöß, M. Jakobs, V. Krenn. Sklerodermie und fibrosierende Erkrankungen. *Z Rheumatol* 2009;68:312-319.

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Philine Wagner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Ets-1 induzierte Tissue Faktor Promotor Aktivierung durch Auto-Antikörper bei systemischer Sklerose „

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

## **Publikationen**

1. Rusan Catar, Janusz Witowski, **Philine Wagner**, Isa Annett Schramm, Edyta Kawka, Aurelie Philippe, Duska Dragun, Achim Jörres. The proto-oncogene c-Fos transcriptionally regulates VEGF production during peritoneal inflammation. *Kidney International* 06/2013; 84(6):1119–28.
2. T Florian Fuller, Uwe Hoff, Linghua Kong, Melanie Naether, **Philine Wagner**, Melina Nieminen-Kelhä, Jochen Nolting, Friedrich C. Luft, Björn Hegner, Duska Dragun. Cytoprotective Actions of FTY720 Modulate Severe Preservation Reperfusion Injury in Rat Renal Transplants. *Transplantation* 02/2010; 89(4):402-8.

### **Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Philine Wagner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Rusan Catar, Janusz Witowski, **Philine Wagner**, Isa Annett Schramm, Edyta Kawka, Aurelie Philippe, Duska Dragun, Achim Jörres. The proto-oncogene c-Fos transcriptionally regulates VEGF production during peritoneal inflammation. *Kidney International* 06/2013; 84(6):1119–28.

Publikation 2: T Florian Fuller, Uwe Hoff, Linghua Kong, Melanie Naether, **Philine Wagner**, Melina Nieminen-Kelhä, Jochen Nolting, Friedrich C Luft, Björn Hegner, Duska Dragun. Cytoprotective Actions of FTY720 Modulate Severe Preservation Reperfusion Injury in Rat Renal Transplants. *Transplantation* 02/2010; 89(4):402-8.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorand

## Vorträge und Poster

### Vorträge

Catar R, Kretzschmar T, Naether M, Philippe A, **Wagner P**, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D. Synergy of agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1 Receptors increases sensitivity to natural ligands. ET-11: International Conference on Endothelin, 09-12.09.2009, Montreal, Canada

Catar R, Kretzschmar, T , Naether, M , Philippe, A , **Wagner P** , Luft, FC , Riemekasten, G, Dragun, D. Agonistic autoantibodies targeting ET<sub>A</sub>- and AT<sub>1</sub>- receptors act synergistically in systemic sclerosis patients. 1<sup>st</sup> Systemic Sclerosis World Congress, 11-13.02. 2010, Florence, Italy

Joerres A, Catar R, **Wagner P**, Dragun D, Witowski J. Characterization of Mesothelial Cell VEGF Release During Peritonitis: The Role of c-Fos-Mediated. Stimulation by TGF- $\beta$ 1 and TNF $\alpha$ . ASN Kidney week 2012, 30.10.-04.11.2011, San Diego, USA

Philippe A, Catar R, **Wagner P**, Dragun D. Transcriptional Regulation of Endothelial Cell Proliferation Induced by Simultaneous Antibody Targeting of AT1- and ETA Receptors. ASN Kidney week 2013, 05.11.-10.11 2013, Atlanta, USA

### Poster

R. Catar, T. Kreczmar, M. Naether, A. Philippe, **P. Wagner**, F.C. Luft , G. Riemekasten, D. Dragun. Synergy of agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1 receptors increases sensitivity to natural ligands. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 26.-29.09.2009, Göttingen, Germany

Catar R, Kretzschmar T, Naether M, Philippe A, **Wagner P**, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D. Agonistic Autoantibodies Targeting ETA- and AT1 Receptors Act Synergistically in Systemic Sclerosis Patients. Renal Week 2009: American Society of Nephrology (ASN) 2009 Annual Meeting, 27.10.-01.11. 2009, San Diego, California, USA

Hegner B, Catar R, Essin K, Kusch A, Näther M, **Wagner P**, Sezer O, Gollasch M, Riemekasten G, Dragun D. Growth factor dependent regulation of mesenchymal stem cell differentiation in

vasculopathy and fibrosis. European Renal Association / European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA). 2. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 25.-28.06.2010, München, Germany

Hegner B, Catar R, Nather M, **Wagner P**, Essin K, Lange C, Gollasch M, Kusch A, Dragun D. Growth Factor Microenvironment Is Decisive for Mesenchymal Stem Cell Regenerative Capacity and Determines Vascular Smooth Muscle Cell or Fibroblastic Differentiation. American Transplant Congress, 30.04-04.05.2011, Philadelphia, PA, USA

Witowski J, Catar R, **Wagner P**, Dragun D, Jörres A. TGF- $\beta$ 1 stimulates VEGF expression in peritoneal mesothelial cells by activating c-Fos transcription factor. 14th Congress of the International Society of Peritoneal Dialysis - ISPD 2012, 09.-12.09.2012, Kuala Lumpur, Malaysia

## **Danksagung**

Mein ausgesprochener Dank gilt Frau Professor Dr. Duska Dragun für die Themenvergabe, ihre Unterstützung und ihr Vertrauen in mich während meines gesamten Studiums und meinem Betreuer Herrn Dr. Rusan Catar für seine ausgezeichnete Supervision, Hilfsbereitschaft, Warmherzigkeit und Geduld.

Tausend Dank an Dr. Angelika Kusch für das Korrekturlesen meiner Arbeit!!

Ich möchte mich auch bei dem Laborteam, insbesondere Theres Schaub, Oskar Wischnewski und Björn Hegner, für viele schöne Jahre, lustige Momente und die gegenseitige Unterstützung bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner geliebten Familie, die immer an mich glaubt und mich zu jeder Zeit unterstützt hat sowie meinen besten Freunden Andrzej, Oskar und Franzi, die immer ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.