

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

DISSERTATION

**Dysregulation des mTOR Signalweges durch agonistische Antikörper gegen  
AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor führt zu Störungen der endothelialen Funktion**

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Oskar Wischnewski

aus Vilnius, Litauen

Datum der Promotion: 05.03.2021

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
Abbildungsverzeichnis.....	3
Zusammenfassung.....	4
Abstract.....	6
<b>1 Einführung.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Nierentransplantatabstoßung.....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Hyperakute und akute Abstoßung.....	7
1.1.2 Die chronische Abstoßung.....	7
<b>1.2 Obliterative Vaskulopathie.....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Manifestationen.....	8
1.2.2 Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie im Nierentransplantat.....	9
<b>1.3 AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>R-Autoantikörper in der Medizin.....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Angiotensin II Rezeptor I und Endothelin-1 Rezeptor A.....	10
1.3.2 Aufbau des Angiotensin II Rezeptors I und Signalweg der AT <sub>1</sub> R Autoantikörper.....	10
1.3.3 Aufbau des Endothelin-1 Rezeptor Typ A und der Signalweg der ET <sub>A</sub> R Autoantikörper.....	11
1.3.4 Agonistische AT <sub>1</sub> R und ET <sub>A</sub> R Autoantikörper bei Systemischer Sklerose.....	12
1.3.5 Agonistische AT <sub>1</sub> R Autoantikörper bei Präeklampsie.....	12
1.3.6 Agonistische AT <sub>1</sub> R und ET <sub>A</sub> R Autoantikörper bei der Organtransplantatabstoßung.....	13
<b>1.4 Das mTOR Netzwerk.....</b>	<b>13</b>
1.4.1 mTOR Complex 1.....	14
1.4.2 mTOR Complex 2.....	15
1.4.3 Interaktion von Ras- ERK 1/2 und mTOR Signalkaskaden.....	16
<b>1.5 Fragestellung.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Geräte und Materialien.....</b>	<b>19</b>
2.1 Geräte.....	19
2.2 Zellkultur und Verbrauchsmaterialien.....	20
2.3 Chemikalien.....	21
2.4 Stimulanzen und Inhibitoren.....	22
2.5 Molekularbiologische Produkte.....	23
2.6 Puffer und Lösungen.....	24
<b>3 Methoden.....</b>	<b>25</b>
3.1 Zellen.....	25

3.1.1	Kultivierung der Zellen.....	25
3.1.2	Lagerung der Zellen.....	26
3.2	<b>Gewinnung von Patienten und Kontroll-IgG.....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Patientengut .....	26
3.2.2	Die Isolation von IgG aus Serum oder Plasma .....	26
3.3	<b>SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....</b>	<b>27</b>
3.4	<b>Ausschluss von Mykoplasmen mittels PCR .....</b>	<b>28</b>
3.5	<b>Scratch Assay zur Bestimmung der endothelialen Wundheilung.....</b>	<b>29</b>
3.6	<b>Immunfluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>29</b>
3.7	<b>Statistik .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
4.1	<b>Stimulation des mTOR Komplex 1 durch natürliche Liganden des ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R.....</b>	<b>31</b>
4.2	<b>Abhängigkeit der mTORC1 Aktivität von der Konzentration der natürlichen Liganden .....</b>	<b>32</b>
4.3	<b>Stimulierung des ERK und mTOR Signalweges durch ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R aktivierende Autoantikörper (AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>/ ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>-IgG ) .....</b>	<b>33</b>
4.3.1	Vergleich der Stimulationsfähigkeit von mTORC1 und mTORC2 sowie ERK zwischen natürlichen Liganden und aktivierenden Autoantikörpern in HMEC1.....	33
4.3.2	Selektivität der mTOR und ERK Signalwegaktivierung durch ET <sub>A</sub> R <sup>+</sup> /AT <sub>1</sub> R <sup>+</sup> -IgG .....	34
4.4	<b>Die Aktivierung des mTOR-Signalweges durch AT<sub>1</sub> R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörper erfolgt unabhängig vom ERK 1/2.....</b>	<b>34</b>
4.5	<b>Langzeitstimulation des mTOR Signalweges durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG erhält das Phosphorylierungslevel der beiden mTOR Komplexe über 24 Stunden .....</b>	<b>35</b>
4.5.1	Langzeitinkubation mit Rapamycin inhibiert die Aktivität von mTORC 2.....	36
4.6	<b>Aktivierende Autoantikörper gegen ET<sub>A</sub>- und AT<sub>1</sub> Rezeptor führen zu Störungen der endothelialen Reparaturmechanismen .....</b>	<b>37</b>
4.6.1	Die Wirkung der Autoantikörper auf endotheliale Reparaturmechanismen erfolgt durch Überaktivierung des mTOR Signalweges, welche durch spezifische AT <sub>1</sub> - und ET <sub>A</sub> Rezeptorblocker verhindert werden kann .....	37
4.6.2	Die Hyperphosphorylierung von Akt <sup>Ser473</sup> ist hauptverantwortlich für die Dysregulation der Reparaturmechanismen des mikrovaskulären Endothelzellmonolayers.....	39
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>41</b>
5.1	<b>HMEC-1 als Zellmodell zur Untersuchung von Vaskulopathien .....</b>	<b>41</b>

<b>5.2</b>	<b>mTOR Dysfunktion durch AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R aktivierende Autoantikörper.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Störung der Wundheilung durch Antikörper gegen AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>51</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>57</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>58</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>59</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Ang II	Angiotensin II
AGC Kinasen	Gruppe von Serin-Threonin Kinasen, die nach den Proteinkinasen A, G und C benannt ist
AKT	Serin-Threonin Proteinkinase, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
AMR	Antibody-mediated rejection
AP-1	Aktivator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AT <sub>1</sub> R-Ak	AT <sub>1</sub> R-aktivierender Antikörper
AT <sub>1</sub> R	Angiotensin II Rezeptor Typ I
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Zellen Lymphom Protein 2
BSA	Bovines Serumalbumin
B2	Bradykinin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPTOR	DEP domain containing mTOR-interacting protein
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DTT	Dithiothreitol
DNS	Deoxyribonucleinsäure
EGF	Epidermaler Growth (Wachstums-) Faktor
ESRD	Endstage Renal Disease, engl. für Terminales Nierenversagen
ET <sub>A</sub> R	Endothelin-1 Typ A- Rezeptor
ETBR	Endothelin-1 type B Rezeptor
ET <sub>A</sub> R-Ak	ET <sub>A</sub> R aktivierender Antikörper
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK1/2	Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2
ET-1	Endothelin 1
FoxO	Transkriptionsfaktor Forkhead box O
FRET	fluorescence resonance energy transfer
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphatdehydrogenase
GPCR	G protein-coupled receptors
HMECs	Humane microvaskuläre Endothelzellen
HRPO	horse-radish peroxidase, engl. für Meerrettichperoxidase
HLA	humanes Leukozytenantigen
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-8	Interleukin-8
Kon-IgG	Kontroll-IgG von gesunden Spendern
M	molar
Min	Minute
mm	Millimeter

mL	Milliliter
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
mRNS	Messenger RNS
mSin1	mammalian stress-activate map kinase-interacting protein1
mTOR	mechanistic target of rapamycin
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
μg	Mikrogramm
nM	Nanomolar
kDa	Kilodalton
NF-κB	Nuclear factor-κB
p	phospho
PAH	pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction, engl. Polymerasekettenreaktion
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIKK	Phosphoinositol-3-Kinase verwandte Kinase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PRAS40	Proline rich AKT substrate 40 kDa
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosterone System
Raptor	Regulatory-associated protein of mTOR
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
RPM	Revolutions (Umdrehungen) pro Minute
RNS	Ribonucleinsäure
SSc	Systemische Sklerose
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TSC1/2	Tuberous Sclerosis Complex 1/2
TGFβ1	tissue growth factor β gene 1
TBST	Tris-Buffered Saline (Natrium) Tween
VSMC	Vascular smooth muscle cells
VEGF	Vascular endothelial growth factor

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Histologische Bilder der obliterativen Vaskulopathie .....	9
Abbildung 1.2 Kanonischer Signalweg von AT <sub>1</sub> R Autoantikörpern über den AT <sub>1</sub> -Rezeptor .....	11
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung mTOR-Netzwerk.....	17
Abbildung 4.1: Natürliche Liganden des AT <sub>1</sub> R und ET <sub>A</sub> R führen zur mTORC1- Aktivierung .....	31
Abbildung 4.2: Konzentrationsabhängige Stimulation von mTORC1 durch natürliche Liganden.....	32
Abbildung 4.3: Stimulation von ERK und mTOR durch Antikörper.....	33
Abbildung 4.4 Rezeptorspezifität der ERK und mTOR Aktivierung durch ET <sub>A</sub> R <sup>+</sup> /AT <sub>1</sub> R <sup>+</sup> - IgG .....	34
Abbildung 4.5 ERK-unabhängige mTOR-Aktivierung Aktivierung von ET <sub>A</sub> R <sup>+</sup> /AT <sub>1</sub> R <sup>+</sup> IgG .....	35
Abbildung 4.6 anhaltende Hemmung der mTOR Aktivierung durch Rezeptorblocker bei Langzeitstimulation mit ET <sub>A</sub> R <sup>+</sup> /AT <sub>1</sub> R <sup>+</sup> - IgG .....	36
Abbildung 4.7 mTORC2-Inhibition durch Rapamycin.....	37
Abbildung 4.8 Störung der endothelialen Reperaturmechanismen .....	39
Abbildung 4.9 TORC2 Überaktivierung durch ET <sub>A</sub> R <sup>+</sup> /AT <sub>1</sub> R <sup>+</sup> - IgG und dessen Einfluss auf die Wundheilung .....	40

## Zusammenfassung

Die Verhinderung der chronischen Nierentransplantatabstoßung ist eine große Herausforderung der Transplantationsmedizin unserer Zeit. Trotz intensivster Bemühungen ist weder im Verständnis der Pathophysiologie noch in der Behandlung der entscheidende Durchbruch gelungen. Pathognomonisch für die chronische Abstoßung ist die obliterative Vaskulopathie, welche außerdem bei Autoimmunkrankheiten wie der Präeklampsie, der systemischen Sklerose oder dem Antiphospholipidantikörpersyndrom vorkommt. Aktivierende Autoantikörper gegen Angiotensin II Rezeptor 1 (AT<sub>1</sub>R) und Endothelin-1 Rezeptor A (ET<sub>A</sub>R) könnten hier ursächlich an der Pathogenese beteiligt sein. Ein wesentliches Signalprotein, durch welches die Antikörper zu einer Vaskulopathie beitragen, ist das mechanistische Ziel von Rapamycin mTOR. mTOR ist ein essentieller Integrator von Energiereserven und Wachstumssignalen der Zelle und vermittelt durch seine Komplexe 1 und 2 Zellproliferation und- überleben, sowie Organisation des Aktin-Apparats für die Polarisierung der Zelle und damit für Migration und Chemotaxis. Dies sind unabdingbare Prozesse für die Wundheilung und endotheliale Funktion. Eine Verbindung zwischen den Autoantikörpern und mTOR könnte der MEK/ERK Signalweg darstellen.

Das Ziel der Arbeit sollte es sein zu untersuchen, ob Autoantikörper gegen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R den mTOR Signalweg dysregulieren und damit zu einer Störung der Wundheilung beitragen.

Mikrovaskuläre Endothelzellen wurden mit IgG aus Patienten mit hohen Titern an Autoantikörpern gegen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R (AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>/ ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>-IgG) behandelt. Zur Beurteilung der Stimulation der entsprechenden AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R wurden spezifische Blocker eingesetzt. Kurzzeit-, sowie Langzeitstimulationen der Zellen mit AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>/ ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>-IgG führten zu einer im Vergleich zur Stimulierung mit natürlichen Liganden deutlich stärkeren mTOR-Antwort im Sinne einer mTOR-abhängigen Phosphorylierung der p70 S6 Kinase an Threonin<sup>389</sup> und des mTORC2 Ziels AKT an Ser<sup>473</sup>. Eine Blockade von ERK führte nicht zur Inhibierung dieser Reaktion, während der Einsatz eines PI3K Blockers die Aktivierung beider mTOR Komplexe reduzierte. In einem Scratch Assay konnte gezeigt werden, dass Zellen, welche mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG inkubiert worden waren, ihre Fähigkeit zur zielgerichteten Migration und Wundheilung verloren. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine deutlich verstärkte Phosphorylierung von Akt an Ser<sup>473</sup>. Dies konnte sowohl durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin, als auch durch den speziellen mTORC2-Inhibitor MK 2205 unterbunden werden. Die Ergebnisse zeigen klar eine Dysregulierung von mTOR durch die Autoantikörper und demonstrieren in vitro einige der möglichen pathophysiologischen Folgen des Autoantikörpereinflusses. Mit dieser Arbeit ergibt



sich eine Rationale für den Einsatz von AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptorblockern, sowie für mTOR Inhibitoren bei Patienten nach Nierentransplantation, bei denen Autoantikörper gegen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R nachgewiesen wurden.

## Abstract

The fight against chronic renal transplant rejection is one of the greatest current challenges in the transplant research community. Despite intensive efforts there is still no breakthrough in understanding the pathophysiology or effective treatment of chronic rejection. The pathological hallmark of chronic rejection is the obliterative vasculopathy, which appears not only in rejection of organ transplants but also in preeclampsia, systemic sclerosis and antiphospholipid syndrome. Autoantibodies against AT<sub>1</sub>R and ET<sub>A</sub>R might contribute to the pathogenesis of these diseases. The mechanistic target of Rapamycin (mTOR) is an essential integrator of energy reserve and growth signals within cells and is responsible through its complex mTORC1 for cell proliferation and survival. The mTOR complex 2 is responsible for the organisation of the actin cytoskeleton thereby regulating cell migration, chemotaxis, wound healing and endothelial functions. An important connection between mTOR and the autoantibodies could be the MEK/ERK signal pathway. The hypothesis of this study was that autoantibodies against AT<sub>1</sub>R and ET<sub>A</sub>R might cause a dysregulation of the mTOR signaling pathway resulting in impaired wound healing.

Microvascular endothelial cells were stimulated with sera from patients with high titers of AT<sub>1</sub>R and ET<sub>A</sub>R autoantibodies and the respective receptor blockers. Short- and long-time stimulation of the cells led to high phosphorylation of the mTORC1 target p70 S6 Kinase at threonine 389 and mTORC2 target AKT at serine 473. The blockage of ERK did not abolish these mTORC activations while the use of PI3K blockers lowered the phosphorylation levels of both, mTORC1 and mTORC2. Functionally, microvascular endothelial cells lost their wound healing ability in the presence of autoantibodies in a scratch assay. This was associated with hyperphosphorylation of AKT at Ser 473 as detected in immunofluorescent stainings. Use of the non-specific mTOR inhibitor Rapamycin and the mTORC2-specific inhibitor MK 2205 restored the impaired wound healing. These results clearly demonstrate the *in vitro* ability of AT<sub>1</sub>R / ET<sub>A</sub>R autoantibodies to dysregulate the mTOR pathway and its pathophysiological implications in impaired wound healing. This creates a rationale for the use of mTOR inhibitors in patients after kidney transplantation with high concentrations of AT<sub>1</sub>R and ET<sub>A</sub>R autoantibodies.

# **1 Einführung**

## **1.1 Nierentransplantatabstoßung**

### **1.1.1 Hyperakute und akute Abstoßung**

Per Definition ist die hyperakute Abstoßung eine Abstoßung, die innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation auftritt. Betroffen sind Empfänger, die bereits präformierte Antikörper gegen das Spenderorgan haben z.B. AB0, HLA oder andere Alloantikörper, die Komplement binden können und Antigene auf mikrovaskulären Endothelzellen des Spenderorgans erkennen. Es kommt zur Thrombenbildung und endothelialer Nekrose sowie lokaler Hyperkoagulation mit sofortiger Abstoßung des Organs. In aller Regel ist das Organ verloren, weil keine Therapie so schnell reagieren kann.

Eine akute antikörpervermittelte Abstoßung tritt meistens nach Tagen oder Wochen nach Nierentransplantation auf. Klinisch zeigt sich diese Reaktion vor allem mit rapidem Transplantatversagen aufgrund einer entzündlichen Reaktion. Bei dieser Art von Reaktion ist die Pathogenese eine mnestiche Reaktion von B-Gedächtniszellen, die nach Exposition gegenüber den Donorantigenen beginnen, Antikörper zu produzieren. In den meisten Fällen sollte es dazu eine frühere Exposition des Antigens gegeben haben, wie beispielsweise bei Schwangerschaft oder Transfusion. Diese Antikörper haben die Fähigkeit Komplement zu binden und haben in den allermeisten Fällen HLA I Antigene auf den Oberflächen des Endothels der peritubulären Kapillaren und des Glomerulums als Ziel.<sup>1</sup>

Das angegriffene und beschädigte Endothel sezerniert verschiedene Moleküle, wie den von Willebrand Faktor P-Selektin und Chemokine, sowie Interleukin 8. Diese sorgen für Thrombozytenaggregation und Leukozytenadherenz zu den Glomeruli und den peritubulären Kapillaren.<sup>4</sup> Letztlich werden C3a und C5a freigesetzt. Diese führen über die Komplementkaskade zur Aktivierung des Membranangriffskomplexes. Zusammen führt dies zur Endothelzellnekrose und Apoptose sowie Mikrothromben und Einblutungen. Eine rasche Diagnose und Behandlung können das Transplantat retten.

### **1.1.2 Die chronische Abstoßung**

Durch die gute Behandlung der akuten Abstoßung hat sich das Langzeitüberleben der Nierentransplantate seit der Einführung des Immunsuppressivums Cyclosporin und später

Tacrolimus deutlich verbessert. Allerdings stagniert das Langzeit Transplantatüberleben seit nunmehr fast zwei Jahrzehnten und stellt für die biomedizinische Forschung immer noch ein Problem dar.<sup>2</sup>

Die chronische Abstoßung ist eine fortgesetzte langsame Zerstörung des Transplantats durch verschiedene, noch nicht vollständig verstandene Mechanismen. Beispiele wären eine unzureichende Immunsuppression meistens bei ausgeschöpfter Dosis des Immunsuppressivums oder die Unfähigkeit der zur Verfügung stehenden Mittel die T- Gedächtniszellen in ihren Nischen zu treffen. Die Abstoßung zeigt sich durch eine progressiv abnehmende Transplantatfunktion und persistierende Infiltration von Zellen und Makrophagen in das Interstitium.

Bei der chronischen antikörpervermittelten Abstoßung binden neu gebildete Antikörper oder vorher gebildete donorspezifische Antikörper an das kapilläre Endothel und führen zu zellulärer Hypertrophie, sowie Expansion und Duplikation der glomerulären Basalmembran. Diese Vorgänge werden als Transplantatglomerulopathie beschrieben.<sup>3</sup>

Weitere Risikofaktoren für eine chronische antikörpervermittelte Abstoßung sind frühere Episoden akuter Abstoßung, Entwicklung von donorspezifischen Antikörpern und Unterschiede in der HLA Kodierung zwischen Spender und Empfänger.

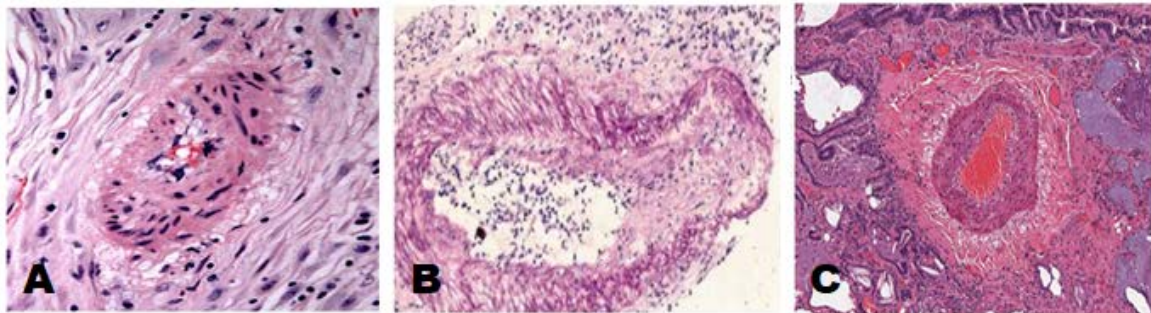
Bemerkenswert ist, dass es häufig auch zur Hyperplasie der Blutgefäße mit Formen einer Neointima, fokaler Zerstörung der Lamina elastica interna und letztlich vaskulärer Okklusion kommt. Diese Pathologien werden als obliterative Vaskulopathie zusammengefasst.<sup>4</sup>

## **1.2 Obliterative Vaskulopathie**

### **1.2.1 Manifestationen**

Die obliterative Vaskulopathie ist eine pathologische Läsion im Gefäßsystem des Menschen. Diese manifestiert sich nicht nur bei Organabstoßungen in Niere, Herz<sup>5</sup> und Leber<sup>6</sup>, sondern zeigt sich auch bei Autoimmunkrankheiten wie der Systemischen Sklerose, einer Bindegewebserkrankung mit Fibrose der Haut und Inneren Organe. Auch in der Präeklampsie, einer hypertensiven Gestationserkrankung, kann diese Vaskulopathie nachgewiesen werden.<sup>7</sup> (Abb.1.1) Als weiteres Beispiel findet sich dieses histologische Bild in Nierengefäßläsionen des Antiphospholipidsyndroms, einer Autoimmunerkrankung, bei der Antiphospholipidantikörper

gegen Antigene reagieren, die auf Zellmembranen an anionische Phospholipide gebunden sind.<sup>8</sup> Während in der Transplantatglomerulopathie und im Antiphospholipidsyndrom die Arterien und Arteriolen betroffen sind, zeigen sich bei der Systemischen Sklerose vor allem kleine Arterien und Kapillaren betroffen. Bei der Präeklampsie sind es die maternalen Arterien in der Dezipua, die dieses pathologische Bild aufweisen. Gemeinsam kommt es bei allen zuvor genannten Erkrankungen am Ende zur Okklusion des Gefäßes und damit Mangelversorgung des Gewebes mit nachfolgendem Gewebeschaden.



**Abbildung 1.1 Histologische Bilder der obliterativen Vaskulopathie**

Obliterative Vaskulopathie (Hämatoxylin-Eosin-Färbungen) in A) Plazenta<sup>7</sup> B) Nierentransplantat Reproduced with Permission<sup>(9)</sup> Copyright Massachusetts Medical Society<sup>9</sup> C) Lunge bei Sklerodermie<sup>10</sup>

### 1.2.2 Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie im Nierentransplantat

Die Pathogenese der obliterativen Vaskulopathie bei chronischem Transplantatversagen ist vielschichtig und nicht vollständig verstanden. Eine Verletzung des mikrovaskulären Endothels des Spenders durch das Immunsystem des Empfängers scheint der erste Schritt zu sein. Der Schaden am Endothel führt zur Aktivierung und zur Störung der endothelialen Hämostase. In der Media kommt es zu Ödemen, Degeneration und Nekrose der Myozyten. Auch in der Adventitia kommt es zu Nekrosen und Zelluntergang. Die Endstrecke dieses entzündlichen Prozesses ist die entzündliche Obliteration des Gefäßes. Der Prozess bedarf der Überlappung der zellulären und humoralen Immunantwort.<sup>11</sup>

Eine klare übergreifende Erklärung für die Entstehung dieses pathologischen Korrelats für verschiedene Erkrankungen des Immunsystems gibt es nicht. Ein bisher übersehener Zusammenhang ist aber der Nachweis von AT<sub>1</sub>-Rezeptor Autoantikörper bei Präeklampsie, Abstoßung ohne Nachweis von HLA Antikörpern und der systemischen Sklerose.<sup>9</sup>

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass möglicherweise Autoantikörper gegen den Endothelin-1 Rezeptor A eine Rolle in der Pathologie dieser Vaskulopathien spielen.<sup>12</sup> Die Entschlüsselung des

gemeinsamen Mechanismus der Obliterativen Vaskulopathie sollte der Schlüssel sein, auch die Transplantatvaskulopathie besser zu verstehen und zu bekämpfen.

## **1.3 AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>R-Autoantikörper in der Medizin**

### **1.3.1 Angiotensin II Rezeptor I und Endothelin-1 Rezeptor A**

Um die Rolle der Autoantikörper zu verstehen, gilt es zuerst die Rezeptoren und deren Signaltransduktion zu verstehen. Der Angiotensin II Rezeptor Typ I (AT<sub>1</sub>R) und Endothelin-1 Typ A- Rezeptor (ET<sub>A</sub>R) gehören beide zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR, engl. G-Protein coupled receptors). Diese Proteine bestehen aus sieben transmembranären alpha helikalen Regionen und binden eine Vielzahl von Liganden, deren Signale ins Innere der Zelle weitergegeben werden.<sup>13</sup>

### **1.3.2 Aufbau des Angiotensin II Rezeptors I und Signalweg der AT<sub>1</sub>R Autoantikörper**

Angiotensin II, der Ligand des AT<sub>1</sub>R, ist ein Peptid des Renin Angiotensin Systems, mit der Hauptfunktion der Vasokonstriktion. Es hat aber auch noch andere endokrine Funktionen und ist beteiligt an vaskulären Veränderungen im Alter. Die Fähigkeit von Angiotensin II, das Immunsystem zu modulieren, führt zur endothelialen Dysfunktion durch Entzündung bei endothelialer Aktivierung.<sup>14</sup> Dabei erfolgt die Signalweiterleitung in die Zelle hauptsächlich durch den AT<sub>1</sub>R, der fast ubiquitär im Körper exprimiert wird, besonders im kardiovaskulären System, die Niere eingeschlossen. Der Angiotensin II Rezeptor Typ II ist dagegen in adulten Geweben wenig exprimiert und scheint die Signale des AT<sub>1</sub>R negativ zu beeinflussen.<sup>15</sup>

Der AT<sub>1</sub>R besteht aus 359 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41 kDa. Strukturell ist er aufgebaut aus einem extrazellulären NH-Terminus mit sieben alpha-helikalen Transmembrandomänen, die mit drei extrazellulären und drei intrazellulären Loops miteinander verbunden sind. Es gibt zwei Disulfidbrücken.

Der kanonische Weg der Signaltransduktion von AT<sub>1</sub>R Autoantikörpern in der Nierentransplantationsabstoßung wurde von Dragun et al. etabliert.<sup>9</sup> Durch die Bindung des Autoantikörpers an die zweite Transmembrandomäne des Rezeptors wird dieser aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung und Aktivierung der zellulär regulierten Kinase 1 und 2 (ERK 1/2).

Durch ERK Phosphorylierung translozieren die Transkriptionsfaktoren Nuclear Factor kappa B (NFκB) und Activator Protein 1 (AP1) mit Erhöhung ihrer DNA-Bindungsfähigkeit in die Zelle. Unter anderem erhöhen die Faktoren die Transkription von Tissue Faktor (TF), der prothrombotisch wirkt.<sup>16</sup> (Abb. 1.2)

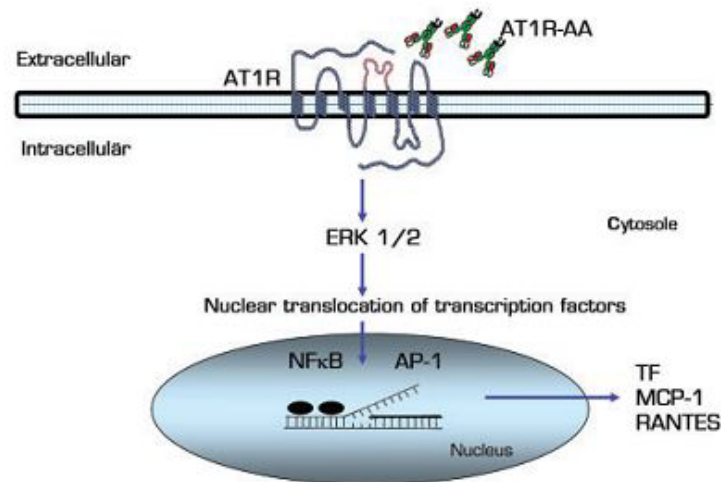


Abbildung 1.2 Kanonischer Signalweg von AT<sub>1</sub>R Autoantikörpern über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor

Der kanonische Signalweg der AT<sub>1</sub>R Autoantikörper über den AT<sub>1</sub>-Rezeptor Reproduced with permission from (9) Copyright Massachusetts Medical Society)

### 1.3.3 Aufbau des Endothelin-1 Rezeptor Typ A und der Signalweg der ET<sub>A</sub>R Autoantikörper

Endothelin-1 bindet wie Angiotensin II an zwei verschiedene GPCRs und zwar Endothelin-1 Typ A und Endothelin-1 Typ B – Rezeptor (ET<sub>A</sub>R und ET<sub>B</sub>R). Endothelin ist ein potenter Vasokonstriktor und trägt zur Pathogenese der Hypertension, erhöhter arterieller Steifigkeit, sowie Inflammation und oxidativem Stress bei und scheint damit vaskuläre Dysfunktion zu begünstigen.<sup>17</sup> Diese Wirkung scheint Endothelin-1 durch den ET<sub>A</sub>R zu erzeugen, während ET<sub>B</sub>R entgegengesetzt zu agieren scheint.<sup>18</sup> Der ET<sub>A</sub>R ist in vielen Gewebe inklusive Endothelzellen exprimiert, während der ET<sub>B</sub>R zumeist im Gehirn zu finden ist. Er wird aber auch gemeinsam mit dem ET<sub>A</sub>R in verschiedenen Geweben, vor allem Herz, Lunge und Niere exprimiert.<sup>18</sup> Eine Balance in der Signalwirkung beider Rezeptoren sorgt für einen normalen Gefäßtonus. Der humane ET<sub>A</sub>R enthält 427 Aminosäuren. Die Molekülmasse beträgt etwa 50 kDa. Vergleichbar mit dem AT<sub>1</sub>R hat der ET<sub>A</sub>R sieben Transmembrandomänen, drei extrazelluläre und drei intrazellulären Loops. Es gibt eine Disulfidbrücke in der dritten Transmembrandomäne.<sup>19</sup>

Die kanonische Signaltransduktion über den ET<sub>A</sub>R entspricht der des AT<sub>1</sub>R.<sup>20</sup>

### **1.3.4 Agonistische AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörper bei Systemischer Sklerose**

Vaskulopathie ist auch ein pathognomonisches Zeichen der Systemischen Sklerose (SSc). Riemekasten et. al. konnten beide Antikörper mit hoher Sensitivität und Spezifität im Serum von Patienten mit Systemischer Sklerose nachweisen. Der Schweregrad der Komplikationen korrelierte dabei mit dem Titer der Antikörper. In vitro konnte gezeigt werden, dass die gleichen endothelialen Mechanismen über ERK 1/2 greifen wie bei der Nierentransplantatabstoßung.<sup>20</sup> Auch eine Steigerung des Genprodukts von Transforming Growth Factor  $\beta$  sowie Hochregulierung von IL-8 und VCAM tragen zur Pathologie der SSc bei.<sup>21</sup>

Des Weiteren konnten die Antikörper bei Patienten mit SSc assoziierter pulmonal arterieller Hypertonie nachgewiesen werden.

### **1.3.5 Agonistische AT<sub>1</sub>R Autoantikörper bei Präeklampsie**

Präeklampsie ist eine Gestationskrankheit und manifestiert sich normalerweise in der 20. Schwangerschaftswoche mit schwerer Hypertension und Vaskulopathie. Die Genese war völlig unklar bis Wallukat et. al. nachweisen konnten, dass das Serum von präeklampsischen Schwangeren in einem Assay von schlagenden Rattenkardiomyozyten diese mit einer höheren Frequenz zum Schlagen bringen konnte als das Serum von gesunden Kontrollprobanden. Eine Blockade des zweiten extrazellulären Loops des AT<sub>1</sub>R konnte diesen Effekt aufheben.<sup>12</sup> AT<sub>1</sub>R Autoantikörper zeigten sich auch prädiktiv für Präeklampsie. In schwangeren Ratten führte die passive Infusion von AT<sub>1</sub>R Autoantikörper zu einem deutlichen Blutdruckanstieg gegenüber IgG von gesunden Kontrollpersonen (Kon-IgG).<sup>22</sup> Anscheinend bewirken die Autoantikörper auch eine erhöhte Plättchenaggregation und damit Thrombosierungen in vitro.<sup>23</sup> Eine weitere Arbeit zeigt, dass durch eine Aktivierung der NADPH Oxidase die Autoantikörper für die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in vitro verantwortlich sind und somit eine vaskuläre Inflammation deutlich begünstigen können.<sup>24</sup>



### **1.3.6 Agonistische AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörper bei der Organtransplantatabstoßung**

Dragun et al.<sup>9</sup> beschrieb erstmals funktionelle Autoantikörper in Verbindung mit der Abstoßung eines Nierentransplantats. Die Gruppe konnte zeigen, dass Klasse IgG1 und IgG3, die an die dritte Transmembrandomäne des AT<sub>1</sub>R in Endothelzellen und glatten Muskelzellen banden, ERK 1/2 aktivierten und dadurch die Kerntranslokation und DNS-Bindung von NF- $\kappa$ B und AP-1 induzierten. Die Infusion von AT<sub>1</sub>R Autoantikörper in Ratten führte zur Ausbildung einer Vaskulopathie. Der Einsatz von Losartan, einem spezifischen AT<sub>1</sub>R Blocker, inhibierte den Antikörpereffekt in vitro und in vivo. Es gibt aktuell eine Fülle von klinischen Daten, die den Nachweis von AT<sub>1</sub>R Autoantikörpern als unabhängigen Risikofaktor für akute und chronische Abstoßung unterstützen.<sup>25</sup> In Kindern mit Nachweis eines AT<sub>1</sub>R Autoantikörpers mit oder ohne Abstoßung zeigte sich ein signifikanter Abfall der GFR, der zwei Jahre nach Transplantation weiterhin vorhanden war.<sup>26</sup>

Auch ET<sub>A</sub>R Autoantikörper sind mit einem Transplantatfunktionsverlust im ersten Jahr nach Nierentransplantation assoziiert.<sup>27</sup>

Bei der Herztransplantation zeigten sich beide Autoantikörper assoziiert mit höheren Anteilen zellulärer sowie humoraler Rejektion kombiniert mit früherem Auftreten einer Mikrovasculopathie.

Auch bei der Multiviszeraltransplantation ist das Vorhandensein beider Antikörper ein Risikofaktor insbesondere für eine humorale Rejektion.<sup>28</sup>

Bei der Lebertransplantation sind beide Antikörper mit einem größeren Abstoßungs- sowie Fibrose-Risiko assoziiert.<sup>29</sup>

Letztlich gibt es auch Hinweise, dass beide Autoantikörper das Risiko einer Abstoßung nach Lungentransplantation erhöhen.<sup>30</sup>

## **1.4 Das mTOR Netzwerk**

Das Signalnetzwerk von „mechanistic target of rapamycin“ (mTOR) ist eines der wichtigsten und zentralen Signaltransduktionsnetzwerke jeder Zelle. Hier werden Signale bezüglich Nährstoffe, dem Sauerstoffgehalt der Umgebung und dem aktuellen hormonellen Status des Gewebes integriert und damit die Zellproliferation, -überleben und -migration reguliert. (Abb. 1.3) TOR ist

eine Serin/Threonin Kinase, die zur Familie der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)- verwandten Protein Kinasen (PIKK) gehört. mTOR bildet zwei strukturell unterschiedliche Komplexe, mTORC1 und mTORC2. Kennzeichnend für mTORC1 ist das Protein Raptor, während mTORC2 durch die Assoziation mit dem Protein Rictor entsteht.<sup>31</sup> Der Name Rapamycin kommt von einem Inhibitor der beiden Komplexe (viel sensitiver zu mTORC1 als mTORC2), der auf der Osterinsel Rapa Nui entdeckt wurde.<sup>32</sup>

### 1.4.1 mTOR Complex 1

mTORC1 reguliert energieaufwändige Prozesse in der Zelle und wirkt bei Aktivierung fördernd auf Proteinsynthese, Proliferation sowie Lipogenese und inhibiert die Autophagie, einen zellulären Recyclingprozess.

Für die kanonische Aktivierung von mTORC1 muss zu allererst Energie vorhanden sein. Diese liegt in der Zelle in Form von ATP und GTP vor. Wenn zu viel Energie verbraucht wurde, phosphoryliert die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) den tuberösen Sklerose Komplex (TSC) an Ser 1387 und verstärkt dessen Aktivität.<sup>33</sup> TSC ist in dieser komplizierten Kaskade dafür verantwortlich Rheb-GTP abzubauen, welches mTORC1 aktiviert.<sup>34</sup> Um mTOR mit Rheb-GTP an den Lysosomen zusammenzubringen bedarf es der Anwesenheit von Aminosäuren, die durch die Aktivierung der Rag- GTPase mTOR an die Lysosomen assoziieren.<sup>35</sup> Aktuell laufen Forschungen, wie einzelne Aminosäuren von der Zelle aufgespürt werden. Ein Beispiel für das sogenannte „sensing“ ist das Protein CASTOR (Cellular Arginine Sensor for mTORC1), welches Arginin bindet und dadurch mTOR ermöglicht, an Lysosomen anzudocken.<sup>36</sup> Um Zellwachstum anzuregen, aktivieren Wachstumsfaktoren über Tyrosinkinase-rezeptoren Akt. Akt wiederum phosphoryliert TSC und inaktiviert es, wodurch mTORC1 nun wieder aktiviert werden kann. Außerdem wird auch die PRAS40 vermittelte allosterische Blockade von mTOR unterbunden.<sup>37</sup> Als letzte wichtige Information wird der Zelle das Sauerstoffangebot über den Hypoxie-induzierten Faktor HIF1 zugetragen. Durch einen Mangel an Sauerstoff wird HIF1 stabilisiert und aktiviert die Transkription von REDD1, welches die Inaktivierung von TSC verhindert.<sup>38</sup>

Die bedeutendsten Substrate von mTORC1 sind die p70-S6 Kinase 1 (p70-S6K1) und das eIF-4E Bindeprotein 1 (4E-BP1). Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die Proteintranslation zu initiieren und voranzutreiben.<sup>39</sup>

4E-BP1 bindet eiF-4E und inaktiviert es damit. Durch mTORC1 bedingte Phosphorylierung wird eiF-4E freigegeben und kann eiF4G an das 5' Ende der mRNA rekrutieren und somit die Translation einleiten.<sup>40</sup> Die p70-S6 Kinase phosphoryliert hingegen Initiierungs- und Elongationsfaktoren, so wie das ribosomale Protein S6<sup>41</sup> das zur Induktion der Proteinsynthese am Ribosom führt.<sup>42</sup>

### 1.4.2 mTOR Complex 2

Während die Regulation von mTORC1 gut untersucht ist, ist vieles von der natürlichen Regulation von mTORC2 noch unbekannt. Entgegen der gut untersuchten Faktoren, die mTORC1 beeinflussen, zeigt sich bei mTORC2 eine Abhängigkeit von Insulin, Wachstumsfaktoren und Nährstoffen.<sup>43</sup> mTORC2 besitzt die Fähigkeit, auf verschiedene Signale differenziert zu reagieren, indem es Akt und oder SGK (Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase) sowie Proteinkinase C reguliert. Die genauen Signalwege sind bislang noch ungeklärt. Depror vermag mTORC2 zu hemmen, kann aber auch mTORC1 negativ regulieren.<sup>44</sup> Auch der Inhibitor des nuklearen Faktors  $\kappa$ -B, engl. „Inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ -B kinase (IKK)“, scheint eine positive Wirkung auf den Aktivierungsgrad von mTORC2 zu haben.<sup>45</sup> mTORC2 reguliert die Organisation, sowie die Zellpolarisation des Aktin-Zytoskeletts und somit die räumlichen Aspekte des Zellwachstums.<sup>46</sup> Aber auch wichtige Fähigkeiten wie Migration und Chemotaxis werden erst ermöglicht durch die mTORC2 abhängige Kontrolle des Aktin-Zytoskeletts.<sup>47</sup> In diesen komplexen und noch nicht komplett aufgeklärten Prozessen nimmt mTORC2 eine essentielle Rolle ein.<sup>48</sup>

Diese Rolle kann es aber nur durch die Fähigkeit, die Aktivität der AGC-Kinase Familie zu kontrollieren, ausüben. Über 60 von 500 Kinasen im menschlichen Organismus gehören zu den AGC Kinasen.<sup>49</sup> Als Beispiele dieser Kinasefamilie seien vor allem SGK und PKC genannt.<sup>50</sup>

Die bekannteste der genannten Kinasen ist sicherlich Akt. Sie greift in den Energiestoffwechsel ein und spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des Zellüberlebens, Zellproliferation sowie der Zellmigration. Dabei integriert sie die verschiedenen Signale von Wachstumsfaktoren und Zytokinen nach deren Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren und Tyrosinkinase-abhängigen Rezeptoren.<sup>51</sup>

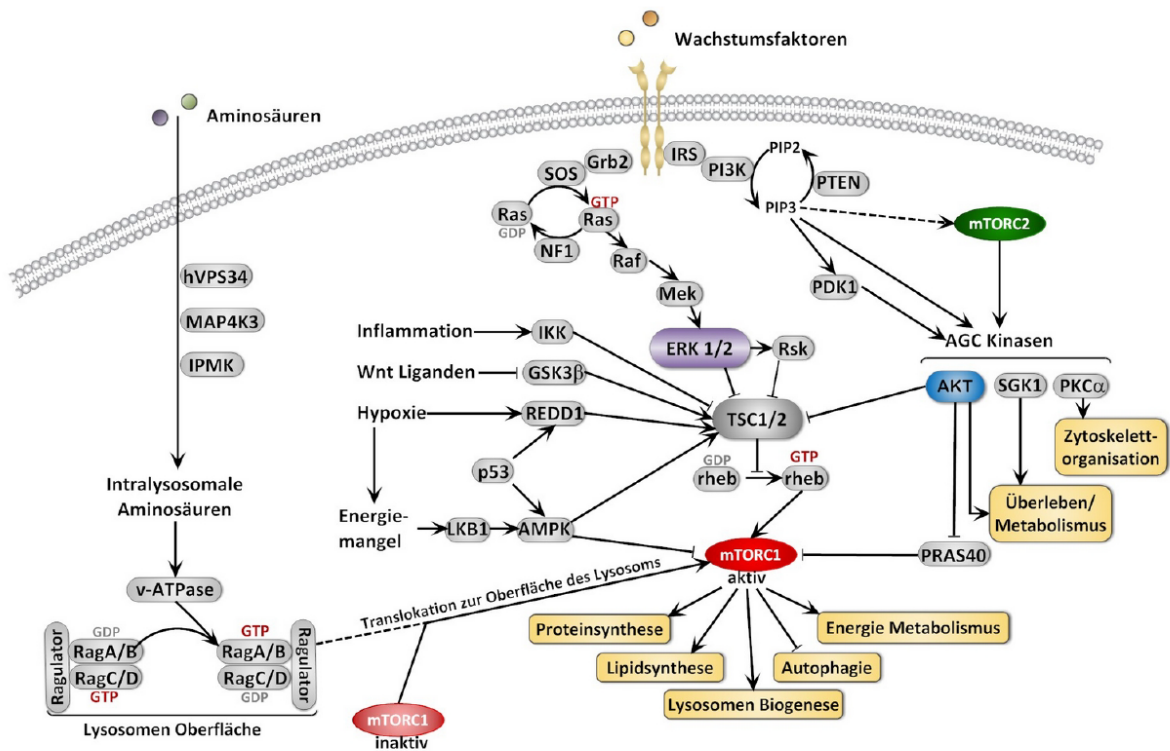
Sobald Akt durch die Bindung an Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat, welches von der PI3K phosphoryliert wurde, an die Plasmamembran gebunden hat, erfolgt eine zweistufige Phosphorylierung zunächst durch mTORC2 an Serin 473, dann durch PDK1 (Phosphoinositid-dependent kinase1) an Threonin 308. Das führt letztendlich zur vollständigen Aktivierung von Akt.<sup>43</sup> Beispiele für die anti-apoptotische Funktion von Akt sind die Phosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors FOXO1/3, einem anti-apoptotischen Faktors<sup>52</sup>, sowie die Regulierung des anti-apoptotischen Faktors BCL-2.<sup>53</sup>

### 1.4.3 Interaktion von Ras- ERK 1/2 und mTOR Signalkaskaden

Eine Verbindung zwischen den Rezeptorautoantikörpern und mTOR könnte die Ras-ERK Achse darstellen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass ET<sub>A</sub>R+ /AT<sub>1</sub>R+- IgG ERK (extracellular signal-regulated kinase) aktivieren können und somit ein Schlüsselweg für die Pathologie verschiedener rezeptorautoantikörperabhängiger Erkrankungen darstellen könnte.<sup>9</sup>

ERK ist eine Mitogen-Aktivierte Proteinkinase (MAPK) und das wichtigste Ziel des Ras Onkoproteins. Diese wird durch eine Kaskade aktiviert beginnend durch Ras-GTPase, fortsetzend durch Raf, MEK, ERK. Aktiviert wird sie durch Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und Chemokine. Die vermittelnden Rezeptoren sind GPCR und Tyrosinkinaserzeptoren,<sup>54</sup> welche sich in einer komplizierten Kaskade auf mehreren Ebenen je nach Stimulanz differenziert inhibieren und potenzieren.<sup>55</sup> Es gibt einen extensiven Crosstalk (Wechselwirkung) zwischen dem ERK und dem mTOR Signalweg. Beispielsweise scheint die Blockade von mTORC1 in Krebszellen den ERK Signalweg zu aktivieren.<sup>56</sup> Es konnte aber auch gezeigt werden, dass ERK Raptor an Serin 8, 696, 863 phosphoryliert und damit zu einer höheren mTORC1-Aktivität führt.<sup>57</sup>

ERK kann genau wie Akt für eine Inhibierung von TSC2 sorgen. Die Kinasen phosphorylieren das Protein und blocken damit seine Fähigkeit, mTOR zu inhibieren.<sup>58</sup>



**Abbildung 1.3 Schematische Darstellung mTOR-Netzwerk**  
 Schematische Darstellung des mTOR Netzwerks (open access)<sup>59</sup>

## 1.5 Fragestellung

Während die Kurzzeitüberlebensraten von Nierentransplantaten hervorragend sind und multiple Möglichkeiten zur Verfügung stehen, eine akute Abstoßung zu bekämpfen, steht noch kein probates Mittel zur Behandlung der chronischen Abstoßung zur Verfügung. Somit bleibt die Sicherung des Langzeitnierentransplantatüberlebens eine große Herausforderung der Transplantationsforschung. Ein besonderes pathologisches Merkmal der chronischen Abstoßung ist die obliterative Vaskulopathie. Diese Pathologie tritt auch in anderen immunvermittelten Krankheiten, wie der Präeklampsie oder der Systemischen Sklerose, sowie beim Antiphospholipidsyndrom auf. Fast alle dieser Krankheiten konnten bereits mit aktivierenden Autoantikörpern gegen den Angiotensin II Rezeptor 1 und den Endothelin-1 Rezeptor A in Zusammenhang gebracht werden. Da ein Teil der Patienten mit chronischer Nierentransplantatabstoßung hohe serologische Titer für AT<sub>1</sub>R und- ET<sub>A</sub>R Autoantikörper haben, ist es von besonderer klinischer Relevanz herauszufinden, inwieweit diese Autoantikörper an der Pathogenese der Vaskulopathie beteiligt sein könnten, welche intrazellulären Signaltrans-

duktionswege durch sie aktiviert werden und ob endogene Reparaturmechanismen dabei gestört werden. Aufgrund der Potenz des mTOR Signalweges, Wundheilung und Endothelialisierung zu regulieren, liegt eine Rolle dieses Signalweges in der Pathogenese der Vaskulopathie nahe. Der Crosstalk zwischen den MEK/ERK und den mTOR Signalkaskaden könnte dabei eine zusätzlich entscheidende Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher folgende konkrete Fragestellungen in einem Zellkulturmodell humaner mikrovaskulärer Endothelzellen (HMEC-1) untersucht:

1. Kommt es durch Stimulation der ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R durch deren natürliche Liganden zu einer Aktivierung des mTOR Signalweges?
2. Führen aus Patienten mit Transplantatabstoßung isolierte IgG's, die positiv getestet wurden auf ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R-Autoantikörper, zu einer Aktivierung des mTOR-Signalweges? Wie sieht dabei die zelluläre Signalkaskade aus?
3. Welchen Einfluss haben ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R-Autoantikörper auf endotheliale Reparaturmechanismen?

## 2 Geräte und Materialien

### 2.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Thermal Cycler PX2	Electron Corporation
Thermocycler	Thermo Scientific
Feinwaage	Ohaus Discovery DV 214 CM
Laborwaage	Sartorius Universal U 5000 D
Multiplattenphotometer	Thermo Scientific
Spectrophotometer	Peqlab
Röntgenfilmentwickler	Protec
Chemolumineszenz Imager	Syngene Bio Imaging
Fotokamera	Casio
Elektrophoresekammer Mini Protean 4Cell	BioRad
Elektrophoresekammer Mini Protean 2Cell	BioRad
Transferkammer, X Cell II Blot Module	Invitrogen
Transferkammer, Trans-blot cell	BioRad
RNS Elektrophorese	VWR
Heizrührer RH basic	IKA Labortechnik
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Magnetrührer Mini MR standard	IKA Labortechnik
Heizrührer MR 3001 K	Heidolph
Heizblock	Grant
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Wasserbad	Unitherm
Labormikroskop	Carl Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss
Vortexer	VWR
Vortexer	IKA Labortechnik
Wippschüttler	Heidolph
Schwenkschüttler	Heidolph
Taumelrollenmischer	Karl-Hecht

Power source 250 V, 300V	VWR
Power Supply 2.0 P System	BioRad
Einkanalpipetten 0,5 – 1000 µl	Eppendorf
Einkanalpipetten 0,5 – 1000 µl	Brand
Einkanalpipetten 10 – 5000 µl	Gilson
Mehrkanalpipette	Brand
Pipettierhilfe	Pipetus
pH-Meter	VWR
Messkolben 25 - 2000 ml	Brandt
Glasflaschen 50 - 2000 ml	Schott
Wasserfilteranlage	Millipore
Neubauer Zählkammer	Optik Labor
Sicherheitswerkbank	Hereaus
Inkubator	Thermo Scientific
Warmwasserbad	Unitherm
GalaxyMiniStar SN	VWR
Kuhlzentrifuge Mikro 200 R	Hettich
Multifuge 3SR Plus	Heraeus

## 2.2 Zellkultur und Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Firma</b>
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße (500 µl, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Clear Blue X-Ray Filme	Kodak
Protein G Sepharose Säulen	GE Healthcare
Cover Slips	TPP
Filterflaschen	Nalgene
PVDF Membranen	GE Healthcare
Glasflaschen (50, 100, 500 ml, 1000 ml, 2000 ml)	Schott



Aluminiumfolie	Carl Roth
Gefrierreaktionsgefäße 1 ml	Sarstedt
Parafilm	Pechiney
Pasteurpipetten (1 ml, 2ml, 5 ml, 10,25 ml)	Becton Dickinson
Konische Zentrifugenröhrchen (50 ml,15 ml)	Becton Dickinson
Dialyseschläuche	Carl Roth
Zellkulturflaschen 75 cm, 175 cm	Sarstedt
Zellkulturschalen 6 cm	TPP
Zellkulturschalen 6-Loch 3,5 cm	TPP
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	BD Falcon
Cryotubes	Sarstedt

## 2.3 Chemikalien

<b>Verbindung</b>	<b>Hersteller</b>
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich
Acrylamid 37,5:1	Carl Roth
Albumin Fraction V	Carl Roth
Bicin	Carl Roth
Bis-Tris	Appllichem
Chloroform	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Appllichem
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Ethansäure	Carl Roth
Ethanol absolut	Carl Roth
Ethanol vergällt (70%, 80%, 99%)	Herbeta
Glycerin	Carl Roth
Gelatine	Carl Roth
Glycin	Merck
β-Glycerophosphat	Merck
Isopropanol, 2-propanol	Carl Roth
Kaliumhydroxid	Merck

Kaliumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Magermilchpulver	Applichem
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Applichem
Natriumazid	Sigma Aldrich
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich
Natriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich
Natriumpyrophosphat	Sigma Aldrich
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich
Polysorbat 20 (Tween 20)	Carl Roth
Paraformaldehyd	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Salzsäure 37% rauchend	Carl Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Tris	Carl Roth
Tris-HCL	Carl Roth
Triton X 100	Sigma-aldrich
Ponceau Rot S	Carl Roth
Trypanblau	Applichem
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
Hydrocortison	Sigma Aldrich
Endothel Basal Medium	Lonza
Epidermal Growth Factor	Sigma Aldrich
L-Glutamin	Applichem
Fetales Kälber Serum	Gibco

## 2.4 Stimulanzen und Inhibitoren

Substanz	Hersteller
Humanes Angiotensin II	Sigma-Aldrich

Humanes Endothelin-1	Sigma-Aldrich
Valsartan	Novartis
Sitaxentan	Encyscive Pharma
Rapamycin	Sigma-Aldrich
PD184352	Sigma-Aldrich
LY294001	Sigma-Aldrich
MK 2205	Sigma-Aldrich

## 2.5 Molekularbiologische Produkte

Antikörper	kDa	Konzentration	Spezies	Firma	Verwendung
AKT	60	1:1000	Kaninchen	CST	Western Blot
$\alpha$ -Tubulin	53	1:6000	Maus	Sigma-Aldrich	Western Blot
ERK1/2, p44/42	42	1:1000	Kaninchen	CST	Western Blot
GAPDH	38	1:50 000	Maus	hytest	Western Blot
P70S6K	70	1:1000	Kaninchen	CST	Western Blot
Phospho-AKT S473	60	1:1000	Kaninchen	CST	Western Blot
phospho ERK1/2 T202/Thr204	46	1:1000	Kaninchen	CST	Western Blot
phospho-P70 T389	73	1:1000	Kaninchen	CST	Western Blot
pAKTS473	61	1:200	Maus	CST	Immunfluoreszenz
anti-Kaninchen HRPO konjugiert		1:10000	Esel	Dianova	Western Blot
Anti-Maus HRPO konjugiert		1:25000	Esel	Dianova	Western Blot
anti-Maus aus Ziege Alexa Fluor 488 konjugiert		1:1000	Ziege	Invitrogen	Immunfluoreszenz

## 2.6 Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Konzentration Bestandteile / Firma</b>
10 % Ammoniumpersulfatlösung	100 g auf 1 L ddH <sub>2</sub> O
Bicin Transfer-Puffer	Bicin 25 mM Bis-Tris 25 mM EDTA 1 mM ETOH 20 %
3,5x Gelpuffer	bis-Tris 1,25 M
5x Laemmli Puffer	Tris-HCl 250 mM DTT 500 mM Glycerin 30% SDS 5% Bromphenolblau 0,25 %
Blocklösung basierend auf Magermilchpulver	Magermilchpulver 5%
Membranblockierungslösung	BSA 1% 1x TBST
Marker für Elektrophorese	Applichem
MOPS-Puffer	MOPS 250mM Tris 250 mM EDTA 5mM SDS 0,5 %
1x Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,3	NaCl 137 mM KCl 2,7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,3 mM
20x Tris buffered saline (TBS) pH 8	Tris 50 mM NaCl 150 mM
1x Tris buffered saline Tween (TBST)	TBS, 0,1% Tween
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

## 3 Methoden

### 3.1 Zellen

Für die Experimente wurde die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie (HMEC-1) verwendet. Diese wurde aus 6 gepoolten männlichen Vorhäuten hergestellt und hat den Vorteil, dass sie endothelzelleigene Eigenschaften über mehrere Passagen stabil exprimiert. Insbesondere gilt das für die Expressionen des AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub> Rezeptors. Die Immortalisierung erfolgte mit der Transfektion des SV 40 Large T Antigen<sup>60</sup>.

#### 3.1.1 Kultivierung der Zellen

Die Endothelzellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> Begasung in 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Experimente konnte das Zellmaterial auf Gefäße verschiedener Größe ausgesetzt werden. Um die Adhäsivität der Zellen gegenüber den Zellkulturgefäßen zu erhöhen, wurden diese vor Zelleinsaat für mindestens 20 Minuten mit 0,2 % Gelatine beschichtet. Zur Passage der Zellen wurden sie nach einmaligem Waschen mit PBS für 4 Minuten bei 37°C mit Trypsin inkubiert. Es folgte im nächsten Schritt die Pelletierung des Zellmaterials in einer Zentrifuge bei 1200 RPM über 3 Minuten. Nach erfolgter Resuspension des Pellets im Medium wurden die Zellen auf die vorbereiteten 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Die Kultivierung der Zellen für diese Experimente erfolgte in 6 cm oder 3,5 cm Zellkulturschalen. Bis zu einer Konfluenz von 80% für die Signaltransduktionsexperimente und bis 90 % für die funktionellen Experimente wurden Zellen im Endothel Basal Medium mit 5 % FCS kultiviert. Danach erfolgte die Umsetzung auf ein Medium mit 0,5 % FCS für 16 Stunden, um den Zellmetabolismus zu verlangsamen und die Effekte des FCS während der Experimente zu minimieren. In den Experimenten wurden die Zellen mit verschiedenen Agenzien behandelt und für die benötigte Zeit im Brutschrank inkubiert. Neben den natürlichen Liganden des ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R in verschiedenen Dosierungen wurde ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG (2 mg/ml) zur Stimulation der Zellen verwendet. Als Inhibitor des AT<sub>1</sub>R wurde Valsartan mit einer Konzentration von 10µM eingesetzt. Sitaxentan 10µM wurde als Inhibitor des ET<sub>A</sub>R benutzt. Der Einsatz des mTORC1 affinen Inhibitors Rapamycin erfolgte mit einer Konzentration von 20 nM. Um in den PI3K/Akt Signalweg einzugreifen wurde ein PI3k Inhibitor LY 294001 (20µM) und der Akt Inhibitor MK2205 in einer Konzentration von 10nM. Die Blockierung des MEK/ERK Signalweges erfolgte mit 10 nM von PD184352, eines selektiven MEK Inhibitors.

### **3.1.2 Lagerung der Zellen**

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Dazu wurden die Zellen in Kultur trypsiniert und dann in Kryoröhrchen in 90% fetalem Kälberserum (FCS) und 10 % DMSO eingefroren. Es erfolgte eine allmähliche Abkühlung zunächst auf -80°C in Isopropanol in einem speziellen Gefrierbehälter. Nach spätestens einer Woche wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

## **3.2 Gewinnung von Patienten und Kontroll-IgG**

### **3.2.1 Patientengut**

Die Seren, aus denen die IgG-Fraktion isoliert werden sollte, stammten von vier Patienten mit Nierentransplantatabstoßung, bei denen eine AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub> -Antikörper-Konzentration von über 10 U/l mittels eines ELISA gemessen wurde (Ethikantragsnummer EA2/068/07). Es wurden keine Einschränkungen, das Alter oder das Geschlecht der Patienten betreffend, gemacht. Die Proben wurden vor der Isolation anonymisiert und kodiert. Kontroll-IgG (Kon-IgG) wurde von gesunden Probanden isoliert.

### **3.2.2 Die Isolation von IgG aus Serum oder Plasma**

Die Isolierung von Patienten- und Kon-IgG erfolgte mit HiTrap Protein G Sepharosesäulen von GE Healthcare. Protein G ist ein Oberflächenmolekül von Streptococci der Gruppe G. Es dient den Bakterien als Rezeptor der Fc-Region von Immunglobulinen der Gruppe G. Das rekombinante Protein G von GE Healthcare wird in E.coli produziert und enthält zwei IgG bindenden Regionen wobei die albuminbindende Region des natürlich vorkommenden Proteins gelöscht wurde, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Gebunden an Agarosebeads entwickelt das Protein G eine Bindungskapazität von 25 mg IgG pro ml Bindungsmedium. Es wurden Säulen von 5 ml Volumen benutzt.

Für die Isolierung wurden zwei Puffer angesetzt, die sich im pH unterscheiden. Der Bindungspuffer hat einen pH von 7 während der Elutionspuffer einen pH von 2 besass. Bei der Herstellung der Puffer war zu beachten, dass die Reinheit durch Filtrieren durch einen 0,45 µm Filter gesichert war. Die Proben, aus denen das IgG isoliert werden sollte, wurden mit dem Bindungspuffer 1:1 verdünnt. Es erfolgte die Equilibrierung der Säule mit 25 ml Bindungspuffer. Danach konnte das Probenmaterial auf die Säule gegeben werden. Dieser Schritt wurde mehrfach

wiederholt, um die Ausbeute an IgG zu erhöhen. Nach einer weiteren Equilibrierung der Säule mit Bindungspuffer, um nicht an Protein G gebundene Bestandteile zu entfernen, konnte das IgG eluiert werden. Es wurden 20 ml Puffer verwendet und das Eluat in vier Fraktionen eingeteilt. Die erste und letzte Fraktion wurde jeweils verworfen, da in diesen Fraktionen eine traditionell geringe IgG Konzentration vorherrscht. Die Fraktionen zwei und drei wurde gepoolt und anschließend für mehrere Tage dialysiert. Es erfolgte dann die Bestimmung der Konzentration des IgG im Zentrallabor des Virchowklinikums der Charité und die Messung der AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörpertiter in Luckenwalde mit dem patentierten Solid Phase ELISA der Firma Celltrend. Nach erneuter Equilibrierung der Säulen wurde sie mit 25 ml 20-prozentigen Ethanol gewaschen und dann bei 4 °C gelagert.

### **3.3 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot**

Die Zellen wurden, wie bereits beschrieben kultiviert und stimuliert. Zur Beendigung der experimentellen Behandlungen wurden die Zellen auf Eis gestellt und mehrmals mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden 65 µl TST-Puffer, dem Proteinase- und Phosphataseninhibitoren zugefügt worden waren, auf die Schalen gegeben. Die im Puffer enthaltenen Detergenzien sorgten für eine Permeabilisierung der Zellmembran zur Gewinnung von zytoplasmatischen Proteinen. Die Zellen wurden mechanisch mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturschale gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt, um anschließend bei 14.000 RPM und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert zu werden. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde anschließend abgenommen und in ein frisches Gefäß gegeben.

Für die gleichmäßige Auftragung der Proteinproben auf das Elektrophoresegel, musste die Konzentration der Proteine im Zelllysat bestimmt werden. Es wurden das kolometrische Dc Protein Assay von Bio Rad benutzt, das nach der modifizierten Lowry Methode funktioniert, welche auf der Reduktion von Folin durch die mit Kupfertartat reagierenden Proteine beruht. Es wurden 96-Loch Platten als Reaktionsgefäße verwendet. Für eine Standardreihe wurden BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen verwendet.

Das Zelllysat wurde mit Lämmli Puffer und 20 mM DTT versetzt um die Proteinsuspension zu beschweren und deren Disulfidbrücken zu lösen und anschließend zur Denaturierung für 10 Minuten bei 95 °C gekocht. Es wurden 20 µg Protein auf ein SDS-PAGE Gel von 1,5 mm Dicke und einen von der jeweils interessierenden Proteingröße abhängigen Acrylamidanteil von 8-12 %

aufgetragen. Proteingrößenmarker wurden verwendet, um die Position der zu untersuchenden Proteine auf dem Gel einschätzen zu können. Die Proben durchliefen zuerst ein Sammelgel von 5 % Acrylamid bei 80 Volt, damit sie zur gleichen Zeit in das Trenngel übergehen konnten, welches sie bei 150 V durchliefen. Nachdem die Proteine aufgetrennt wurden, erfolgte der Transfer vom Gel auf eine Polyvinylidenelektrolyt Membran bei 250 V für zwei Stunden im „wet transfer“ Verfahren. Optional wurden die Membranen nach dem Transfer mit Ponceau S angefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen. Im Anschluss daran wurden die Membranen mit einer 5-prozentigen Milchlösung für eine Stunde geblockt, um unspezifische Bindungen der darauffolgenden Antikörper zu unterbinden. Die unterschiedlichen Antikörper wurden in eine Mischung aus Milchlösung und BSA in Tween-haltigem Tris Puffer (TBST) über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen mit TBST gewaschen und mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte wieder ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBST. Die Visualisierung der Proteine geschah durch Chemoluminescence, die zur entsprechenden Schwärzung von Röntgenfilmen führte. Als Ladekontrolle wurden die Membranen mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -Tubulin inkubiert und entsprechenden monoklonalen anti-HRP-Antikörpern und Chemolumineszenz detektiert. Die Filme wurden eingescannt und die Banden anschließend densitometrisch mithilfe von ImageJ ausgewertet.

### **3.4 Ausschluss von Mykoplasmen mittels PCR**

Um die Kontamination der verwendeten Zellen mit Mykoplasmen, Bakterien ohne Zellwand, auszuschließen, wurde nach Anleitung des Herstellers in regelmäßigen Abständen eine PCR mit einem Mykoplasmen-Detektions-Kit von Applichem durchgeführt. Dabei wurde der Überstand von verwendeten Zellkulturen, der maximal 48 Stunden inkubiert wurde, zunächst bei 1500 RPM zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde dann 5 Minuten auf 99°C zur Bakteriolyse und Freiwerden der Mykoplasmen DNS erhitzt. Anschließend wurde aus dieser Lösung eine geringe Menge von Flüssigkeit entnommen und entsprechend der Herstellerangaben der PCR-Reaktion zugeführt. Die Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und ausgewertet. In der Regel wurden kontaminierte Zellen verworfen. In seltenen Fällen wurde das Antibiotikum Primocin zur Behandlung der Mykoplasmen benutzt.



### **3.5 Scratch Assay zur Bestimmung der endothelialen Wundheilung**

Die Beurteilung der endothelialen Wundheilung erfolgte mit einem Scratch Assay. Dabei wurden HMEC-1 in 3,5 cm<sup>2</sup> Zellschalen ausgesetzt und bis zu einer Konfluenz von ca. 90 % im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurde anschließend für 16 Stunden mit FCS reduzierten Medium stillgelegt. Anschließend wurde das Endothelzellmonolayer mit einer 200 µl Pipette mit Hilfe eines Lineals verletzt. Die Pipette wurde einmal längs und einmal quer mit wenig Kraft über den Schalenboden gezogen. Es entstand eine kreuzförmige Narbe in der Mitte der Zellschale. Um die abgelösten Zellen zu entfernen erfolgte erneut ein Mediumwechsel mit eventueller Zugabe von Blockern. Zu diesem Zeitpunkt entstand unter dem Mikroskop mit Kameraobjektiv das erste Bild des Narbenkreuzes. Nach einer weiteren Stunde wurde Serum von Patienten mit positiven Titern von AT<sub>1</sub> und ET<sub>A</sub> Rezeptorautoantikörpern hinzugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das zweite Bild aufgenommen. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der freien Analysesoftware TScratch. Diese arbeitet mit einem Algorithmus, welcher die Narbe in einem Endothelzellmonolayer erkennt und diese von der Gesamtfläche abzieht.<sup>61</sup> Es hat die Fähigkeit zwei erstellte Bilder miteinander zu vergleichen und die Differenz in der endothelialisierten Fläche in einem Excel Blatt in Prozent auszudrücken.

### **3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Um die Lokalisation und Anreicherung von Proteinen in Zellen oder im Zellverband darzustellen eignet sich besonders die Immunfluoreszenz. Zunächst wurden Coverslips (runde Glasplättchen) für 24 Stunden autoklaviert. Anschließend wurden sie in 3,5 cm Schalen ausgelegt und mit 0,2% Gelatine überzogen. Nach 20 Minuten erfolgte das Aussähen der Zellen in Vollmedium. Die weiteren Schritte des Experiments erfolgte wie beim Scratch Assay beschrieben. Es wurden drei Coverslips verwendet, die zusammen in der Schale ein Dreieck ergaben um ein Abrutschen beim Zufügen der Narbe zu verhindern und eine Kongruenz mit dem Scratch Assay zu erreichen. Die Stimulationslänge betrug auch hier 24 Stunden. Die Coverslips wurden zunächst mit 1x PBS 3x gewaschen bevor sie mit 4% Paraformaldehyd in 1x PBS für 10 min fixiert wurden. Danach wurden sie erneut gewaschen und anschließend durch eine dreiminütige Behandlung mit 0,5% Triton-X100 in 1xPBS permeabilisiert. Im Anschluss folgte das Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit 2% BSA für 4 Stunden. Als nächster und wichtigster Schritt erfolgte nach einem weiteren Waschschrift die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Coverslips erneut gewaschen bevor sie mit dem sekundären Alexa-Fluor konjugierten Antikörper (1:1000) für eine Stunde im Dunkeln inkubiert wurden. Dazu wurde zur

Anfärbung der DNS DAPI mit einer Konzentration von 1:1000 hinzugegeben. Schließlich wurden die Cover Slips mit Aquamount Medium auf einem Objektträger fixiert und mit dem Immunfluoreszenz Mikroskop bei einer 20-fachen Vergrößerung fotografiert.

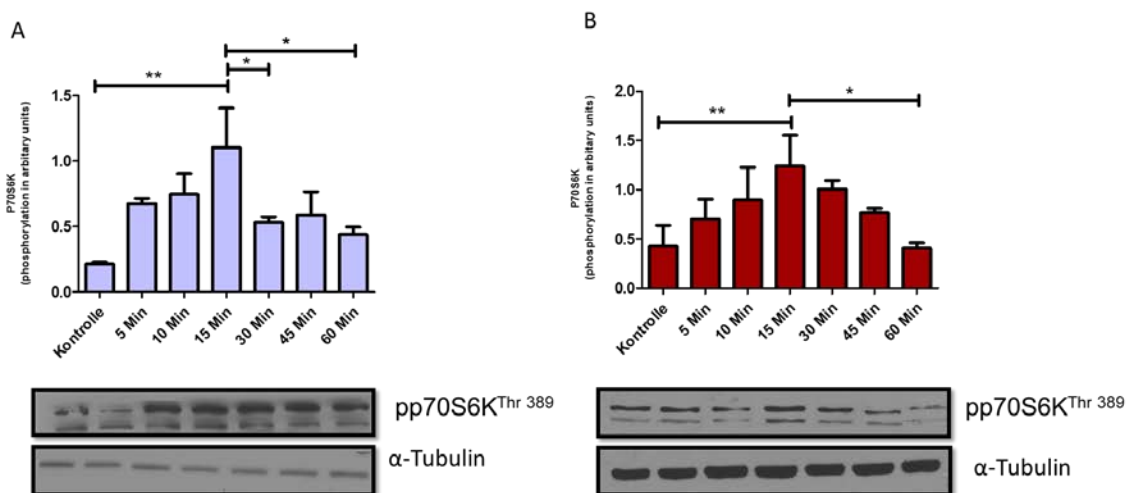
### **3.7 Statistik**

Die statistische Auswertung der Primärdaten erfolgte mit der Software Graphpad Prism. Um den Unterschied zwischen den Gruppen festzustellen wurde der Mann-Whitney Test angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei  $P < 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Stimulation des mTOR Komplex 1 durch natürliche Liganden des ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R

Um die Rolle der aktivierenden Autoantikörper gegen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R und deren Integration in den mTOR-Phosphorylierungsgrad zu verstehen, wurde zuerst die Rolle der natürlichen Liganden der beiden Rezeptoren untersucht. Um herauszufinden, ob eine Stimulation der HMEC-1 Zelllinie mit Angiotensin II und Endothelin-1 den Phosphorylierungsstatus von mTOR beeinflusst, wurden die Zellen mit den natürlichen Liganden der beiden Rezeptoren Angiotensin II (10 µM) und Endothelin-1 (100 nM) stimuliert. Die Zellen wurden von fünf Minuten bis zu einer Stunde stimuliert, um eine Zeitreihe des Phosphorylierungsgrades zu erstellen. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine für den Western Blot extrahiert. Es erfolgte die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern von p70 S6 Kinase an Thr<sup>389</sup>. Abb. 4.1. zeigt repräsentative Blots, sowie die densitometrische Auswertung von jeweils 4 unabhängigen Experimenten. Es zeigte sich eine signifikante Aktivierung des mTORC1 bei Stimulation mit den natürlichen Liganden bei 15 Minuten, wobei sich die Zeitreihen der beiden natürlichen Liganden unterschieden. Endothelin-1 führte nach der maximal erreichten Phosphorylierung nach 15 Minuten zu einer deutlichen Reduktion der Aktivierung von mTORC 1, welche nach 60 Minuten signifikant auf Kontrollniveau abfiel. Die mit Ang II stimulierten Zellen verhielten sich anders. Die mTORC1 Aktivität nahm nach einem Maximum bei 15 Minuten bereits bei 30 Minuten signifikant ab und blieb etwa auf diesem Niveau bis zum 60 min Zeitpunkt erhalten.

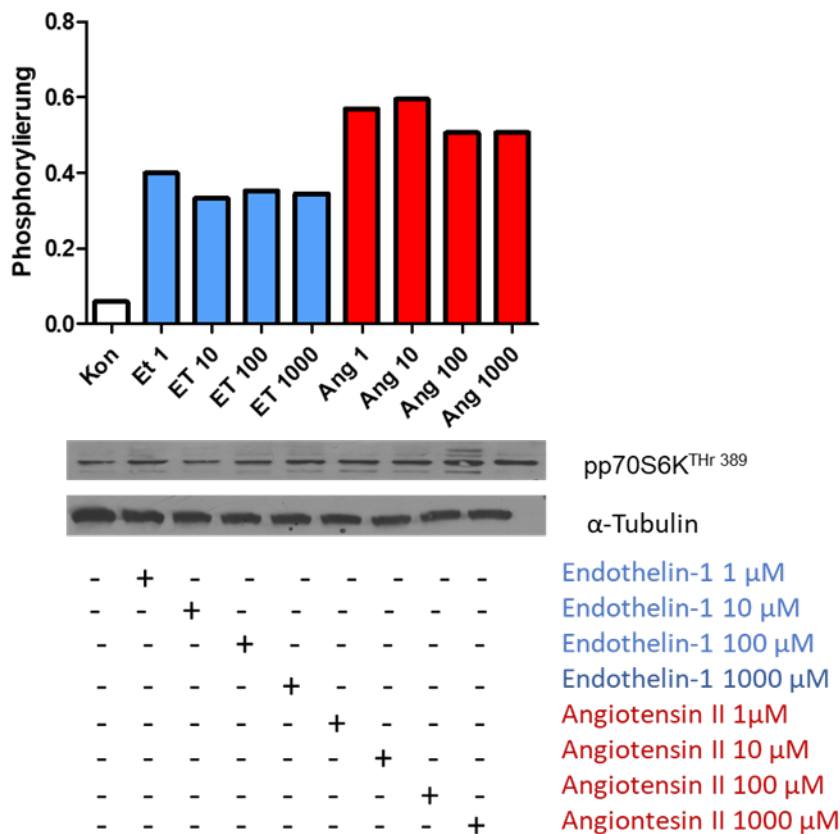


**Abbildung 4.1: Natürliche Liganden des AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R führen zur mTORC1-Aktivierung**

Als Nachweis für die Aktivierung von mTORC1 wurde die zeitabhängige Phosphorylierung von p70S6K<sup>Thr389</sup> in HMEC-1 nach Stimulation mit den natürlichen Liganden des AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R, (A) Angiotensin II (10 µM) und (B) Endothelin-1 (100 nM) bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Westernblots, sowie die densitometrische Analyse von jeweils 4 unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05)

## 4.2 Abhängigkeit der mTORC1 Aktivität von der Konzentration der natürlichen Liganden

Um zu verstehen, wie sich die mTORC1 Aktivität mit der Änderung der Konzentration der beiden natürlichen Liganden Angiotensin II und Endothelin-1, verhält, wurden HMEC-1 mit den natürlichen Liganden der beiden Rezeptoren Angiotensin II und Endothelin-1 in zunehmenden Konzentrationen bis 1000  $\mu\text{M}$  für 15 Minuten stimuliert. Die Zellen wurden lysiert, die Proteine für den Western Blot extrahiert und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Es erfolgte die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern von p70 S6 Kinase an Thr<sup>389</sup>. Abbildung 4.2 zeigt den Blot und dessen densitometrische Analyse des durchgeführten Experiments. Höhere Konzentrationen von Angiotensin II führten zu einer stärkeren Aktivierung von mTORC1 bis max. bei 1000  $\mu\text{M}$  Endothelin-1 hingegen erreichte die höchste mTORC1 Stimulation mit 1  $\mu\text{M}$ . Höhere Konzentration führen nicht zu einer weiteren Steigerung der mTORC1 Phosphorylierung.



**Abbildung 4.2: Konzentrationsabhängige Stimulation von mTORC1 durch natürliche Liganden**

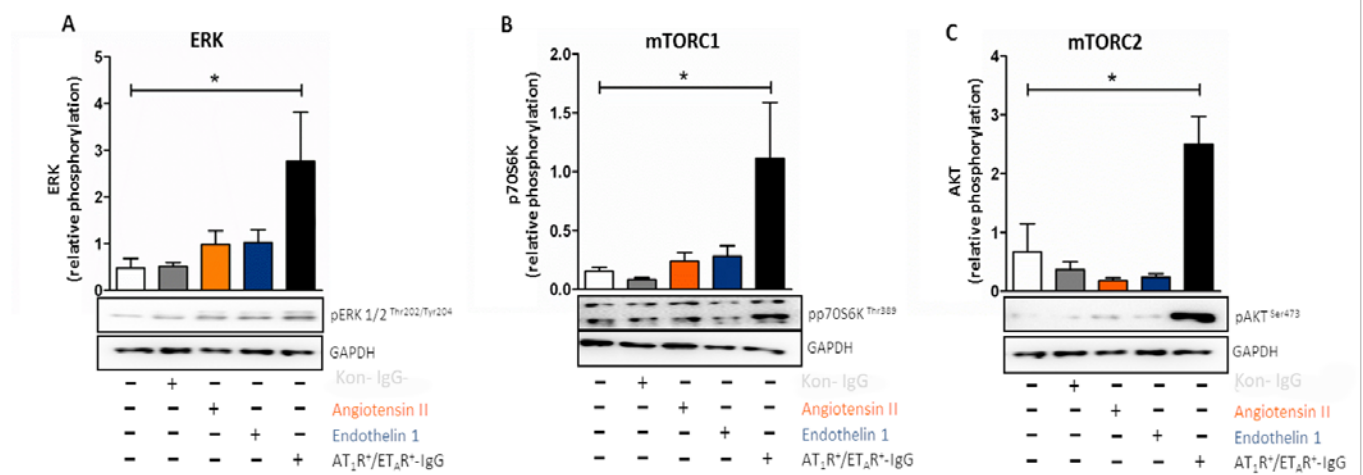
Um die Konzentrationsabhängigkeit der mTORC1 Aktivität zu bestimmen erfolgte eine Stimulation mit den natürlichen Liganden mit ansteigender Konzentration des AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R, (A) Angiotensin II und (B) Endothelin-1 dargestellt ist der Western Blot und dessen densitometrische Analyse eines Experiments.

### 4.3 Stimulierung des ERK und mTOR Signalweges durch ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R aktivierende Autoantikörper (AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>/ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>-IgG)

#### 4.3.1 Vergleich der Stimulationsfähigkeit von mTORC1 und mTORC2 sowie ERK zwischen natürlichen Liganden und aktivierenden Autoantikörpern in HMEC1

In früheren Arbeiten wurde bereits demonstriert, dass ERK in glatten Gefäßmuskelzellen von ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R Autoantikörpern aktiviert werden kann.<sup>9</sup>

Um einerseits zu untersuchen, ob aktivierende Rezeptorantikörper gegen ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R ERK auch in HMEC-1 stimulieren und andererseits, ob der Aktivierungsmechanismus zwischen den Antikörpern und den natürlichen Liganden übereinstimmt, wurden HMEC-1 mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>-IgG (2 mg/ml) und den natürlichen Liganden der Rezeptoren, Angiotensin II (10 μM) und Endothelin-1 (1 μM), sowie mit IgG, isoliert von gesunden Probanden (Kon-IgG) inkubiert. Nach einer Kurzzeitstimulation von 15 Minuten wurden die Zellen lysiert und die Proteine für den Western Blot extrahiert. Es erfolgte die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern von p70 S6 Kinase an Thr<sup>389</sup>, Akt an Ser<sup>473</sup> und ERK an Tyr<sup>202</sup>/Thr<sup>204</sup>. Abb. 4.3 zeigt, dass im Vergleich zu der nicht stimulierten Kontrolle und Kon-IgG es durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>-IgG zu einer starken und signifikanten Aktivierung beider mTOR Komplexe sowie des ERK Signalwegs kam, während die natürlichen Liganden den mTORC1 und ERK Signalweg nicht so stark, bzw. mTORC2 nicht aktivieren konnten.

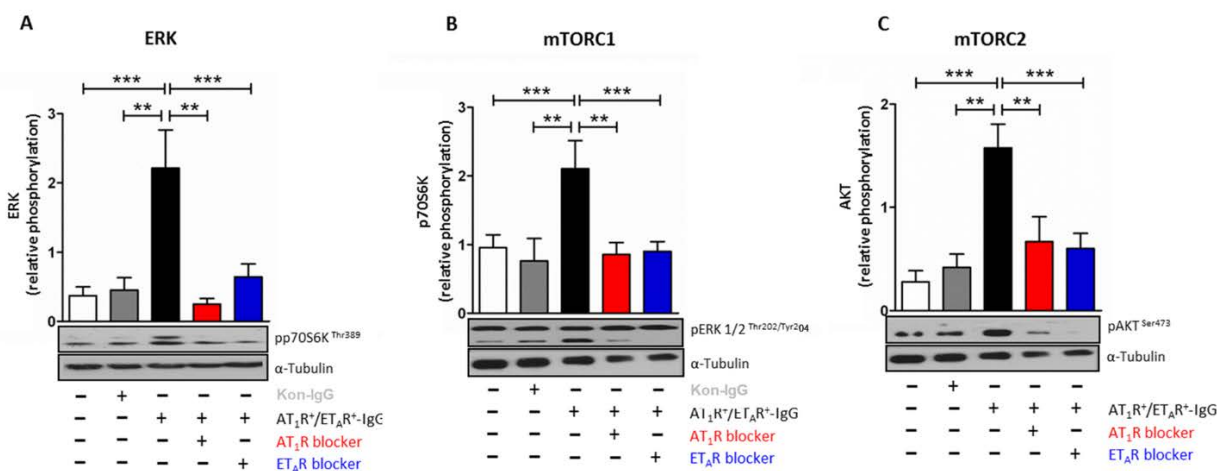


**Abbildung 4.3: Stimulation von ERK und mTOR durch Antikörper**

Zur Klärung ob und wie stark im Vergleich zu den natürlichen Liganden, die Rezeptorautoantikörper den mTOR Signalweg aktivieren wurde die Phosphorylierung von A) ERK<sup>Tyr202/Thr204</sup>, B) p70S6K<sup>Thr389</sup> und C) Akt<sup>Ser473</sup> nach Kurzzeitstimulation mit ANG II (10 μM) ET1 (1 μM) sowie entweder mit 2mg/ml Kon-IgG oder ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>-IgG bestimmt. Dargestellt ist ein Beispiel Blot und densitometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05).

### 4.3.2 Selektivität der mTOR und ERK Signalwegaktivierung durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG

Die Regulation der beiden mTOR Komplexe ist vielschichtig und kompliziert.<sup>36</sup> Unter anderem wird die Aktivierung von der Konzentration der Wachstumsfaktoren, Aminosäuren oder Glukose im Blut reguliert. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass Anti HLA IgG Antikörper den mTOR Signalweg induzieren können.<sup>62</sup> Um zu untersuchen, ob die beobachtete Stimulation des mTOR Signalweges durch die in ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG enthaltenen Autoantikörper über den ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R erfolgt, wurden HMEC-1 mit spezifischen Blockern des AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R (10μM) für eine Stunde vorinkubiert und danach über 15 Minuten mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG (2 mg/ml), bzw. Kon-IgG in gleicher Konzentration als Kontrolle stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine für den Western Blot extrahiert. Es erfolgte die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern von p70 S6 Kinase an Thr<sup>389</sup>, Akt an Ser<sup>473</sup> und ERK an Tyr<sup>202/Thr 204</sup>. Es zeigte sich, dass die durch Antikörper hervorgerufene höhere Aktivität von ERK sowie beider mTOR-Komplexe durch Blockierung des ET<sub>A</sub> und AT<sub>1</sub> Rezeptors signifikant gehemmt werden konnte (Abb. 4.4).



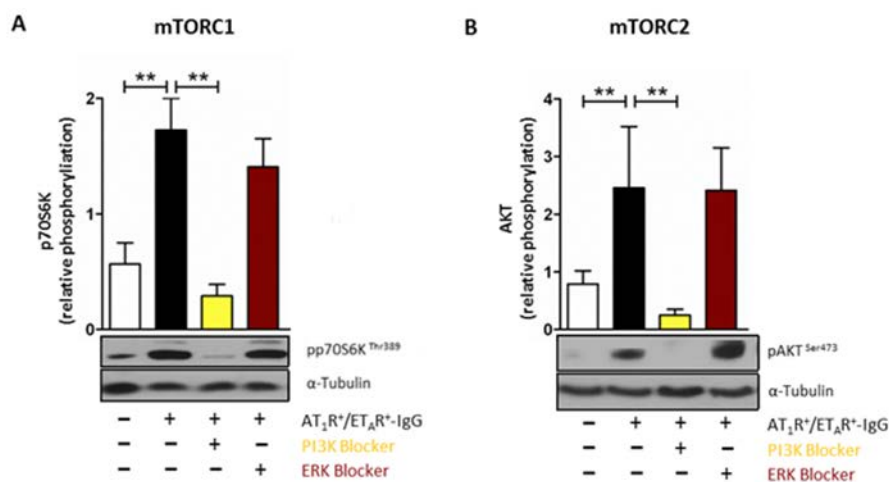
**Abbildung 4.4** Rezeptorspezifität der ERK und mTOR Aktivierung durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG

Um die Rezeptorspezifität der Autoantikörper nachzuweisen wurde die Phosphorylierung von A) ERK<sup>Tyr202/Thr204</sup>, B) p70S6K<sup>Thr389</sup> und C) AKT<sup>Ser473</sup> nach Preeinkubation mit Rezeptorblocker und folgend Kurzzeitstimulation mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG gemessen... Dargestellt ist ein Beispiel Blot und densitometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05).

### 4.4 Die Aktivierung des mTOR-Signalweges durch AT<sub>1</sub> R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörper erfolgt unabhängig vom ERK 1/2

In der Literatur wurde bereits dokumentiert, dass der mTOR Signalweg und der ERK 1/2 Signalweg miteinander durch sogenannten „crosstalk“ in Verbindung stehen. Die sich daraus ergebene Hypothese besagte, dass in HMEC-1 weder die natürlichen Liganden, noch die

Rezeptorantikörper die beiden mTOR-Komplexe direkt stimulieren, sondern, dass die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptoren die Phosphorylierung von ERK 1/2 bewirkt und es zu einer damit verbundenen Aktivierung der beiden mTOR Komplexe kommt<sup>56</sup>. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Stimulation des mTOR Signalweges durch Kreuzaktivierung des ERK 1/2 Signalweg erfolgt, wurden HMEC-1 mit dem Blockern des MEK/ERK Signalweges PD184352 (10 nM), sowie des mTOR aktivierenden PI3K-Inhibitors LY294001 (20 µM) für eine Stunde präinkubiert und dann für 15 Minuten mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup> IgG (2 mg/ml) und Kon-IgG in gleicher Konzentration als Kontrolle stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine für den Western Blot extrahiert. Es erfolgte die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern von p70 s6 Kinase an Threonin<sup>389</sup> und Akt an Ser<sup>473</sup>. Erwartungsgemäß konnte das Phosphorylierungsniveau beider mTOR Komplexe durch den Inhibitor der von PI3K bis auf das Kontrollniveau gesenkt werden. Überraschenderweise hatte der MEK/ERK Blocker keine Auswirkungen auf die Phosphorylierung von mTORC1 und mTORC2, sodass die Aktivierung beider Komplexe durch einen ERK unabhängigen Signalweg erfolgen muss (Abb. 4.5).



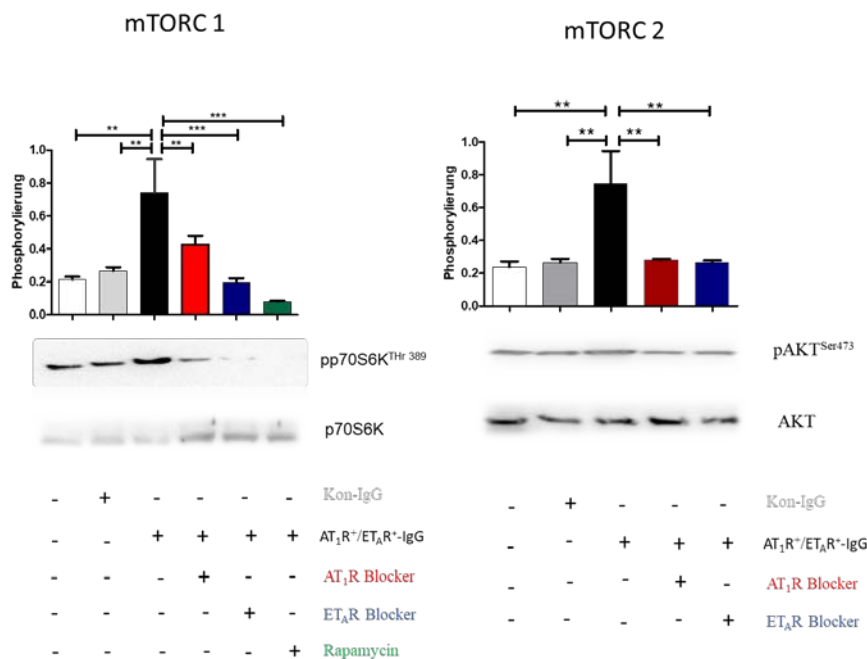
**Abbildung 4.5 ERK-unabhängige mTOR-Aktivierung Aktivierung von ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup> IgG**

Um die ERK- Abhängigkeit der mTOR Aktivierung nachzuweisen wurde die Phosphorylierung von p70S6K<sup>Thr389</sup> (A) und AKT<sup>Ser473</sup> (B) nach Inhibition des MEK/ERK Signalweges PD184352 (10 nM) sowie der PI3K LY294001 (20 µM) t und anschließender Kurzzeitstimulation mit 2mg/ml Kon-IgG oder ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup> IgG . Dargestellt ist ein Beispiel Blot und densitometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05).

#### 4.5 Langzeitstimulation des mTOR Signalwegs durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup> IgG erhält das Phosphorylierungslevel der beiden mTOR Komplexe über 24 Stunden

Hinsichtlich möglicher funktioneller Bedeutungen stellte sich die wichtige Frage, ob die Rezeptorautoantikörper einen protrahierten Effekt auf den mTOR Signalweg ausüben und somit

eine Dysregulation der Signalkaskade über längere Zeit bewirken können. Während bekannt ist, dass Endothelin-1 eine Halbwertszeit im Blut der Ratte von ca. 7 Minuten und die von Angiotensin II 16 Minuten hat, kann IgG normalerweise eine Halbwertszeit von ca. 23 Tagen haben. Welche Auswirkungen diese lange Halbwertszeit auf die HMEC-1 und den mTOR Signalweg haben, wurde bisher nicht untersucht. Um zu erforschen, ob die Autoantikörper ihre Wirkung auf mTOR in HMEC-1 protrahiert ausüben können, wurden HMEC-1 mit Blockern des AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R (10µM) für eine Stunde vorinkubiert und danach eine Langzeitstimulation für 24 Stunden mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG (2 mg/ml) und Kon-IgG in gleicher Konzentration als Kontrolle durchgeführt. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine für den Western Blot extrahiert. Es erfolgte die Inkubation mit phosphospezifischen Antikörpern von p70 s6 Kinase an Threonin<sup>389</sup>, Akt an Ser<sup>473</sup> und ERK an Tyr<sup>202/Thr 204</sup>. Es zeigte sich, dass der in der Kurzzeitstimulation beobachtete Effekt der Aktivierung der mTOR Komplexe über 24 Stunden anhielt und auch durch Blocker des ET<sub>A</sub>R und des AT<sub>1</sub>R inhibiert werden konnte (Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6** anhaltende Hemmung der mTOR Aktivierung durch Rezeptorblocker bei Langzeitstimulation mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG

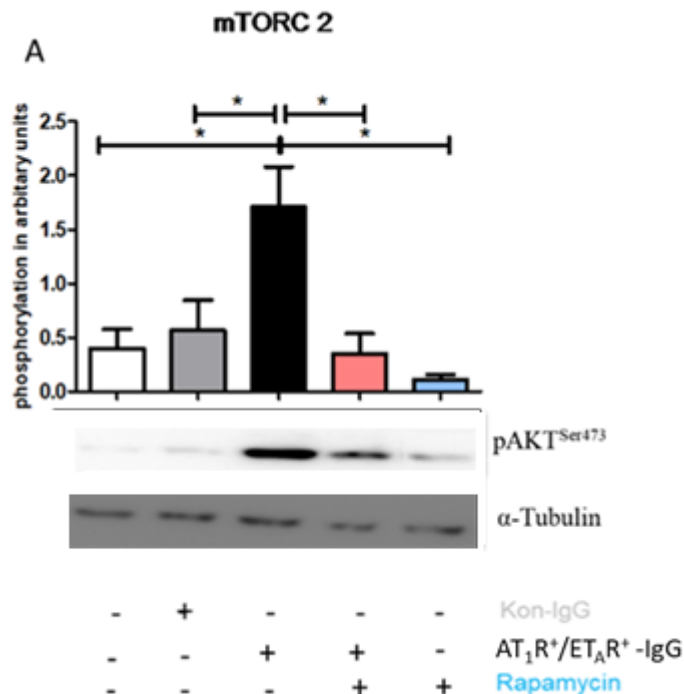
Zur Erforschung der Langzeitwirkung beider Rezeptorautoantikörper auf mTOR wurde die Phosphorylierung von p70S6K<sup>Thr389</sup> und AKT<sup>Ser473</sup> nach Preinkubation mit Inhibitoren von AT<sub>1</sub> und ET<sub>A</sub> (Valsartan 10µM und Sitaxentan 10µM und anschließender Stimulation für 24 Stunden mit 2mg/ml Kon-IgG oder mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG. Dargestellt ist ein Beispiel Blot und densitometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05).

#### 4.5.1 Langzeitinkubation mit Rapamycin inhibiert die Aktivität von mTORC 2

Es wurde mehrfach beschrieben, dass eine Langzeitpräinkubation mit Rapamycin auch mTORC2 hemmen kann.<sup>63</sup> Eine Stimulation der HMEC-1 ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG für 15 Minuten nach 24h



Vorinkubation mit 20 nM Rapamycin führte zu einer Reduktion der Aktivierung von mTORC 2 auf das Niveau unstimulierter Zellen. Alleinige Behandlung mit Rapamycin führte zu einer nichtsignifikanten Reduktion unterhalb des Kontrollniveaus unstimulierter Zellen (Abb.4.7).



**Abbildung 4.7 mTORC2-Inhibition durch Rapamycin**

Eine mögliche Inhibition von mTORC2 durch Langzeitinkubation mit 20 nM Rapamycin und anschließender 15 minütiger Stimulation mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup> -IgG und Kon-IgG wurde anhand der Phosphorylierung von pAKT Ser473 untersucht. Dargestellt ist ein Beispiel Blot und densitometrische Analyse von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung, \*p<0,05).

## 4.6 Aktivierende Autoantikörper gegen ET<sub>A</sub>- und AT<sub>1</sub> Rezeptor führen zu Störungen der endothelialen Reparaturmechanismen

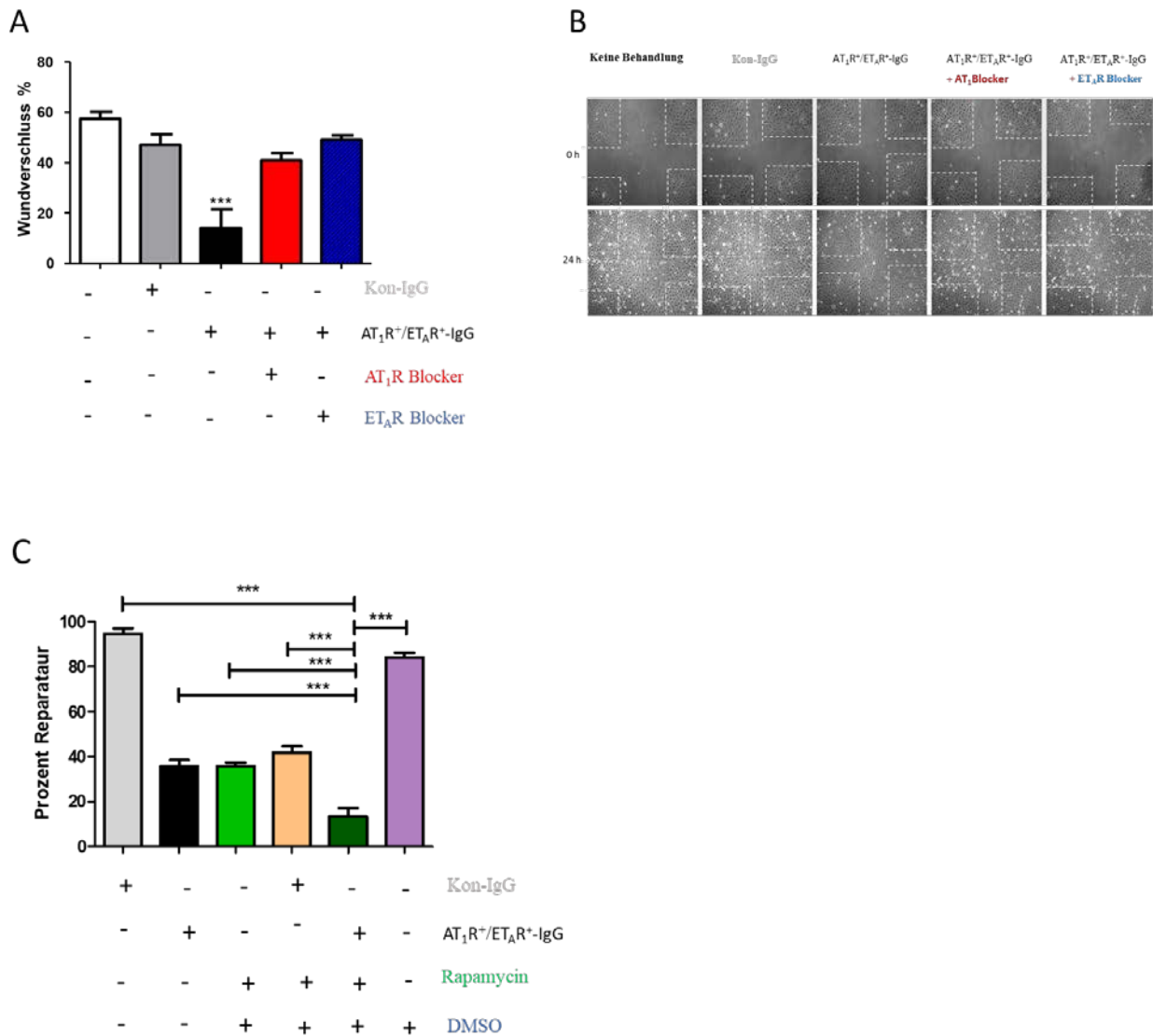
### 4.6.1 Die Wirkung der Autoantikörper auf endotheliale Reparaturmechanismen erfolgt durch Überaktivierung des mTOR Signalweges, welche durch spezifische AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub> Rezeptorblocker verhindert werden kann

Bei der Nierentransplantation spielt ein funktionierendes Endothel des Transplantats eine entscheidende Rolle für das Langzeitüberleben. Es stellt die erste Barriere zwischen dem Blut des Empfängers und dem Donororgan dar und trägt Antigene, die eine Rejektion forcieren könnten. Bei Endothelschaden kommt es zusätzlich zu einer verstärkten autoimmunen Antwort der Rejektion. Ein möglichst intaktes Endothel ist unabdingbar für eine Toleranzentwicklung des

Transplantats.<sup>64</sup> Bei der Steuerung der Migration und damit der endothelialen Wundheilung, sowie der Bildung und Kontrolle des Spindelapparates in der Zelle wird mTOR eine überragende Rolle zugeschrieben.<sup>65,66</sup> In der Annahme, dass die aktivierenden Autoantikörper über deren Wirkung auf den mTOR Signalweg auch Einfluss auf die Reparaturmechanismen von mikrovaskulären Endothelzellen nehmen könnten, wurden Untersuchungen mithilfe eines Scratch-Modells durchgeführt. Die Zellen wurden bis zur Ausbildung eines Monolayers kultiviert und dann mit einer 200 µl Pipettenspitze eine kreuzweise Verletzung induziert und mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>-IgG für 24 Stunden stimuliert. Bei einem Teil der Zellen erfolgte zuvor eine Präinkubation mit Rapamycin, bzw. mit Inhibitoren der AT<sub>1</sub> und ET<sub>A</sub> Rezeptoren (Valsartan 10 µM und Sitaxentan 10 µM), bevor das Monolayer verletzt wurde. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen zunächst visuell, mittels eines Lichtmikroskops mit integrierter Kamera, eingeschätzt. Für diese Arbeit erfolgte dann die Auswertung mit der Bildanalysesoftware TScratch wie in den Methoden beschrieben.

Nach 24 Stunden hat sich die Wunde des Monolayers, welches mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG inkubiert wurde, nur zu weniger als der Hälfte geschlossen, während die Wundschließung im Monolayer, welches Kon-IgG stimuliert wurde, in diesem Experiment fast vollständig erfolgte. Durch die pharmakologische Blockade der AT<sub>1</sub> und ET<sub>A</sub> Rezeptoren konnte die Wiederherstellung der Migrationsfunktion der HMEC-1 erreicht werden (Abb. 4.8 A,B).

Die Präinkubation der Zellen mit Rapamycin bewirkte eine deutlich verzögerte Zellmigration und Wundheilung als in den Zellen ohne Rapamycin. Die Kombination von Rapamycin und ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG führte zu einer noch weiter signifikant reduzierten Wundverschlusses des Endothelmonolayers (Abb. 4.8C).



#### Abbildung 4.8 Störung der endothelialen Reparaturmechanismen

Die Störung der endothelialen Reparaturmechanismen durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG können durch Inhibition von ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R aufgehoben werden.

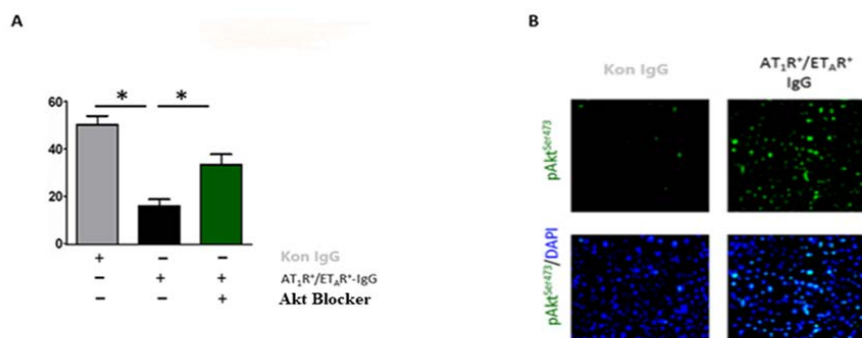
Zur Klärung, ob die Rezeptorantikörper und Rapamycin die endothelialen Reparaturmechanismen stören, wurde die Fähigkeit der HMEC-1 Zellen zum Wundverschluss nach Vorbehandlung für 24 Stunden mit Blockern des ET<sub>A</sub>R (Sitaxentan 1 μM), des AT<sub>1</sub>R (Valsartan 10μM) und Rapamycin 20 nm, sowie nachfolgender Stimulation mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG untersucht. Die quantitative Analyse (A) erfolgte auf der Basis lichtmikroskopischer Aufnahmen (B). (C) Einfluss von Rapamycin auf den Wundverschluss mit und ohne ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG. Die Diagramme stellen jeweils den Mittelwert und die SEM dar. Die Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Test analysiert \*p<0,05. n=4.

### 4.6.2 Die Hyperphosphorylierung von Akt<sup>Ser473</sup> ist hauptverantwortlich für die Dysregulation der Reparaturmechanismen des mikrovaskulären Endothelzellmonolayers

Während mTORC1 am ehesten mit einer Aktivierung der Proteinsynthese zur Wundheilung und Migration beiträgt, zeigt sich die entscheidende Rolle von mTORC2 in der Organisation des

Spindelapparats, der interzellulären endothelialen Adhäsion und der Polarisierung der einzelnen Endothelzelle. mTORC2 zeigt sich damit als Angelpunkt für Migration und Adhäsion von Endothelzellen und der damit verbundenen Wundheilung<sup>66</sup>. Auf der Basis dieser Ergebnisse fußte die Hypothese, dass die schädigende Wirkung der Rezeptorantikörper auf die Migration und Adhäsion der Zellen primär durch eine Dysregulation der mTORC2 downstream Kinase Akt und sekundär durch deren Beeinflussung von mTORC1 zustande kommt.

Um dies zu untersuchen, wurden HMEC-1 für 24 Stunden mit dem mTORC2-Inhibitor MK 2205 inkubiert. Dann folgte die Verletzung des Endothelzellmonolayers mit einer 200 µl Pipettenspitze. Es entstand eine zellfreie Narbe. Nun wurden die Zellen mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG (2 mg/ml) für weitere 24 Stunden stimuliert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen zunächst visuell, mittels eines Lichtmikroskops mit integrierter Kamera, eingeschätzt. Für diese Arbeit erfolgte dann die Auswertung mit der Bildanalysesoftware TScratch wie in den Methoden beschrieben. Des Weiteren erfolgte eine Färbung der Zellen nach Fixierung mit Antikörpern gegen phosphoAkt<sup>Ser473</sup> und Exposition gegen einen fluoreszierenden sekundären Antikörper mit zuletzt Darstellung über ein Fluoreszenzmikroskop. Die Zellkerne wurden mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) gegengefärbt. In der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich eine globale Aktivierung von Akt nach 24 Stunden in Zellen, die mit ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG stimuliert wurden im Vergleich zu den Zellen, die mit Kon-IgG stimuliert wurden (Abb. 4.9 A). Der negative Effekt des ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG auf den Wundverschluss konnte durch Akt Blockade signifikant reduziert werden (Abb. 4.9 B).



**Abbildung 4.9 TORC2 Überaktivierung durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG und dessen Einfluss auf die Wundheilung**

A) Im Scratch-Modell wurden die Zellen vor Induktion der Wunde teilweise mit dem AKT Blocker MK 2205 (10nM) präinkubiert und dann für 24 h mit oder ohne ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG kultiviert. Die Auswertung des Wundverschlusses erfolgte mit der Software TScratch ausgedrückt als Prozent der vollständigen geschlossenen Narbenfläche. Das Diagramm zeigt Mittelwerte und SEMs. Die Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney Test analysiert \*p<0,05 n=4.

(B) Immunfluoreszenzfärbung von phosphoAkt<sup>Ser473</sup> bei mit Kontroll und ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup> /AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup>- IgG stimulierten HMEC-1. Die Kernegegenfärbung erfolgte mit DAPI.

## 5 Diskussion

Momentan stehen alleine in Deutschland etwa 8000 Menschen auf der Warteliste für eine Nierentransplantation. Die aktuelle Wartezeit für ein Organ beträgt durchschnittlich sechs bis sieben Jahre<sup>105</sup>. Die Fünfjahresüberlebensrate für Patienten an Dialyse beträgt in Europa ca. 60%. Für Patienten, die älter als 65 Jahre sind, sinkt die Überlebenswahrscheinlichkeit auf 40%.<sup>67</sup> Das bedeutet, dass nur ca. 40% der über 65-jährigen Patienten eine Chance auf ein Nierentransplantat erhalten und es daher umso wichtiger erscheint, Transplantatfunktionen solange wie möglich zu erhalten, um die wenigen Organe, die zur Verfügung stehen, optimal einzusetzen. Eine akute und chronische Transplantatabstoßung wurde bereits in verschiedenen transplantierten Organen mit Autoantikörpern gegen den ET<sub>A</sub> - und AT<sub>1</sub> – Rezeptor in Verbindung gebracht.<sup>28</sup> Während akute Nierentransplantatabstoßungen heutzutage in der Regel gut behandelbar sind, hat die biomedizinische Wissenschaft bisher kein probates Mittel zur Behandlung der chronischen Abstoßung gefunden.<sup>68</sup> In dieser Arbeit konnte ein neuer Pathomechanismus aufgezeigt werden, der auf einer Dysregulation der mTOR-Signalwege beruht und welcher das vorbeschriebene Bild der Transplantatvaskulopathie in abgestoßenen soliden Organen in Gegenwart von AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörpern erklären könnte. Darüber hinaus eröffnen die Experimente mögliche therapeutische Ansätze durch Rezeptorblocker und Akt-Kinaseinhibitoren.

### 5.1 HMEC-1 als Zellmodell zur Untersuchung von Vaskulopathien

Die chronische antikörpervermittelte Rejektion des Nierentransplantats geht pathognomonisch mit einer mikrovaskulären Entzündung und anschließender Fibrosierung und Verschluss des betroffenen Gefäßes einher.<sup>69</sup> Eine Dysregulierung beider mTOR -Komplexe durch Stimulation mit den Rezeptorliganden als pathophysiologische Grundlage, konnte in intestinalen epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Für mTOR in HMEC-1 wurde dies bisher noch nicht untersucht.<sup>70</sup>

Um die Effekte der Autoantikörper auf den mTOR Signalweg in vitro gut reproduzieren zu können, wurde eine mikrovaskuläre Zelllinie benötigt, die über mehrere Passagen stabile morphologische, phänotypische und funktionelle Eigenschaften von mikrovaskulären Endothelzellen bot. Darüber hinaus sollte die Zelllinie in der Lage sein, den AT<sub>1</sub>R und den ET<sub>A</sub>R über mehrere Passagen stabil zu exprimieren. Die 1992 durch Immortalisierung von dermalen mikrovaskulären Endothelzellen entstandene Zelllinie HMEC-1 zeigte über mehrere Passagen die

benötigen Eigenschaften.<sup>62</sup> Die Wahl der Zelllinie war allerdings auch mit Nachteilen verbunden. Zur Herstellung der HMEC-1 wurden Zellen mit einem SV 40 Large T Antigen transfiziert, was zu einer Proliferationsinduktion mit Ausschaltung der Checkpoints des Zellzyklus führte.<sup>69</sup> Bei der Untersuchung des Einflusses der Antikörper auf die Funktion des mTOR Signalwegs ist eine Deregulierung der Proliferation nicht vorteilhaft, jedoch konnte in präliminären Experimenten mit Halbierung der Serumkonzentration im Kulturmedium eine deutliche Reduzierung der Proliferation erreicht werden. Allerdings gab es bei den empfindlichen Signaltransduktionsexperimenten Schwierigkeiten, schwache Unterschiede im Phosphorylierungsstatus zu erkennen, die möglicherweise bei Verwendung primärer endothelialer Zellen klarere Unterschiede hätten ergeben können.

## **5.2 mTOR Dysfunktion durch AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R aktivierende Autoantikörper**

Die vitale pathophysiologische Rolle der AT<sub>1</sub>R-Antikörper bei der HLA unabhängigen akuten vaskulären Abstoßung wurde durch Dragun et al. erstmals beschrieben.<sup>9</sup> Es konnte gezeigt werden, dass von 33 Patienten mit vaskulärer Rejektion 16 Patienten IgG1 und IgG3 Antikörper gegen den AT<sub>1</sub>-Rezeptor aufwiesen. In Nierenbiopsien dieser Patienten zeigte sich der Tissue Factor erhöht. Vaskuläre glatte Muskelzellen, die mit IgG von diesen Patienten stimuliert wurden, zeigten eine Aktivierung des ERK1/2 Signalweges sowie eine zunehmende DNS-Bindung von AP-1 und NF-κB. Diese Reaktionen konnten durch Losartan, einem AT<sub>1</sub>R-Blocker, inhibiert werden. Passiv übertragene Autoantikörper führten bei Ratten mit Transplantatnieren nach einer Woche zur vaskulären Rejektion. Die Verbindung von ET<sub>A</sub>R positiven Autoantikörpern und Vaskulopathie konnte durch Riemekasten et al. dargelegt werden.<sup>20</sup> Das Vorhandensein von beiden Rezeptorantikörpern in SSc Patienten wurde hier mit einem neu erarbeiteten Solid Phase Assay bestätigt und mit einer Aktivierung des ERK 1/2 Signaltransduktionsweges in Verbindung gebracht. Der Effekt konnte jeweils durch den Einsatz von Rezeptorinhibitoren gehemmt werden.

Des Weiteren mehrten sich in der Literatur Hinweise auf einen Crosstalk zwischen dem MAPK Signalweg und dem PI3K/mTOR Signalweg über verschiedene Stufen. Auszugsweise über eine negative Regulierung von ERK durch AKT durch Phosphorylierung des N-Terminus von RAF oder die direkte allosterische Bindung und Aktivierung von RAS-GTP der PI3K und letztlich auch die Phosphorylierung von Raptor durch ERK. Diese Interaktion von ERK und mTOR

Signaltransduktionswegen stellt hypothetisch einen essentiellen Teil der Pathophysiologie der autoantikörperabhängigen Transplantatvaskulopathie dar.

In Biopsien von abgestoßenen allogenen Herztransplantaten zeigte sich die mTORC1-downstream Kinase P70S6K in Biopsien mit antikörpervermittelter Rejektion stark phosphoryliert.<sup>71</sup>

Gallo et. al demonstrierten 1999 zum ersten Mal an Schweinemodellen nach PTCA eine signifikant reduzierte Stenoserate durch den Einsatz von Rapamycin.<sup>72</sup> Dies konnte auch an Menschen mit neu aufgetretener koronarer Herzkrankheit beim Einsatz von Rapamycin bedeckten Stents nachgewiesen werden. Die Patienten zeigten nach einem Jahr fast keine Neointimaformation.<sup>73</sup> Schließlich konnten Wang et. al. zeigen, dass der Verlust von Rictor in einem Endothelzellmodell mit murinen pulmonalen Endothelzellen und humanen umbilikalen Endothelzellen darin mündet, dass die Zellen ihre Fähigkeit zur Proliferation und Migration verlieren. Dies führte schlussendlich zur fehlenden Gefäßausbildung nach Stimulation mit VEGF.<sup>74</sup>

Die beiden mTOR Komplexe zeichnen sich als zentrale Integratoren der durch Wachstums- und Nahrungssignale vermittelten Transduktion aus. Als so essentielles Molekül der Zelle mit vielen Möglichkeiten der Beeinflussung überrascht es nicht, dass auch eine antikörpervermittelte Dysregulation von mTOR bei der Pathogenese von Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Das Antiphospholipidsyndrom ist eine Autoimmunerkrankung, die sich durch antikörpervermittelte globale Gefäßthrombosierung und Vaskulopathie auszeichnet. Canaud et al. konnten zeigen, dass IgG sowohl von nierentransplantierten als auch nicht transplantierten Patienten mit nachgewiesenem Antiphospholipidsyndrom in HMEC-1 Zellen zur verstärkten Phosphorylierung der mTORC1 und mTORC2 downstream Proteine P70 S6 Kinase und AKT im Gegensatz zu IgG von gesunden Probanden führte. Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zu dem Titer der Anti-Cardiolipin und  $\beta$ 2-Glycoprotein I Antikörper. Nierenbiopsien von nicht transplantierten Patienten mit Antiphospholipidsyndrom zeigten im Gegensatz zu Kontrollbiopsien fluoreszenzmikroskopisch eine deutlich stärkere Anfärbung von phosphorylierter P70 S6 Kinase und Akt. Dieser Effekt konnte durch den unselektiven mTOR Inhibitor PP242 und dem PI3K Blocker LY294002 vollständig aufgehoben werden. Eine Präinkubation mit Rapamycin über eine Stunde führte zur Inhibition von mTORC1. Durch prolongierte Exposition konnten beide mTOR Komplexe gehemmt werden. Letztlich konnte gezeigt werden, dass der mTOR Inhibitor Sirolimus bei APS Patienten mit Nierentransplantation das Transplantatüberleben deutlich verlängert.<sup>8</sup>

Auch Patienten mit humoraler akuter und chronischer Abstoßung, sowie negativen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R Autoantikörpertitern zeigen oftmals eine Nierentransplantatvaskulopathie als pathologisches Korrelat des Transplantatversagens. Bei Patienten mit Nachweis von HLA Klasse I Antikörpern konnte gezeigt werden, dass diese den mTOR Signalweg über PI3K aktivieren. Dazu wurden murine aortale Endothelzellen mit HLA Klasse I Antikörpern stimuliert. Es zeigte sich eine deutlich höhere Phosphorylierung von AKT an Thr<sup>308</sup> und Ser<sup>473</sup> im Vergleich zu nicht HLA Klasse I IgG. Eine Präinkubation mit dem PI3K Inhibitor Wortmannin verhinderte diese Reaktion. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Aktivierung von AKT über nicht diskutierte Mechanismen eine höhere Transkription von BCL-2, einem anti- apoptotischen Protein zur Folge hat.<sup>67</sup> Später konnte in humanen aortalen Endothelzellen gezeigt werden, dass der Grad der Phosphorylierung der downstream Ziele von beiden mTOR Komplexen p70 S6 Kinase und Akt deutlich gegenüber den unbehandelten Kontrollen erhöht war. Die verstärkte Assoziation von mTOR mit Rictor und Raptor nach Stimulation mit HLA I Antikörpern konnte mittels Ko-Immunopräzipitation nachgewiesen werden. Der Gebrauch von mTOR siRNS unterbrach das Signal der Antikörper komplett, während siRNS von Raptor das Signal durch mTORC1 inhibierte. Die siRNS von Rictor bewirkte dasselbe bei der Transduktion durch mTORC2. Letztlich bewirkte die Blockade von Raptor einen Proliferationsstop der untersuchten Zellen, während die Inhibition von Rictor die Proliferation der Zellen gegenüber den Kontrollen um 60 Prozent verringerte.<sup>68</sup>

Anti HLA Typ 1 Antikörper haben zudem Anteil an der Regulation der Phosphorylierung von ERK 1/2 in Endothelzellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der Aktivitätsstatus der ERK Kinasen in menschlichen aortalen Endothelzellen durch eine mTORC2 vermittelte Signaltransduktion bestimmt wird. Es zeigte sich, dass siRNS gegen mTORC1 das Anti HLA Signal nicht inhibierte. Dazu bedurfte es einer siRNS abhängigen Blockade von mTORC2. Eine Langzeitpräinkubation mit Rapamycin konnte jedenfalls die Signaltransduktion durch mTORC2 blockieren.<sup>75</sup> Interessanterweise verhielt es sich bei Antikörpern gegen HLA II Antigene, welche Endothelzellen unter bestimmten Umständen ausbilden, anders. Jin et al. demonstrierten, dass auch die Ligandierung von HLA II Antikörpern in menschlichen aortalen Endothelzellen zur Steigerung des Phosphorylierungsniveaus beider mTOR Komplexe führte. Im Gegensatz zu HLA I Antikörpern war die HLA II Antikörper vermittelte Steigerung der mTORC1 Aktivität ERK1/2 abhängig. Mit dem Einsatz eines ERK 1/2 Blockers zeigte sich auch mTORC1 inhibiert. Schließlich wurde auch eine negative Regulation von ERK 1/2 durch mTORC2 demonstriert. Durch Blockade des mTORC2 Komplexes mit siRNS wurde ERK 1/2 stark



phosphoryliert, was darauf hinweist, dass sich das Signalverhalten von HLA I und HLA II Antikörpern in einigen bedeutsamen Punkten unterscheidet.<sup>73</sup>

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass auch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG mTORC1 und mTORC 2 aktivieren und zur verstärkten Phosphorylierung der entsprechenden downstream Kinasen P70S6K und AKT führen. Die Rezeptorspezifität konnte durch die Inhibition der Reaktion für beide Autoantikörper durch die respektiven Rezeptorblocker demonstriert werden. Auffallend war es, dass die Effekte der antikörpervermittelten Reaktion im Vergleich zu den natürlichen Liganden signifikant stärker waren. Von großer Bedeutung für die Entwicklung der nachfolgenden Pathologien war die hier erstmals neu beschriebene, anhaltende Erhöhung des Phosphorylierungsgrades über einen längeren Zeitraum. Im verwendeten HMEC-1 Kulturmodell konnte der aktivierende Einfluss der Rezeptorantikörper auf den mTOR Signalweg über 24 Stunden hin nachgewiesen werden. Eine Möglichkeit der Erklärung der andauernden Autoantikörperwirkung könnte eine Beteiligung von Arrestinen an der Signalvermittlung zwischen Rezeptor und mTOR sein. Arrestine sind zytosolische Proteine, die an den durch den GPK phosphorylierten Rezeptor binden und damit den Ablauf der weiteren Signalkaskade beeinflussen. Des Weiteren sorgen sie durch ihre Interaktion mit Clathrin für die Endozytose der Rezeptoren und damit für ihre Deaktivierung.<sup>114</sup> Allerdings können Arrestine am AT<sub>1</sub> Rezeptor auch zusätzliche signalmodulatorische Funktionen haben. Wei et al. konnten zeigen, dass die Stimulation des AT<sub>1</sub> Rezeptors mit einem Angiotensin II Analogon (Sacrosin) ERK 1/2 nicht kanonisch aktiviert. Die Aktivierung konnte über eine Blockierung von β-Arrestin mit siRNS unterbunden werden. Eine Blockade der PKC führte zu keiner Reduktion der Signalreaktion. Umgekehrt konnte die Phosphorylierung von ERK 1/2 über die Aktivierung des Rezeptors durch Angiotensin II zu 60% von einem PKC Blocker inhibiert werden und die restlichen 40% durch Depletion von β-Arrestin.<sup>76</sup> Eine auf diesen Erkenntnissen aufbauende Arbeit konnte beweisen, dass eine selektive Aktivierung des Arrestin Signalwegs durch Sacrosin auch Akt an Thr<sup>308</sup> phosphorylierte und eine damit verbundene Aktivierung von mTOR bewirkte.<sup>77</sup> Bisher sind jedoch in der Literatur keine Forschungsergebnisse bekannt, die die Dichotomie des AT<sub>1</sub>R Signalwegs in Endothelzellen untersuchte. In den vorhandenen Arbeiten wurden murine vaskuläre glatte Muskelzellen und HEK 293 Zellen verwendet. Auch der ET<sub>A</sub>R hat offensichtlich die Fähigkeit, über β-Arrestin 1 differenziert verschiedene Signalwege zu transduzieren. In einer Arbeit von Buelli et al. konnte in einem Zellkulturmodell von murinen Podozyten gezeigt werden, dass ET<sub>A</sub>R über die src-Kinasen eine EGFR Transaktivierung bewirken und damit eine EGFR vermittelte downstream Signalkaskade aktivieren konnte. Eine Blockierung von β-Arrestin mittels

siRNS führte zur kompletten Inhibierung der EGFR Phosphorylierung.<sup>78</sup> Die Untersuchung der Beteiligung von Arrestinen an der Signaltransduktion von ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG war nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Allerdings wird diese Fragestellung derzeit in einer Kooperation der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dragun näher untersucht.

Die Aktivierung von mTORC1 durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG ließ sich in der vorliegenden Arbeit vollständig durch Rapamycin inhibieren. Eine Inhibition von mTORC2 erfolgte erst nach längerer Präinkubation mit Rapamycin. Dies entspricht dem in der Literatur beschriebenen Verhalten von HLA I Antikörpern.<sup>68</sup> Überraschenderweise führte aber im Gegensatz zum Signalweg bei HLA-Antikörpern eine Inhibition von MEK/ERK 1/2 und damit des kanonischen Signalweges der Autoantikörper nicht zur Hemmung der mTOR Aktivierungen durch die ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG. Durch die Blockierung der PI3K jedoch konnte das Phosphorylierungsniveau der Ziele von beiden mTOR Komplexen fast auf Kontrollniveau gesenkt werden. Diese Tatsache demonstriert, dass anders als bei dem Signalweg der HLA I und HLA II Antikörper zwar ein Crosstalk zwischen dem MAPK und dem mTOR Signalweg im Szenario der GPCR Stimulation durch die Autoantikörper existieren könnte, aber die ERK Kinase dabei nicht als Signalmolekül zwischen der GPCR Aktivierung und der mTOR Aktivierung relevant beteiligt ist.

Eine länger anhaltende Dysregulation des mTOR Signalweges, wie sie hier in durch ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG stimulierte HMEC-1 beschrieben wurde, erhöht die Wahrscheinlichkeit von positiven und negativen Feedback Loops gesteuert durch die Transkriptionsprodukte der aktivierten Signalkaskaden. Als Beispiel eines solchen Signalweges führt von Systemischer Sklerose Patienten isoliertes IgG nach 48 stündiger Stimulation in HMEC-1 Zellen zur verstärkten Expression des Chemokins Interleukin 8.<sup>21</sup> Es wurde bereits gezeigt, dass die HMEC-1 Zelllinie, die in dieser Arbeit benutzt wurde, beide IL-8 Rezeptoren (CXCR1 und CXCR2) exprimiert. Die Signaltransduktion dieser G-Protein gekoppelten Rezeptoren kann auch zu einer Phosphorylierung beider mTOR-Komplexe führen.<sup>79</sup> Dieser Mechanismus könnte einen positiven Feedback Loop bewirken, der eine weitere mTOR Dysfunktion sowie eine Verstärkung einer entzündlichen Reaktion zur Folge hätte.

Eine weitere Komplexität der Signaltransduktion besteht in der Möglichkeit von Heterodimerisierungen des ET<sub>A</sub>R und AT<sub>1</sub>R. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen fällt auf, dass bereits der Einsatz eines Blockers (entweder ET<sub>A</sub>R oder AT<sub>1</sub>R) zu einer deutlichen Reduktion der Phosphorylierung von mTORC1 und mTORC2 bis auf das Kontrollniveau führte. Diese ausgeprägte Wirkung nur eines Blockers zieht die Hypothese von

zwei separaten Rezeptoren, die völlig unabhängig voneinander agieren sollen, in Zweifel. Worin genau diese Rezeptorinteraktion besteht, ist völlig unklar. Ein mögliches Modell dafür könnte die Heterodimerisierung von AT<sub>1</sub>R und dem Bradykininrezeptor 2 sein. Der Nachweis des Heterodimers gelang erstmals im Jahre 2000 in HEK Zellen und aortalen murinen glatten Gefäßmuskelzellen mittels einer Immunkopräzipitation, sowie später mittels FRET (fluorescence resonance energy transfer).<sup>80</sup>

In mesangialen Zellen mit Expression des Heterodimers konnte durch Inhibitionsexperimente gezeigt werden, dass, obwohl die beiden Rezeptoren eigentlich entgegengesetzte funktionelle Bedeutung bei der Hypertonie haben, eine Aktivierung des Heterodimers mit Angiotensin II zur Überaktivierung des Angiotensin II Signalweges führte.<sup>81</sup> Die selektive Aktivierung des Arrestin Signalweges durch Sacrosin führte zur Ko-Internalisierung des Heterodimers, während es zusätzlich zur Schwächung des kanonischen B2 Signalwegs in HEK293 Zellen führte.<sup>81</sup> Auch der Endothelin 1 Rezeptor A hat die Fähigkeit zu Heterodimerisation und zwar mit dem Endothelin Rezeptor B. Der Nachweis der Heterodimerisation wurde in HEK293 mittels FRET Analyse geführt. Bereits ohne Stimulation konnte gezeigt werden, dass die HEK Zellen das Rezeptorheterodimer konstitutiv exprimieren. Eine Dissoziation mit Endozytose des Rezeptorheterodimers wird nur durch ET<sub>B</sub> selektive Stimulation mit BQ 3020 erreicht.<sup>82</sup>

Zurzeit werden Anstrengungen unternommen, das mögliche Zusammenspiel von einem möglichen AT<sub>1</sub>/ET<sub>A</sub> Rezeptorheterodimer zu untersuchen. Dazu hat die Arbeitsgruppe von Dragun eine HEK Zelllinie konstruiert, die beide Rezeptoren dauerhaft und stabil überexprimiert. Die Ergebnisse der Experimente mit diesen Zellen werden unser Wissen über die Signaltransduktionsprozesse von ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgGs wesentlich erweitern.

### **5.3 Störung der Wundheilung durch Antikörper gegen AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor**

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass mTOR in HMEC-1 einen integralen Bestandteil der Signaltransduktionsmechanismen zur Wundheilung darstellt. Bereits der Einsatz von Rapamycin reduzierte die Fähigkeit der Zellen zur Wundheilung deutlich. Mehrere Arbeiten haben gezeigt, dass Langzeitexposition von Rapamycin beide mTOR Komplexe in Endothelzellen hemmt.<sup>8</sup> Interessanterweise führte die Stimulation mit den Rezeptorautoantikörpern, obwohl der mTOR Signalweg aktiviert wurde, zu einer Reduzierung der Wundheilung und der Migration. Dieser

Effekt konnte mit den rezeptorspezifischen Inhibitoren aufgehoben werden. Auch auf funktioneller Ebene zeigte sich, dass ein Rezeptorblocker ausreichte, um eine fast komplette Wiederherstellung der Wundheilungsfähigkeit der Endothelzellen zu erreichen. Rapamycin und Autoantikörper zeigten eine additive Wirkung, indem sie zusammen die Wundheilung nochmals deutlicher inhibierten.

Die negative Wirkung der Autoantikörper auf die Wundheilungsfähigkeit von HMEC-1 in einem Wundheilungsassay konnte bereits in SSc Patienten demonstriert werden. Eine rezeptorspezifische Blockade mit Blockern des AT<sub>1</sub> und ET<sub>A</sub> Rezeptors führte zur Wiederherstellung der Wundheilung.<sup>33</sup> Bei HLA I Antikörpern, die den mTOR Signalweg auch aktivieren, kommt es allerdings zu einer verstärkten Endothelialisierung in humanen aortalen Endothelzellen. Genauso wie bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde zur Quantifizierung ein Scratch Assay eingesetzt. Interessanterweise steht diese Arbeit in diametralem Gegenteil zu den hier gezeigten Ergebnissen und liefert eine weitere Bekräftigung der Hypothese zur differenzierten Signaltransduktion der Autoantikörper über die GPCR.<sup>71</sup>

Die Dysregulation von mTORC2, einem der wichtigsten Integratoren in der Transduktion von extrazellulären Signalen für Migration, Proliferation, Wundheilung und Angiogenese, sowie der Regulation des Zytoskeletts<sup>83</sup> erschien am naheliegendsten, die Wundheilungsstörung der HMEC-1 bei Aktivierung beider Komplexe zu erklären. Es zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie, dass die Stimulation der Zellen mit den Autoantikörpern zu einer starken Phosphorylierung von AKT an Ser<sup>473</sup> in den HMEC-1 Zellen führt. Eine Blockade von mTORC2 mit MK 2205 mit einer Dosis von 100 nM führte hingegen zu einer Wiederherstellung der Wundheilungsfähigkeit der HMEC-1. Höhere Dosen des Blockers hingegen reduzierten die Endothelialisierungsfähigkeit der HMEC-1, während der AKT Blocker an sich bereits in kleineren Dosen die Wundheilung inhibierte. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Dysregulation von mTORC2 als zentraler Intergrator und Bindeglied in der Signaltransduktion des Aktinzytoskeletts zu einem Verlust der Migrationsfähigkeit und damit der Wundheilung in mikrovaskulären Endothelzellen führte. Diese Erkenntnisse der zentralen Rolle von mTORC2 für Wundheilung und Migration durch Inhibition von mTORC2 und der darauffolgenden Wundheilungsstörung sowie der direkten Verbindung demonstriert durch rezeptorspezifische Blockade der Migration durch die Autoantikörper ermöglichen Rückschlüsse auf die Genese der Transplantatvaskulopathie bei Vorliegen von ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>+</sup>- IgG nach Nierentransplantation.

## 5.4 Zusammenfassende Beurteilung und Ausblick

Agonistische Autoantikörper gegen den AT<sub>1</sub> Rezeptor wurden in den letzten Jahren immer mehr als Verursacher oder Mitverursacher von akuten und chronischen Abstoßungen solider Allotransplantate<sup>39,43,48,49,52</sup> erkannt.

Der Pathomechanismus der vaskulären Schädigung ist noch unzureichend verstanden. Die Hypothese, gestützt durch vorangegangene Experimente der Arbeitsgruppe und der vorhandenen Literatur besagte, dass ein zentraler Pathomechanismus dieser Rezeptorautoantikörper die Dysregulierung der integrativen Kinase mTOR sein könnte.<sup>31</sup> Des Weiteren erfolgten vor kurzem Veröffentlichungen, die die AT<sub>1</sub>R Autoantikörper im Bereich der Sklerodermie mit dem ET<sub>A</sub>R Autoantikörper assoziierten.<sup>20</sup>

Das Hauptziel dieser Arbeit war es, die Signalkaskade von ET<sub>A</sub>R<sup>+</sup>/AT<sub>1</sub>R<sup>-</sup> IgG über die beiden GPCR-gekoppelten Rezeptoren und dem mTOR Signalweg, sowie funktionelle Auswirkungen auf das Verhalten eines Endothelzelllayers nach Verletzung zu untersuchen.

Eine Steigerung der Phosphorylierungsrate beider mTOR Komplexe konnte rezeptorspezifisch für beide Autoantikörper gezeigt werden. Dabei war die Phosphorylierung deutlich stärker als bei Stimulation mit den natürlichen Liganden. Die unerwartete anhaltende Aktivierung der mTOR Komplexe über 24 Stunden und die Unabhängigkeit der Stimulation von ERK 1/2 deuten auf einen bisher unbekanntem Signaltransduktionsmechanismus für die Rezeptorantikörper hin, dessen integraler Bestandteil die PI3K ist und der sich von den in der Literatur beschriebenen antikörpervermittelten Aktivierungen von mTOR durch HLA I, HLA II und Antiphospholipidantikörpern zu unterscheiden scheint.<sup>73</sup> Der nächste Schritt in der Erforschung der antikörpervermittelten Signaltransduktion sollte eine Entschlüsselung der durch Arrestin vermittelten Signaltransduktion über die GPCR sein. Die fast vollständige Inhibition der mTOR Phosphorylierung durch nur einen der Rezeptorblocker deutet auf eine mögliche Bildung eines AT<sub>1</sub>/ET<sub>A</sub> Rezeptorheterodimers hin, welches allerdings bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dragun hat eine HEK Zelllinie entwickelt, die beide Rezeptoren überexprimiert. Mit dieser Toolbox sollte es bald gelingen, neue Erkenntnisse zur AT<sub>1</sub>/ET<sub>A</sub> Rezeptorinteraktion vorzulegen.

Um die Folgen der mTOR Dysregulation auf funktioneller Ebene zu erforschen, wurde ein Scratch Assay gewählt, der es ermöglichte, die Wundheilungs- bzw. Endothelialisierungsfähigkeit der

HMEC-1 Zellen unter Stimulation mit  $ET_{AR}^+/AT_{1R}^+$ - IgG zu überprüfen. Es zeigte sich bei Stimulation eine Reduzierung in der Wundheilung, die mit den respektiven Rezeptorblockern unterbunden werden konnte. mTORC 2 ist bekannt als zentraler Integrator der extrazellulären Signale zur Organisation des Zytoskeletts, Spindelapparats, Migration, Proliferation und Wundheilung. Das phosphorylierte mTOR Ziel Akt<sup>Ser473</sup> zeigte sich in der Fluoreszenzmikroskopie global aktiviert. Die Wundheilung konnte mittels eines selektiven mTORC2 Blockers wiederhergestellt werden. Höhere Dosen des Inhibitors kehrten diese Wirkung wieder um. Der Inhibitor alleine führte wiederum ebenfalls zu einer Wundheilungsstörung. Daraus konnte eine zentrale Rolle von mTORC2 für die Wundheilung in HMECs abgeleitet werden und die Fähigkeit der Antikörper zur Dysregulation einer feinen Balance, die eine mögliche neue pathophysiologische Erklärung für die Genese der Vaskulopathie nach Transplantation darstellt.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag dazu, die Mechanismen der chronischen renalen Transplantatabstoßung zu verstehen und neue Strategien zur Behandlung dieser zu entwickeln. Es wird immer wichtiger, die chronische Transplantatabstoßung für jeden einzelnen Patienten individuell nach seinem immunologischen Risiko zu betrachten und die auf ihn zugeschnittene Immunsuppression zu entwickeln. Präliminär lässt sich sagen, dass nierentransplantierte Patienten mit einem nachgewiesenen  $AT_1$  oder  $ET_A$  Antikörpertiter von einer  $AT_{1R}$ - und  $ET_{AR}$  Blockade möglicherweise profitieren könnten. Um genauere Aussagen treffen zu können, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden. Das Ziel der Forschungen muss es sein, die Entwicklung einer individualisierten pharmakologischen Therapie im Sinne eines „bench to bedside“ approach zu ermöglichen, indem die Signaltransduktionsmechanismen vollständig entschlüsselt werden. Darauf aufbauend muss die Einschränkung von monozellulären in vitro Experimenten durchbrochen werden und Ergebnisse und die daraus generierten Hypothesen in vivo nachgewiesen, modifiziert oder entkräftet werden. Letztendlich kann nur mit der Durchführung einer in randomisierten, kontrollierten Studien erprobten Pharmakotherapie aufbauend auf dem genauen Verständnis der Signaltransduktion der Autoantikörper das Transplantatüberleben deutlich verlängert werden.

## 6 Referenzen

- 1 Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med*. 2010;363(15):1451-1462. doi:10.1056/NEJMra0902927.
- 2 Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche H-U. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant*. 2011;11(3):450-462. doi:10.1111/j.1600-6143.2010.03283.x.
- 3 Colvin RB. Antibody-mediated renal allograft rejection: Diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1046-1056. doi:10.1681/ASN.2007010073.
- 4 Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Haas M, Sis B, Mengel M, Halloran PF, Baldwin W, Banfi G, Collins AB, Cosio F, David DSR, Drachenberg C, Einecke G, Fogo AB, Gibson IW, Glotz D, Iskandar SS, Kraus E, Lerut E; Mannon, R. B; Mihatsch, M; Nankivell, B. J; Nickeleit, V; Papadimitriou, J. C; Randhawa, P; Regele, H; Renaudin, K; Roberts, I; Seron, D. Valente, M. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant*. 2008;8(4):753-760. doi:10.1111/j.1600-6143.2008.02159.x.
- 5 Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg*. 2005;48(4):319-327.
- 6 Miyagawa-Hayashino A, Tsuruyama T, Haga H, Oike F, Il-Deok K, Egawa H, Hiai H, Tanaka K, Manabe T. Arteriopathy in chronic allograft rejection in liver transplantation. *Liver Transpl*. 2004;10(4):513-519. doi:10.1002/lt.20081.
- 7 Stevens DU, Al-Nasiry S, Bulten J, Spaanderman MEA. Decidual vasculopathy in preeclampsia: lesion characteristics relate to disease severity and perinatal outcome. *Placenta*. 2013;34(9):805-809. doi:10.1016/j.placenta.2013.05.008.
- 8 Canaud G, Terzi F. Inhibition of the mTORC pathway in the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1554-1555. doi:10.1056/NEJMc1410247.
- 9 Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schonemann C, Unger T, Budde K, Neumayer H-H, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 2005;352(6):558-569. doi:10.1056/NEJMoa035717.
- 10 Solomon JJ, Olson AL, Fischer A, Bull T, Brown KK, Raghu G. Scleroderma lung disease. *Eur Respir Rev*. 2013;22(127):6-19. doi:10.1183/09059180.00005512.
- 11 Mitchell RN, Libby P. Vascular remodeling in transplant vasculopathy. *Circ Res*. 2007;100(7):967-978. doi:10.1161/01.RES.0000261982.76892.09.
- 12 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(7):945-952. doi:10.1172/JCI4106.
- 13 Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem*. 1994;63:101-132. doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.000533.
- 14 Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(7):367-374. doi:10.1016/j.tips.2008.05.003.
- 15 Dasgupta C, Zhang L. Angiotensin II receptors and drug discovery in cardiovascular disease. *Drug Discov Today*. 2011;16(1-2):22-34. doi:10.1016/j.drudis.2010.11.016.
- 16 Mackman N. The Role of Tissue Factor and Factor VIIa in Hemostasis. *Anesth Analg*. 2009;108(5):1447-1452. doi:10.1213/ane.0b013e31819bceb1.

- 17 Dhaun N, Goddard J, Webb DJ. The endothelin system and its antagonism in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4):943-955. doi:10.1681/ASN.2005121256.
- 18 Mazzuca MQ, Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2012;84(2):147-162. doi:10.1016/j.bcp.2012.03.020.
- 19 Huggins JP, Pelton JT, Miller RC. The structure and specificity of endothelin receptors: Their importance in physiology and medicine. *Pharmacol Ther.* 1993;59(1):55-123. doi:10.1016/0163-7258(93)90041-B.
- 20 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;70(3):530-536. doi:10.1136/ard.2010.135772.
- 21 Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kühl AA, Günther J, Radic M, Becker MO, Heidecke H, Worm M, Witzernath M, Burmester G-R, 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;16(1):R29. doi:10.1186/ar4457.
- 22 Brewer J, Liu R, Lu Y, Scott J, Wallace K, Wallukat G, Moseley J, Herse F, Dechend R, Martin JN, Lamarca B. Endothelin-1, oxidative stress, and endogenous angiotensin II: mechanisms of angiotensin II type I receptor autoantibody-enhanced renal and blood pressure response during pregnancy. *Hypertension.* 2013;62(5):886-892. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01648.
- 23 Bai K, Wang K, Li X, Wang J, Zhang J, Song L, Wang J, Zhang S, Lau WB, Ma X, Liu H. Autoantibody against angiotensin AT1 receptor from preeclamptic patients enhances collagen-induced human platelet aggregation. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45(9):749-755. doi:10.1093/abbs/gmt059.
- 24 Dechend R, Viedt C, Müller DN, Ugele B, Brandes RP, Wallukat G, Park J-K, Janke J, Barta P, Theuer J, Fiebeler A, Homuth V, Dietz R, Haller H, Kreuzer J, Luft FC. AT1 receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients stimulate NADPH oxidase. *Circulation.* 2003;107(12):1632-1639. doi:10.1161/01.CIR.0000058200.90059.B1.
- 25 Giral M, Foucher Y, Dufay A, van Huyen JPD, Renaudin K, Moreau A, Philippe A, Hegner B, Dechend R, Heidecke H, Brouard S, Cesbron A, Castagnet S, Devys A, Souillou JP, Dragun D. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am J Transplant.* 2013;13(10):2567-2576. doi:10.1111/ajt.12397.
- 26 Pearl MH, Zhang Q, Palma Diaz MF, Grotts J, Rossetti M, Elashoff D, Gjertson DW, Weng P, Reed EF, Tsai Chambers E. Angiotensin II Type 1 receptor antibodies are associated with inflammatory cytokines and poor clinical outcomes in pediatric kidney transplantation. *Kidney Int.* 2018;93(1):260-269. doi:10.1016/j.kint.2017.06.034.
- 27 Banasik M, Boratyńska M, Kościelska-Kasprzak K, Krajewska M, Mazanowska O, Kamińska D, Bartoszek D, Zabińska M, Myszka M, Nowakowska B, Hałoń A, Dawiskiba T, Chudoba P, Klinger M. The impact of non-HLA antibodies directed against endothelin-1 type A receptors (ETAR) on early renal transplant outcomes. *Transpl Immunol.* 2014;30(1):24-29. doi:10.1016/j.trim.2013.10.007.
- 28 Gerlach UA, Lachmann N, Ranucci G, Sawitzki B, Schoenemann C, Pratschke J, Dragun D, Pascher A. Non-HLA Antibodies May Accelerate Immune Responses After Intestinal and



- Multivisceral Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(1):141-149. doi:10.1097/TP.0000000000001439.
- 29 O'Leary JG, Demetris AJ, Philippe A, Freeman R, Cai J, Heidecke H, Smith C, Hart B, Jennings LW, Catar R, Everly M, Klintmalm GB, Dragun D. Non-HLA Antibodies Impact on C4d Staining, Stellate Cell Activation and Fibrosis in Liver Allografts. *Transplantation*. 2017;101(10):2399-2409. doi:10.1097/TP.0000000000001853.
  - 30 Cozzi E, Calabrese F, Schiavon M, Feltracco P, Seveso M, Carollo C, Loy M, Cardillo M, Rea F. Immediate and Catastrophic Antibody-Mediated Rejection in a Lung Transplant Recipient With Anti-Angiotensin II Receptor Type 1 and Anti-Endothelin-1 Receptor Type A Antibodies. *Am J Transplant*. 2017;17(2):557-564. doi:10.1111/ajt.14053.
  - 31 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*. 2017;168(6):960-976. doi:10.1016/j.cell.2017.02.004.
  - 32 VÉZINA C, KUDELSKI A, SEHGAL SN. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot*. 1975;28(10):721-726. doi:10.7164/antibiotics.28.721.
  - 33 Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):774-785. doi:10.1038/nrm2249.
  - 34 Groenewoud MJ, Zwartkruis FJT. Rheb and Rags come together at the lysosome to activate mTORC1. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(4):951-955. doi:10.1042/BST20130037.
  - 35 Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD, Lindquist RA, Thoreen CC, Bar-Peled L, Sabatini DM. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science*. 2008;320(5882):1496-1501. doi:10.1126/science.1157535.
  - 36 Saxton RA, Chantranupong L, Knockenhauer KE, Schwartz TU, Sabatini DM. Mechanism of arginine sensing by CASTOR1 upstream of mTORC1. *Nature*. 2016;536(7615):229-233. doi:10.1038/nature19079.
  - 37 Li Y, Inoki K, Yeung R, Guan K-L. Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *J Biol Chem*. 2002;277(47):44593-44596. doi:10.1074/jbc.C200510200.
  - 38 Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW, Kaelin WG. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 2004;18(23):2893-2904. doi:10.1101/gad.1256804.
  - 39 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, Hoepfer MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, Dragun D; Riemekasten, Gabriela. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(7):808-817. doi:10.1164/rccm.201403-0442OC.
  - 40 Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(5):307-318. doi:10.1038/nrm2672.
  - 41 Jenou P, Ballou LM, Novak-Hofer I, Thomas G. Identification and characterization of a mitogen-activated S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(2):406-410. doi:10.1073/pnas.85.2.406.
  - 42 Lenz G, Avruch J. Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *J Biol Chem*. 2005;280(46):38121-38124. doi:10.1074/jbc.C500363200.
  - 43 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-1101. doi:10.1126/science.1106148.

- 44 Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 2009;137(5):873-886. doi:10.1016/j.cell.2009.03.046.
- 45 Xu Y, Lai E, Liu J, Lin J, Yang C, Jia C, Li Y, Bai X, Li M. IKK interacts with rictor and regulates mTORC2. *Cell Signal*. 2013;25(11):2239-2245. doi:10.1016/j.celsig.2013.07.008.
- 46 Kamada Y, Fujioka Y, Suzuki NN, Inagaki F, Wullschleger S, Loewith R, Hall MN, Ohsumi Y. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol*. 2005;25(16):7239-7248. doi:10.1128/MCB.25.16.7239-7248.2005.
- 47 Lee J, Ishihara A, Theriot JA, Jacobson K. Principles of locomotion for simple-shaped cells. *Nature*. 1993;362(6416):167-171. doi:10.1038/362167a0.
- 48 Holroyd AK, Michie AM. The role of mTOR-mediated signaling in the regulation of cellular migration. *Immunol Lett*. 2018;196:74-79. doi:10.1016/j.imlet.2018.01.015.
- 49 Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*. 2002;298(5600):1912-1934. doi:10.1126/science.1075762.
- 50 Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J*. 2008;27(14):1932-1943. doi:10.1038/emboj.2008.120.
- 51 Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC, Toker A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science*. 1997;275(5300):665-668.
- 52 Guertin DA, Stevens DM, Thoreen CC, Burds AA, Kalaany NY, Moffat J, Brown M, Fitzgerald KJ, Sabatini DM. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*. 2006;11(6):859-871. doi:10.1016/j.devcel.2006.10.007.
- 53 Pugazhenthii S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE-B. Akt/Protein Kinase B Up-regulates Bcl-2 Expression through cAMP-response Element-binding Protein. *J. Biol. Chem*. 2000;275(15):10761-10766. doi:10.1074/jbc.275.15.10761.
- 54 McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007;26(22):3113-3121. doi:10.1038/sj.onc.1210394.
- 55 Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(6):320-328. doi:10.1016/j.tibs.2011.03.006.
- 56 Carracedo A, Ma L, Teruya-Feldstein J, Rojo F, Salmena L, Alimonti A, Egia A, Sasaki AT, Thomas G, Kozma SC, Papa A, Nardella C, Cantley LC, Baselga J, Pandolfi PP. Inhibition of mTORC1 leads to MAPK pathway activation through a PI3K-dependent feedback loop in human cancer. *J Clin Invest*. 2008;118(9):3065-3074. doi:10.1172/JCI34739.
- 57 Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*. 2011;286(1):567-577. doi:10.1074/jbc.M110.159046.
- 58 Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat Cell Biol*. 2013;15(6):555-564. doi:10.1038/ncb2763.
- 59 Schaub T. *Bedeutung der mTOR-regulierten Zellschicksalsprogramme für die osteoblastäre Differenzierung und die regenerative Kapazität von mesenchymalen Stromazellen*. [Dissertation]: Charité; 2014.

- 60 Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. HMEC-1: Establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*. 1992;99(6):683-690.
- 61 Gebäck T, Schulz MMP, Koumoutsakos P, Detmar M. TScratch: A novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays. *BioTechniques*. 2009;46(4):265-274. doi:10.2144/000113083.
- 62 Zhang X, Reed EF. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant*. 2009;9(11):2459-2465. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02819.x.
- 63 Sarbassov DD, Ali SM, Sengupta S, Sheen J-H, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell*. 2006;22(2):159-168. doi:10.1016/j.molcel.2006.03.029.
- 64 Piotti G, Palmisano A, Maggiore U, Buzio C. Vascular endothelium as a target of immune response in renal transplant rejection. *Front Immunol*. 2014;5:505. doi:10.3389/fimmu.2014.00505.
- 65 Larson Y, Liu J, Stevens PD, Li X, Li J, Evers BM, Gao T. Tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) regulates cell migration and polarity through activation of CDC42 and RAC1. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24987-24998. doi:10.1074/jbc.M109.096917.
- 66 Sato T, Ishii J, Ota Y, Sasaki E, Shibagaki Y, Hattori S. Mammalian target of rapamycin (mTOR) complex 2 regulates filamin A-dependent focal adhesion dynamics and cell migration. *Genes Cells*. 2016;21(6):579-593. doi:10.1111/gtc.12366.
- 67 Jin Y-P, Fishbein MC, Said JW, Jindra PT, Rajalingam R, Rozengurt E, Reed EF. Anti-HLA class I antibody-mediated activation of the PI3K/Akt signaling pathway and induction of Bcl-2 and Bcl-xL expression in endothelial cells. *Hum Immunol*. 2004;65(4):291-302. doi:10.1016/j.humimm.2004.01.002.
- 68 Jindra PT, Jin Y-P, Rozengurt E, Reed EF. HLA class I antibody-mediated endothelial cell proliferation via the mTOR pathway. *J Immunol*. 2008;180(4):2357-2366.
- 69 Foster KG, Acosta-Jaquez HA, Romeo Y, Ekim B, Soliman GA, Carriere A, Roux PP, Ballif BA, Fingar DC. Regulation of mTOR complex 1 (mTORC1) by raptor Ser863 and multisite phosphorylation. *J Biol Chem*. 2010;285(1):80-94. doi:10.1074/jbc.M109.029637.
- 70 Chiu T, Santiskulvong C, Rozengurt E. EGF receptor transactivation mediates ANG II-stimulated mitogenesis in intestinal epithelial cells through the PI3-kinase/Akt/mTOR/p70S6K1 signaling pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(2):G182-94. doi:10.1152/ajpgi.00200.2004.
- 71 Jin Y-P, Valenzuela NM, Ziegler ME, Rozengurt E, Reed EF. Everolimus Inhibits Anti-HLA I Antibody-Mediated Endothelial Cell Signaling, Migration and Proliferation More Potently than Sirolimus. *Am J Transplant*. 2014;14(4):806-819. doi:10.1111/ajt.12669.
- 72 Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 1999;99(16):2164-2170.
- 73 Jin Y-P, Valenzuela NM, Zhang X, Rozengurt E, Reed EF. HLA Class II-Triggered Signaling Cascades Cause Endothelial Cell Proliferation and Migration: Relevance to Antibody-Mediated Transplant Rejection. *J Immunol*. 2018;200(7):2372-2390. doi:10.4049/jimmunol.1701259.
- 74 Wang S, Amato KR, Song W, Youngblood V, Lee K, Boothby M, Brantley-Sieders DM, Chen J. Regulation of endothelial cell proliferation and vascular assembly through distinct

- mTORC2 signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2015;35(7):1299-1313. doi:10.1128/MCB.00306-14.
- 75** Jindra PT, Jin Y-P, Jacamo R, Rozengurt E, Reed EF. MHC Class I and Integrin Ligation Induce ERK Activation Via an mTORC2-Dependent Pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;369(2):781-787. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.093.
- 76** Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10782-10787. doi:10.1073/pnas.1834556100.
- 77** Kendall RT, Lee M-H, Pleasant DL, Robinson K, Kuppaswamy D, McDermott PJ, Luttrell LM. Arrestin-dependent Angiotensin AT1 Receptor Signaling Regulates Akt and mTor-mediated Protein Synthesis\*. *J Biol Chem.* 2014;289(38):26155-26166. doi:10.1074/jbc.M114.595728.
- 78** Buelli S, Rosanò L, Gagliardini E, Corna D, Longaretti L, Pezzotta A, Perico L, Conti S, Rizzo P, Novelli R, Morigi M, Zoja C, Remuzzi G, Bagnato A, Benigni A.  $\beta$ -Arrestin-1 Drives Endothelin-1-Mediated Podocyte Activation and Sustains Renal Injury. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(3):523-533. doi:10.1681/ASN.2013040362.
- 79** Waugh DJJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14(21):6735-6741. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4843.
- 80** Quitterer U, Pohl A, Langer A, Koller S, AbdAlla S. A cleavable signal peptide enhances cell surface delivery and heterodimerization of Cerulean-tagged angiotensin II AT1 and bradykinin B2 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409(3):544-549. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.041.
- 81** Wilson PC, Lee M-H, Appleton KM, El-Shewy HM, Morinelli TA, Peterson YK, Luttrell LM, Jaffa AA. The arrestin-selective angiotensin AT1 receptor agonist Sar1,Ile4,Ile8-AngII negatively regulates bradykinin B2 receptor signaling via AT1-B2 receptor heterodimers. *J Biol Chem.* 2013;288(26):18872-18884. doi:10.1074/jbc.M113.472381.
- 82** Gregan B, Jürgensen J, Papsdorf G, Furkert J, Schaefer M, Beyermann M, Rosenthal W, Oksche A. Ligand-dependent differences in the internalization of endothelin A and endothelin B receptor heterodimers. *J Biol Chem.* 2004;279(26):27679-27687. doi:10.1074/jbc.M403601200.
- 83** Sarbassov DD, Ali SM, Kim D-H, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* 2004;14(14):1296-1302. doi:10.1016/j.cub.2004.06.054.

## Eidesstattliche Versicherung

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

**Dysregulation des mTOR Signalweges durch agonistische Antikörper gegen AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-Rezeptor führt zu Störungen der endothelialen Funktion**  
(**Dysregulation of the mTOR signal pathway by agonistic antibodies against AT<sub>1</sub>- und ET<sub>A</sub>-receptor leads to disturbances in endothelial function**)

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/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

# Lebenslauf

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

## Danksagung

Meine unendliche Dankbarkeit gilt Prof. Dr. D. Dragun nicht nur für die Überlassung dieses wichtigen Themas, sondern auch für ihr andauerndes Vertrauen und Unterstützung in der gesamten Promotionszeit und darüber hinaus in meiner klinischen Laufbahn. Besonders großer Dank gebührt auch Dr. Rusan Catar, der mich von Anfang an auf dem langen Weg zur Promotion begleitet hat. Angefangen beim Pipettieren bis zum Korrekturlesen dieser Arbeit war er immer an meiner Seite und hat mit seiner unendlichen Geduld, Scharfsinn und Humor maßgeblich dazu beigetragen, dass ich zu Ende führe, was ich angefangen habe.

Ohne Dr. Angelika Kusch und ihre Beharrlichkeit und Gewissenhaftigkeit bei der Korrektur dieser Arbeit sowie unverzichtbaren Input und kluger Beratung in der experimentellen Phase dieser Dissertation würde diese Danksagung vielleicht nicht geschrieben werden.

Zuletzt gilt mein Dank meinen lieben Eltern und meine wunderbaren Verlobten Cathérine. Ohne eure warmen Worte und Unterstützung besonders in dunklen Zeiten hätte ich diese Arbeit niemals abschließen können. Euch gilt meine Liebe und mein Dank.