

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und Internistische  
Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

DISSERTATION

Wirkung von Autoantikörpern gegen G-Protein-gekoppelte  
Rezeptoren auf die Sekretion von VEGF-A in HMECs

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Isa Annett Hosp  
geborene Schramm  
aus Darmstadt

Datum der Promotion: **4.6.2021**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>10</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>12</b>
1.1 Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren . . . . .	12
1.2 Chronische Nierentransplantatabstoßung . . . . .	14
1.3 Regulation der vaskulären Homöostase durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A . . . . .	16
1.3.1 Die VEGF-Rezeptoren . . . . .	17
1.3.2 Die Regulation von VEGF . . . . .	18
<b>2 Zielstellung</b>	<b>20</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
3.1 Material . . . . .	21
3.2 Methoden . . . . .	29
3.2.1 IgG-Gewinnung und -Isolation . . . . .	29
3.2.2 Zellkultur . . . . .	30
3.2.3 Enzymimmunoassay (ELISA) . . . . .	32
3.2.4 RNA-Aufreinigung und -Analyse . . . . .	33
3.2.5 Promoterdeletionsanalysen . . . . .	35
3.2.6 In-silico-Analysen von Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Promoter	37
3.2.7 Gel Shift Assay(EMSA) . . . . .	37
3.2.8 Immunoblots . . . . .	39
3.2.9 Gezielte Ausschaltung des cFos-Gens durch siRNA . . . . .	40
3.2.10 Statistische Auswertung . . . . .	41
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>42</b>
4.1 Regulation der endothelialen VEGF-Transkription und -Freisetzung durch NTx-IgG . . . . .	42
4.1.1 NTx-IgG vermittelte mRNA-Expression und -Sekretion . . . . .	42
4.1.2 Rezeptorspezifität der VEGF-Sekretion . . . . .	44

4.2	Regulation der endothelialen VEGF-Transkription und -Freisetzung durch den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR-1)-Agonisten Thrombin . . . . .	47
4.2.1	Thrombin-vermittelte mRNA-Expression und -Sekretion . . . . .	47
4.2.2	Transkriptionelle Regulation der VEGF-Promoteraktivität durch Thrombin . . . . .	48
4.2.3	In-silico-Analyse auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen und in-vitro-Expressionsanalyse möglicher Transkriptionsfaktoren . . . . .	49
4.2.4	Analyse der VEGF-Promoterregulation mittels EMSA . . . . .	51
4.2.5	Einfluss der Inhibition von AP-1 auf die Thrombin-induzierte VEGF-Sekretion . . . . .	51
4.3	VEGF-Sekretion durch NTx-IgG in Gegenwart von Thrombininhibitoren . .	54
4.4	Identifizierung der Transkriptionsfaktoren für die NTx-IgG-abhängige VEGF-Regulation . . . . .	54
4.4.1	Einfluss des NTx-IgG auf die VEGF-Promoterregulation . . . . .	54
4.4.2	In-vitro-Expressionsanalyse möglicher Transkriptionsfaktoren . . . . .	55
4.4.3	Analyse der NTx-IgG-induzierten VEGF-Promoterregulation mittels EMSA . . . . .	57
4.4.4	Nachweis von AP-1-Komplex als Regulator der NTx-IgG-abhängigen VEGF-Transkription . . . . .	57
4.4.5	Identifikation von cFos als essentiellen Regulator im AP-1-Komplex .	58
4.5	Einfluss von NTx-IgG und Thrombin auf die sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion in Endothelzellen . . . . .	60
4.5.1	Die Regulation der sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion durch NTx-IgG in HMEC-1 . . . . .	60
4.5.2	Einfluss von Thrombin auf die sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion	61
4.5.3	Regulation von sFlt-1 durch PAR-1 . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>63</b>
5.1	Regulation der VEGF-Freisetzung durch Autoantikörper . . . . .	63
5.1.1	VEGF-Freisetzung durch Autoantikörper . . . . .	63
5.1.2	Zusätzliche Einflussfaktoren auf die VEGF-Freisetzung . . . . .	64
5.1.3	Beteiligung von GPCR-Rezeptoren bei der NTx-IgG-induzierten VEGF-Freisetzung . . . . .	65
5.2	Wirkung von Thrombin auf die VEGF-Bildung . . . . .	67
5.3	Wirkung von Protease-aktivierter Rezeptor 1 (PAR-1)-Autoantikörper auf die VEGF-Freisetzung . . . . .	68
5.3.1	Bindungsort der gegen PAR-1 gerichteten Antikörper . . . . .	69
5.4	Intrazelluläre Regulationsmechanismen der VEGF-Freisetzung . . . . .	70
5.4.1	Promoterdeletionsanalysen . . . . .	70

5.4.2	Identifikation beteiligter Transkriptionsfaktoren . . . . .	71
5.4.3	Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP1 in der VEGF-Regulation in humane kutane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC-1) . . . . .	71
5.4.4	Wirkung der cFos-kurze-interferierende-RNA (siRNA) . . . . .	72
5.5	sFlt-1-Freisetzung durch Autoantikörper . . . . .	73
5.5.1	Wirkung von Thrombin und PAR-1 auf die sFlt-1-Freisetzung in HMEC-1	74
5.6	Beurteilung der Wirkung von VEGF im Kontext der Nierentransplantation .	75
5.6.1	Beurteilung der Wirkung von löslicher VEGF-Rezeptor 1 (sFlt-1) im Kontext der Nierentransplantation . . . . .	76
5.7	Zusammenfassung und Ausblick . . . . .	77
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>92</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>94</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>96</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Mortalität von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz . . . . .	14
1.2	Ursachen der chronischen Transplantatdysfunktion . . . . .	15
1.3	VEGF und seine Rezeptoren . . . . .	17
1.4	Dosisabhängigkeit von VEGF . . . . .	19
3.1	Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA . . . . .	32
3.2	Ribonukleinsäure (RNA) Gelelektrophorese . . . . .	34
4.1	Einfluss der IgG-Stimulation auf VEGF-mRNA und -Protein . . . . .	43
4.2	Einfluss der Blockade des Endothelinrezeptor Typ A (ET <sub>A</sub> R)- und des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT <sub>1</sub> R)- Rezeptors auf die VEGF-Sekretion . . . . .	44
4.3	Effekte des PAR-1-Blockers auf VEGF-Sekretion und -mRNA . . . . .	46
4.4	Effekte von Thrombin auf VEGF-mRNA und -Protein . . . . .	48
4.5	Effekte von Thrombin auf die Aktivität des VEGF-Promoters . . . . .	49
4.6	Effekte von Thrombin auf die Aktivität des VEGF-Promoters . . . . .	49
4.7	Einfluss von Thrombin auf die Regulation verschiedener Transkriptionsfaktoren	50
4.8	Einfluss von Thrombin auf cFos-Proteinexpression . . . . .	51
4.9	Regulation der cFos-Bindungsaktivität durch Thrombin . . . . .	52
4.10	AP1 beeinflusst die Thrombin-stimulierte VEGF-Sekretion . . . . .	53
4.11	Wirkung von Refludan auf die VEGF-Sekretion . . . . .	54
4.12	Einfluss der IgGs auf die VEGF-Promoteraktivität . . . . .	55
4.13	Einfluss der IgGs auf die Promoter-Deletionsreihe . . . . .	55
4.14	Einfluss von IgG auf cFos-mRNA- und Proteinexpression . . . . .	56
4.15	Einfluss der IgGs auf verschiedene Transkriptionsfaktoren . . . . .	56
4.16	Regulation der cFos-Bindungsaktivität durch IgGs . . . . .	57
4.17	Einfluss der Blockade von AP-1 auf die NTx-IgG-Induzierte VEGF-Sekretion	58
4.18	Einfluss von cFos-siRNA auf die cFos-Expression . . . . .	59
4.19	Einfluss von cFos-siRNA auf die VEGF-Sekretion . . . . .	59
4.20	Einfluss der IgGs auf die sFlt-1-mRNA-Expression und sFlt-1-Sekretion . . .	60
4.21	Einfluss von Thrombin auf die sFlt-1-mRNA-Expression und Proteinsekretion	61
4.22	Einfluss der Blockade von PAR-1 auf die sFlt-1-mRNA-Expression und Proteinsekretion . . . . .	62
5.1	Regulation von VEGF durch die PAR-1-Autoantikörper . . . . .	78

# Tabellenverzeichnis

1.1	Funktionelle Antikörper . . . . .	13
1.2	Effekte von vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A (VEGF) auf Endothelzellen . . . . .	16
3.1	Zellkultursubstanzen . . . . .	21
3.2	Zellkulturmaterialien . . . . .	21
3.3	Fertigkomponenten . . . . .	22
3.4	Komponenten für DNA- und RNA-Arbeiten . . . . .	22
3.5	Chemikalien . . . . .	22
3.6	Puffer und Lösungen . . . . .	23
3.7	Verbrauchsmaterialien . . . . .	25
3.8	Laborgerätschaften . . . . .	26
3.9	Verwendete Antikörper . . . . .	28
3.10	verwendete Primer . . . . .	28
3.11	Im EMSA verwendete DNA-Sequenz . . . . .	29
3.12	Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien . . . . .	31
3.13	Probenansatz für das RNA-Gel . . . . .	34
3.14	Ansatz für die reverse Transkription . . . . .	35
3.15	Ansatz für eine qRT-PCR-Messung . . . . .	35
3.16	Transfektionsansatz für eine 6-Well-Vertiefung . . . . .	36
3.17	Ansatz für die Biotynilierung der DNA-Einzelstränge . . . . .	38
3.18	Synthese der Doppelstrang-DNA . . . . .	38
3.19	Polyacrylamidgel . . . . .	39
3.20	Probenzusammensetzung für den EMSA . . . . .	39
3.21	Ansatz für ein Laufgel (10 %) . . . . .	40
3.22	Ansatz für ein Sammelgel (5 %) . . . . .	40

# Abkürzungsverzeichnis

<b>2. ECL</b>	zweite extrazelluläre Schleife von PAR-1
<b>A</b>	Ampere
<b>ACE</b>	Angiotensin-konvertierendes Enzym
<b>AP-1</b>	aktivierendes Protein 1
<b>APS</b>	Ammoniumpersulfat
<b>AT<sub>1</sub>R</b>	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
<b>AT<sub>2</sub>R</b>	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcium
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA
<b>CER I</b>	Cytoplasmatische Extraktions Reagenz I
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>CTD</b>	chronische Transplantatdysfunktion
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	reines Wasser
<b>DLRA</b>	Dual-Luciferase-Renilla-Assay
<b>DMEM</b>	Dulbeccos modifiziertes Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinsäure
<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>EBM</b>	Basalmedium für Endothelzellen
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>Egr-1</b>	frühe Wachstums Antwort-1
<b>ELISA</b>	Enzymimmunoassay
<b>EMSA</b>	Gel Shift Assay
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Östrogen-Rezeptor $\alpha$
<b>ERK</b>	extrazellulär regulierte Kinase
<b>ET-1</b>	Endothelin-1
<b>ET<sub>A</sub>R</b>	Endothelinrezeptor Typ A
<b>ET<sub>B</sub>R</b>	Endothelinrezeptor Typ B
<b>FCS</b>	fetales Kälberserum
<b>GCF</b>	GC-Faktor
<b>GFR</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>GPCR</b>	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

<b>hEGF</b>	humaner endothelialer Wachstumsfaktor
<b>HIF-1</b>	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1
<b>HLA</b>	humanes Leukozyten-Antigen
<b>HMEC-1</b>	humane kutane mikrovaskuläre Endothelzellen
<b>HUVEC</b>	humane venöse Nabelschnurendothelzellen
<b>IF</b>	interstitielle Fibrose
<b>Ig</b>	Immunglobuline
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IL</b>	Interleukin
<b>mRNA</b>	Boten Ribonukleinsäure
<b>NER</b>	Kernprotein-Extraktions-Reagenz
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OD</b>	optische Dichte
<b>PAH</b>	pulmonale Hypertonie
<b>PAR-1</b>	Protease-aktivierter Rezeptor 1
<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PDGF</b>	Blutplättchenwachstumsfaktor
<b>PLGF</b>	plazentarer Wachstumsfaktor
<b>Poly(dI:dC)</b>	Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)
<b>PTC</b>	peritubuläre Kapillaren
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>RT</b>	reverse Transkription
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>SP-1</b>	Spezifitätsprotein 1
<b>SDS-PAGE</b>	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
<b>SEM</b>	Standardfehler des Mittelwerts
<b>sFlt-1</b>	löslicher VEGF-Rezeptor 1
<b>siRNA</b>	kurze-interferierende-RNA
<b>ss</b>	Einzelstrang
<b>SSc</b>	Systemische Sklerose
<b>TA</b>	tubuläre Atrophie
<b>TBE</b>	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
<b>TdT</b>	Terminale deoxynucleotidyl Transferase
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<b>TESS</b>	Transkriptionselemente-Suchsystem-Software
<b>TGFβ</b>	transformierender Wachstumsfaktor β
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
<b>NTx</b>	Nierentransplantierte

<b>UV</b>	ultraviolett
<b>V</b>	Volt
<b>VEGF</b>	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A
<b>VEGFR 1</b>	VEGF-Rezeptor 1
<b>VEGFR 2</b>	VEGF-Rezeptor 2
<b>VEGFR 3</b>	VEGF-Rezeptor 3

# Zusammenfassung

Die chronische Nierentransplantatdysfunktion (CTD) ist eine Erkrankung, die mit Beeinträchtigung der Gefäßintegrität einhergeht und durch das Immunsystem beeinflusst wird. Sie beinhaltet endotheliale Dysfunktion, Gewebehypoxie, sowie Störung der Gefäßregeneration und ist bis heute schwierig zu behandeln. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF) ist dabei ein wichtiger Regulator der vaskulären Homöostase. Funktionelle Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), z. B. Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT<sub>1</sub>R)-Antikörper und Endothelinrezeptor Typ A (ET<sub>A</sub>R)-Antikörper spielen bei einem Teil der Patienten mit CTD eine pathogenetische Rolle. Auch erhöhte Protease-aktivierter Rezeptor 1 (PAR-1)-Antikörpertiter konnten in den Seren von CTD-Patienten nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von funktionellen Autoantikörpern gegen GPCR auf die VEGF-Sekretion von humanen kutanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1), sowie die dabei beteiligten Signalwege, untersucht.

Die HMEC-1 wurden mit isolierten Antikörpern von Patienten mit CTD und erhöhten AT<sub>1</sub>R-, ET<sub>A</sub>R- und PAR-1-Autoantikörpertitern (NTx-IgG) stimuliert. Sowohl die VEGF-Sekretion als auch die Sekretion des löslichen VEGF-Rezeptors (sFlt-1) wurden mittels Enzymimmunoassay aus dem Überstand und die entsprechende Boten Ribonukleinsäure (mRNA)-Regulation mittels quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. Zur Identifikation des verantwortlichen GPCR dienten spezifische Inhibitoren. Die hierbei aktivierten intrazellulären Signalwege wurden mittels Promoter-Deletionsanalysen, Gel Shift Assay, Westernblot und spezifischer Genausschaltung durch kurze-interferierende-RNA untersucht. Die NTx-IgGs führten zu einer PAR-1-abhängigen Reduktion der VEGF-Freisetzung. Im Gegensatz dazu führte Thrombin, der endogene Aktivator von PAR-1, zu einer PAR-1-abhängigen Stimulation der VEGF-Freisetzung. Bei der Untersuchung der an der NTx-IgG-vermittelten und reduzierten VEGF-Freisetzung beteiligten, intrazellulären Signalwege konnten eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors cFos und eine erhöhte Produktion von sFlt-1 in den HMEC-1 identifiziert werden.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit erstmalig ein funktioneller Antikörper gegen den GPCR PAR-1 bei Patienten mit CTD identifiziert, der im Gegensatz zum natürlichen Liganden des PAR-1 die VEGF-Sekretion reduziert. Die Wirkung der NTx-IgGs wurde durch eine Hochregulation von cFos vermittelt. cFos scheint in HMEC-1 die VEGF-Freisetzung zu vermindern. Weiterhin führten die NTx-IgGs zu einer vermehrten Bildung von sFlt-1, was die VEGF-Verfügbarkeit zusätzlich reduzieren kann. In diesem Sinne könnten die Antikörper eine pathogenetische Rolle in der CTD spielen, indem sie durch eine Hemmung der VEGF-Freisetzung und -Verfügbarkeit, die endotheliale Dysfunktion und gestörte Gefäßintegrität unterhalten.

# Abstract

Patients with chronic kidney transplant dysfunction (CTD) show signs of disturbed vessel integrity and a strong autoimmune component. The disease is characterised by endothelial dysfunction, tissue hypoxia and disturbed vessel regeneration and it is difficult to treat. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an important regulator of vascular homeostasis. Functional autoantibodies against angiotensin II type 1 receptor (AT<sub>1</sub>R) and endothelin 1 type A receptor (ET<sub>A</sub>R) have been shown to aggravate CTD. Antibodies against the protease-activated receptor 1 (PAR-1) have been shown to exist in patients with CTD.

In this thesis the influence of functional autoantibodies against G protein-coupled receptors (GPCR) on the VEGF secretion of human dermal micro vascular endothelial cells (HMEC-1) was investigated. A further objective was to describe the participating intracellular pathways. HMEC-1 were treated with IgGs isolated from patients with CTD that were positive for AT<sub>1</sub>R, ET<sub>A</sub>R and PAR-1 antibodies (NTx-IgG). VEGF and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) secretion was measured with enzyme immunoassay. VEGF and sFlt-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) regulation was measured with quantitative real-time polymerase chain reaction. The intracellular signaling pathways were investigated with promoter deletion analysis, gel shift assay, western blot and specific gene downregulation with short interfering RNA. NTx-IgG resulted in a PAR-1 dependent reduction of VEGF release. Thrombin, the intrinsic activator of PAR-1 resulted in a PAR-1 dependent increase of VEGF release. While investigating the intracellular signaling pathways we could identify an increased expression of cFos and an increased release of sFlt-1.

In conclusion a new functional antibody against PAR-1 was identified which leads to a reduced VEGF production in HMEC-1. These effects are mediated by a strong up regulation of cFos. Furthermore a strong upregulation of sFlt-1 could be induced by the treatment with the antibodies. All this can lead to reduced availability of VEGF and thereby to disturbed vessel regeneration. This could mean that the antibodies play a role in the pathogenesis of CTD by promoting endothelial dysfunction and disturbed vessel integrity. But there is also evidence that the antibodies might prove protective.

# 1 Einleitung

## 1.1 Autoantikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, bilden den humoralen Teil der adaptiven Immunantwort. Sie werden von B-Lymphozyten gebildet und sezerniert. Es gibt unterschiedliche Ig-Fractionen, die jeweils spezifische Funktionen haben. Antikörper erkennen spezifisch bestimmte Peptidsequenzen und können sich so an Pathogene binden, diese immobilisieren und für phagozytierende Zellen markieren. Normalerweise werden B-Lymphozyten, die autoreaktive Antikörper produzieren, eliminiert. Versagt dieser Mechanismus, so kann es zu Autoimmunerkrankungen kommen[1]. Bei antikörpervermittelten Autoimmunerkrankungen können die Antikörper auf verschiedene Weise wirken. Sie können die Strukturen, gegen die sie gerichtet sind, zerstören - wie z. B. beim Diabetes mellitus Typ 1, bei dem es zur antikörpervermittelten Inselzellzerstörung kommt[1]. Sie können, als funktionelle Antikörper, Rezeptoren, gegen die sie gerichtet sind, aktivieren - wie z. B. beim Morbus Basedow, einer Erkrankung der Schilddrüse, bei der aktivierende Antikörper gegen den Thyroid-stimulierenden Hormonrezeptor zu einer Schilddrüsenüberfunktion führen[2]. Funktionelle Antikörper können auch hemmend auf einen Rezeptor wirken. Dies ist z. B. bei der Myasthenia gravis der Fall[3]. Einige Beispiele für funktionelle Antikörper, die gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gerichtet sind, finden sich in Tabelle 1.1.

Antikörper, die die Schlagfrequenz von Kardiomyozyten, isoliert von neonatalen Ratten, in gleicher Weise wie Angiotensin II erhöhten, wurden erstmals 1999 von Wallukat et al. in präeklampsischen Patienten beschrieben[4]. Angiotensin II wird mithilfe des Angiotensin konvertierenden Enzyms (ACE) und Renin aus dem in der Leber gebildeten Angiotensinogen abgespalten. Es ist für die Regulation des Blutdruckes von großer Bedeutung[5].

Die Infusion von gegen den Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 ( $AT_1R$ ) gerichteten Antikörpern bei schwangeren Ratten, induzierte eine endotheliale Dysfunktion[6] und, genau wie Angiotensin II selbst, die vermehrte Bildung des löslichen VEGF-Rezeptor 1(sFlt-1)[7, 8]. Dragun et al. zeigten 2005, dass  $AT_1R$ -Antikörper in Patienten mit akuter Nierentransplantatabstoßung vorkommen[9]. Die Patienten zeigten keine donorspezifischen humanes Leukozyten-Antigen (HLA)-Antikörper. Sie wiesen eine ausgeprägte Transplantatdysfunktion auf, mit maligner Hypertonie und teilweise Krampfanfällen mit Ähnlichkeit zur Präeklampsie. Das Transplantatüberleben war, im Vergleich zu Patienten mit akuter Abstoßung, die ausschließlich HLA-Antikörper aufwiesen, deutlich reduziert. Die Antikörper führten zur verstärkten Phosphorylierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen mit konsekutiver Aktivierung des Transkriptionsfaktors aktivierendes Protein 1 (AP-1)[9].

Auch in Patienten mit systemischer Sklerose (SSc), einer Erkrankung, die durch endotheliale Dysfunktion und verstärkte Fibrose gekennzeichnet ist, wurden erhöhte Spiegel der AT<sub>1</sub>R-Antikörper gefunden. Sie induzierten die Produktion des profibrotischen transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta$  (TGF $\beta$ ) und waren prädiktiv für eine erhöhte Mortalität. Zusätzlich fanden sich Antikörper gegen Endothelinrezeptor Typ A (ET<sub>A</sub>R), die diesen in gleicher Weise wie Endothelin-1 (ET-1) aktivierten und ebenfalls zu einer verstärkten TGF $\beta$ -Bildung führten. Das Vorkommen der ET<sub>A</sub>R-Antikörper korrelierte mit den AT<sub>1</sub>R-Antikörperspiegeln[10]. Die AT<sub>1</sub>R- und ET<sub>A</sub>R-Antikörper sind gegen die zweite extrazelluläre Schleife der Rezeptoren gerichtet[4]. Diese scheint aufgrund struktureller Besonderheiten eine bevorzugte Bindungsstelle für funktionelle Antikörper gegen GPCR zu sein[11].

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit Patrick Scheerer und Peter Hildebrand der Biophysik der Charité haben gezeigt, dass der Thrombinrezeptor Protease-aktivierter Rezeptor 1 (PAR-1) ebenfalls ein Ziel für gegen GPCR gerichtete Antikörper darstellen könnte, da die zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors große Homologien zur zweiten extrazellulären Schleife des AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R zeigt (unpublizierte Daten). Freier beschrieb erstmalig einen Autoantikörper gegen PAR-1 bei Patienten mit Raynaud-Syndrom und Herz-Kreislauf-Erkrankungen[12]. Der PAR-1 gehört zu einer Familie von GPCR, die durch Proteinasen aktiviert werden. Er wurde erstmalig durch Vu et al. 1991 auf Thrombozyten und Endothelzellen beschrieben[13]. Weiterhin kommt er auch auf glatten Gefäßmuskulzellen, Herzmuskulzellen, Fibroblasten und Nervenzellen vor[14]. Der Ligand ist ein Bestandteil des Rezeptors und wird durch die Abspaltung einer N-terminalen Peptidsequenz demaskiert. Bei PAR-1 erfolgt diese Spaltung vor allem durch Thrombin[15].

**Tabelle 1.1:** Vorkommen von funktionellen Autoantikörpern in verschiedenen Krankheitsbildern. 5-HT<sub>4</sub> = Serotonin-Rezeptor-4, AR = Adrenorezeptoren, AT<sub>1</sub>R = Angiotensin-II-Rezeptor 1, ET<sub>A</sub>R = Endothelin-1-Rezeptor A, ACh = Acetylcholin, PDGF = Blutplättchenwachstumsfaktor TSH = Thyreotropin

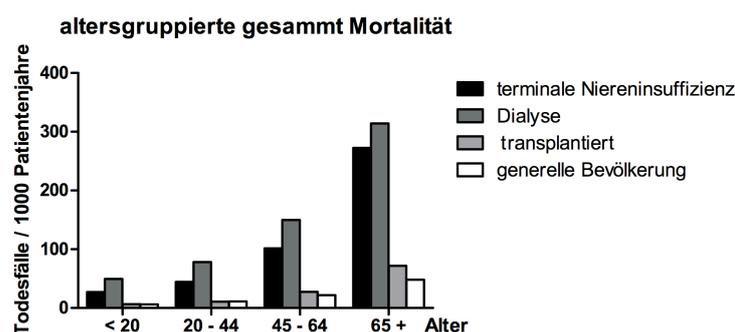
Rezeptor	Erkrankung	Referenzen
$\alpha_1$ -AR	Hypertonie	Luther et al., 1997[16]
$\beta_1$ -AR	dilatative Kardiomyopathie	Wallukat et al., 2000[17]
AT <sub>1</sub> R	Präeklampsie maligne Hypertonie akzelerierte vaskuläre Nierenabstoßung Systemische Sklerose	Wallukat et al., 1999[4] Fu et al., 2000[18] Dragun et al., 2005[9] Riemekasten et al., 2011[10]
ET <sub>A</sub> R 5-HT <sub>4</sub>	Systemische Sklerose systemischer Lupus erythematodes	Riemekasten et al., 2011[10] Eftekhari et al., 2000[19]
nikotinerger ACh-Rezeptor	Myasthenia gravis	Lewis et al., 1995[3]
PDGF Rezeptor	Systemische Sklerose	Baroni et al., 2006[20]
TSH-Rezeptor	Basedow-Krankheit	Menconi et al., 2014[2]
PAR-1	Raynaud-Syndrom	Freier, 2007[12]

## 1.2 Chronische Nierentransplantatabstoßung

Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass die AT<sub>1</sub>R-Antikörper auch das Langzeitüberleben von Nierentransplantaten negativ beeinflussen[21].

Die Nierentransplantation stellt zurzeit die einzige Möglichkeit dar, die stark erhöhte Mortalität von Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz oder an der Dialyse annähernd zu normalisieren (siehe Abbildung 1.1)[22].

Die erste erfolgreiche Nierentransplantation erfolgte 1954 als Lebendspende zwischen ein-eiigen Zwillingen. Durch die Entwicklung der Immunsuppression wurde die Transplantation



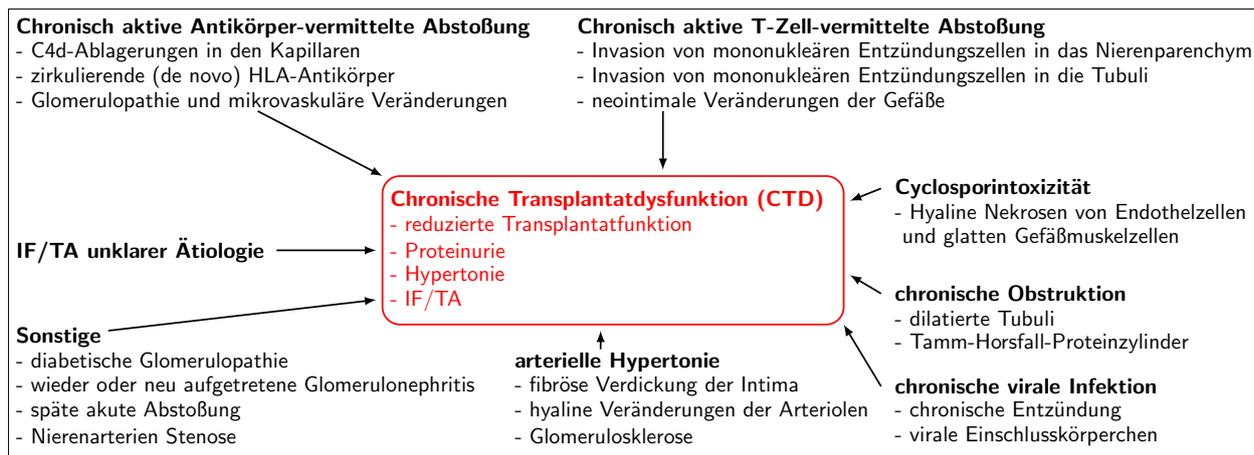
**Abbildung 1.1:** Mortalität von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz an der Dialyse oder nach Transplantation verglichen mit der generellen Bevölkerung, jeweils geordnet nach Altersgruppen[22]

von Organen auch zwischen genetisch nicht identischen Menschen möglich. Inzwischen leben in Deutschland über 25 000 Menschen mit einem funktionierenden Nierentransplantat. Durch stetige Fortschritte in der Behandlung der akuten Abstoßungsreaktionen liegt das Einjahres-Transplantatüberleben inzwischen bei deutlich über 90 %[23]. Trotz dieser guten Ergebnisse ist der chronische Verlust der Transplantatfunktion noch immer ein Problem, das das Überleben der Transplantate beeinträchtigt[24]. Die Verbesserung des Langzeitüberlebens fällt deutlich geringer aus als erhofft[25].

Die chronische Transplantatdysfunktion (CTD) ist gekennzeichnet durch einen langsamen, stetigen Verlust der Transplantatfunktion und kann Monate bis Jahre nach der Transplantation auftreten. Die Ursachen sind sowohl immunologischer als auch nichtimmunologischer Genese und die Behandlung ist schwierig (siehe Abbildung 1.2)[24, 26, 27].

Die CTD zeigt je nach Ursache verschiedene histologische Bilder, die nach der BANFF-Klassifikation einheitlich klassifiziert werden. Allen gemein ist das häufige Vorkommen von interstitieller Fibrose und tubulärer Atrophie (kurz IF/TA). Sie ist das unspezifische Ergebnis von Vernarbung und stellt die gemeinsame Endstrecke vieler Prozesse dar. Besonders im Zusammenhang mit aktiven Entzündungsprozessen und vaskulären Veränderungen stellt sie einen schlechten prognostischen Faktor für das Langzeitüberleben dar[27].

Die Bedeutung von Antikörpern in der CTD ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus gerückt. Wichtig für die Antikörper vermittelte Abstoßung ist die (Neu-) Bildung von donorspezifischen Anti-HLA-Antikörpern. Die durch Antikörper-vermittelte Abstoßung



**Abbildung 1.2:** Mögliche Ursachen der chronischen Transplantatdysfunktion mit den jeweiligen histologischen Merkmalen. IF/TA = interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie; Abbildung erstellt mit Daten aus Fadili et al.[24], Nankivell et al.[26] und Solez et al.[28]

kann akut oder chronisch verlaufen. Ein anerkannter Mechanismus für die Schädigung ist die Aktivierung des Komplementsystems durch an Endothelzellen gebundene Antikörper. Dies ermöglicht die immunhistochemische Diagnose der antikörpervermittelten Abstoßung durch die Anfärbung von C4d (einem Produkt der Komplementaktivierung)[28]. Aber die Antikörper wirken auch über die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, wodurch es zur Aktivierung der Endothelzellen mit konsekutiver Proteinsynthese, Proliferation und der Hochregulierung von Leukozytenadhäsionsmolekülen kommt[29]. Neben den HLA-Antikörpern wurden auch Antikörper gegen Vimentin und  $AT_1R$  in Transplantatpathologien beschrieben, die ebenfalls zur Aktivierung der Endothelzellen beitragen können[9, 29].

Die anhaltende Aktivierung von Endothelzellen führt zur endothelialen Dysfunktion und zum Verlust von Kapillaren[30]. Dadurch wird das komplexe mikrovaskuläre Netz der Niere gestört. Dieses ist im Rahmen der CTD häufig mit betroffen. Die histologischen Veränderungen in den Gefäßen variieren je nach Gefäßtyp und Ätiologie (siehe Abbildung 1.2). In den Glomeruli kann es zu Veränderungen kommen, die der renalen thrombotischen Mikroangiopathie ähneln, mit Thromben in den Kapillaren, Mesangiolyse und Verdopplung der Basalmembran[31]. In den peritubulären Kapillaren (PTC) kommt es im Rahmen einer chronischen Abstoßung zur Vervielfältigung der Basalmembran und zu strukturellen Veränderungen an den Endothelzellen[31]. Außerdem kommt es zu einem Verlust von PTCs. Steegh et al. konnten zeigen, dass dieser Verlust besonders in den ersten Monaten auftritt und der Ausbildung von IF/TA vorausgeht, was auf einen möglichen kausalen Zusammenhang hindeutet[27].

Schon geringfügige Störungen der Durchblutung können zu einer Einschränkung der Versorgung führen, die die Integrität des Nierenmarks gefährdet.[32] Diese Einschränkungen der Durchblutung können durch einen prärenalen Blutdruckabfall entstehen, durch Störungen des glomerulären Blutflusses und durch den Verlust der PTC. Dabei konnte für Patienten mit chronischer Nierenerkrankung gezeigt werden, dass der Verlust und die Strukturverän-

derungen der PTC deutlich besser mit dem Verlust der glomerulären Filtrationsrate (GFR) korrelieren als die Sklerosierung der Glomeruli. Der Verlust von Kapillaren, die Hypoxie, die Gewebsschädigung und die endotheliale Aktivierung stellen hier einen Teufelskreis dar, der schließlich zum Verlust der Nierenfunktion führt[33].

### 1.3 Regulation der vaskulären Homöostase durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor A

Die CTD ist gekennzeichnet durch eine gestörte Mikrozirkulation mit Minderversorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff (O<sub>2</sub>). Ein solcher Mangel führt normalerweise zu einer Neubildung von Blutgefäßen - zur Angiogenese.

Einer der wichtigsten Regulatoren der Angiogenese ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF). Die Bedeutung dieses Faktors wird dadurch deutlich, dass die Deletion eines einzelnen VEGF-Allels zum intrauterinen Tod von Mäuseembryonen am Gestationstag 11-12 mit stark unterentwickelter Gefäßbildung führt[34].

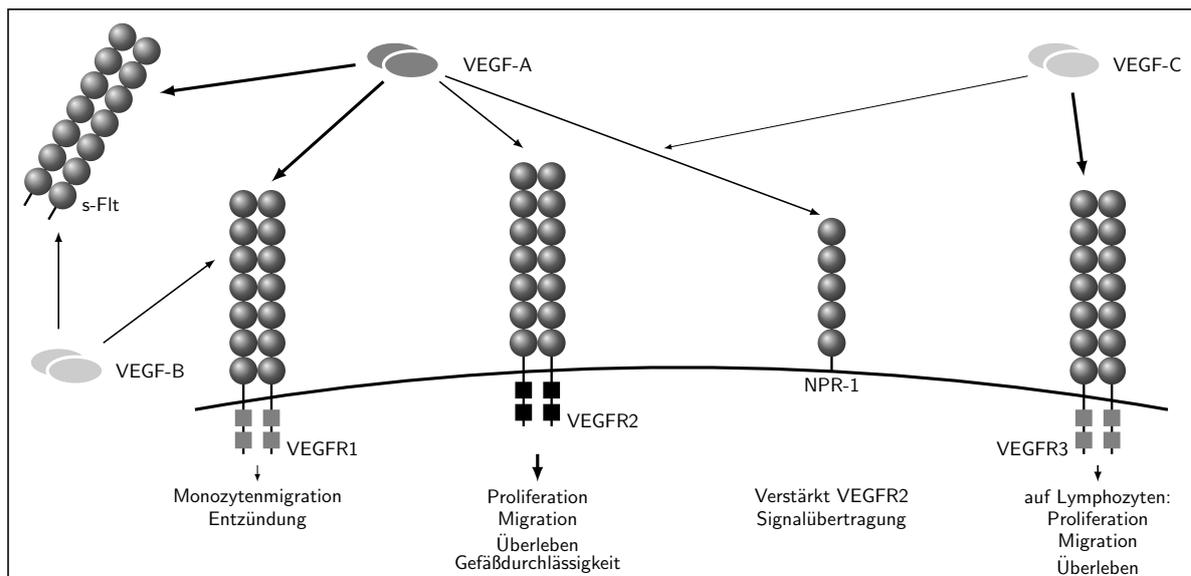
VEGF gehört zu einer gemeinsamen Genfamilie mit dem plazentaren Wachstumsfaktor (PLGF), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D, wobei die beiden letzten eine besondere Rolle in der Entwicklung der Lymphgefäße spielen[35]. Es gibt verschiedene Splice-Varianten von VEGF-A, die durch ihre Anzahl an Aminosäuren voneinander unterschieden werden (z. B. VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>121</sub>). Die verschiedenen Varianten unterscheiden sich in ihrer Wirkstärke und in ihren Bindungseigenschaften an extrazelluläre Strukturen[35].

Die Bildung und Freisetzung von VEGF erfolgt unter anderem durch glatte Muskelzellen, Makrophagen, Gliazellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Tumorzellen und Endothelzellen[36]. Die Wirkungen von VEGF auf Endothelzellen sind in Tabelle 1.2 und Abbildung 1.3 dargestellt. Darüber hinaus beeinflusst VEGF die Wanderung von Monozyten und scheint auch das Wachstum und die Funktion von anderen nicht endothelialen Zellen zu beeinflussen. Auch in der Niere ist VEGF von großer Bedeutung. Der podozytenspezifische Knock-out von VEGF in adulten Mäusen führte zu ausgeprägter Proteinurie, Hypertonie und einer renalen thrombotischen Mikroangiopathie[37].

**Tabelle 1.2:** Effekte von VEGF auf Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* [35]

<b>in vitro</b>	<b>in vivo</b>
Zellteilung ↑	Angiogenese ↑
Überleben ↑	Überleben ↑
Apoptose durch Serummangel ↓	Gefäßpermeabilität ↑
	Induktion von fenestrierten Kapillaren

Der, das Endothelzellüberleben fördernde, Effekt von VEGF scheint *in vivo* vom Entwicklungsstatus der Gefäße abhängig zu sein. So führt die Hemmung von VEGF in neugeborenen,



**Abbildung 1.3:** Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren mit den wichtigsten durch sie vermittelten zellulären Effekten. NPR-1 = Neutropilinrezeptor-1, s-Flt = löslicher VEGF Rezeptor 1, VEGF = Vascular endothelial growth factor, VEGFR = VEGF Rezeptor

aber nicht in erwachsenen Mäusen zur ausgeprägten Apoptose von Endothelzellen und zu einer deutlich erhöhten Sterblichkeit[38]. Es wurde vermutet, dass durch die Umhüllung der Kapillaren mit Perizyten diese unabhängig vom VEGF würden. Allerdings zeigte eine Arbeit von Kamba et al.[39], dass auch in erwachsenen Mäusen unter anderem die Kapillaren der Pankreasinseln, der Schilddrüse, der Nebennierenrinde und der Dünndarmschleimhaut auf VEGF angewiesen sind. Es kam durch die Inhibition von VEGF zu einer Reduktion der Kapillardichte um bis zu 50 %. Die VEGF-abhängigen Kapillaren zeigten im Hinblick auf ihre Bedeckung mit Perizyten keinen Unterschied zu Kapillaren, die nicht von der VEGF-Inhibition betroffen waren. Sie zeichneten sich jedoch durch eine besonders hohe Dichte an VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR 2) und VEGF-Rezeptor 3 (VEGFR 3) aus.

Neben seiner Bedeutung für das Überleben von Endothelzellen und die Bildung von Gefäßen spielt VEGF auch in Entzündungsprozessen eine Rolle. Es ist ein chemotaktischer Faktor für Monozyten und erhöht die Durchlässigkeit von Gefäßen, wodurch die Entstehung entzündlicher Ödeme gefördert wird[35].

### 1.3.1 Die VEGF-Rezeptoren

Die vielfältigen zellulären Wirkungen von VEGF werden über die Rezeptoren VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR 1) und VEGFR 2 vermittelt. Diese zu den Tyrosinkinase gehörenden Rezeptoren bilden eine Familie, zu der auch VEGFR 3 gehört. Letzterer bindet nur VEGF-C und VEGF-D und befindet sich vorwiegend auf Lymphendothelzellen[35].

VEGFR 2 ist für einen Großteil der proangiogenetischen Effekte von VEGF verantwortlich (siehe Abbildung 1.3). Er befindet sich am dichtesten auf Endothelzellen, wurde aber inzwischen auch auf einigen anderen Zellen nachgewiesen[40]. Die Deletion des VEGFR 2 in

Mäusen führte zu einer gestörten Vaskulogenese mit fehlender Bildung von Blutinseln im Dottersack, fehlender Entwicklung von Endothelzellen und schließlich zum Tod der Embryonen an Tag 9[41].

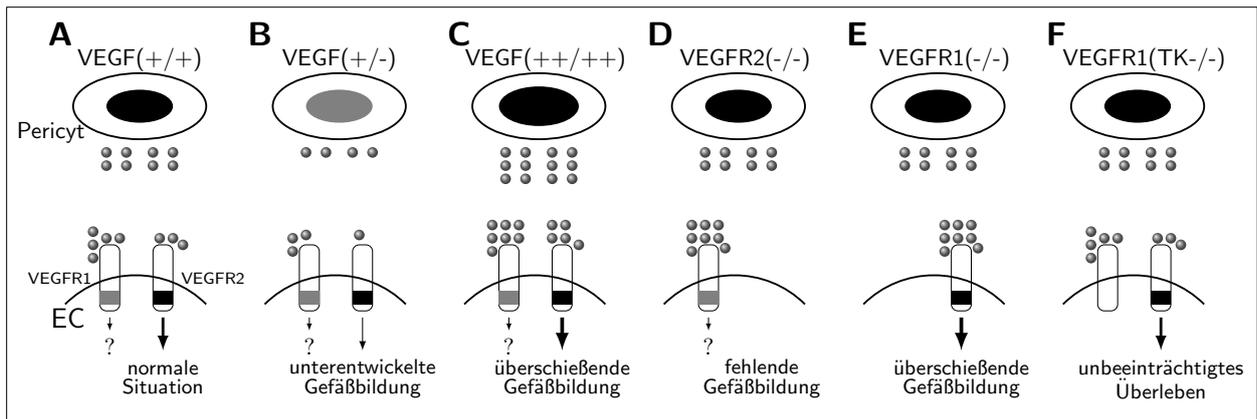
Der VEGFR 1 bindet VEGF etwa 10 mal stärker als VEGFR 2, hat aber eine deutlich schwächere Tyrosinkinaseaktivität. Er findet sich ebenfalls auf Endothelzellen, aber auch auf Monozyten, Makrophagen und anderen Zellen. Neben VEGF bindet VEGFR 1 auch PLGF und VEGF-B[40]. Auch nach Deletion des VEGFR 1 sterben die Mäuse in der frühen Embryonalphase. Sie zeigen eine überschießende Proliferation der Endothelzellen und ein dysfunktionales Gefäßsystem[42]. Hiratsuka et al.[43] zeigten, dass der extrazelluläre Anteil des VEGFR 1 ausreicht, um eine normale Gefäßentwicklung zu gewährleisten. Mäuse, denen die Tyrosinkinase-region des VEGFR 1 fehlt, weisen einzig eine gestörte Makrophagenmigration in Antwort auf VEGF auf. Deshalb wird vermutet, dass die Funktion des VEGFR 1 in erster Linie eine regulierende ist, indem es die Verfügbarkeit von VEGF reduziert. Auch in vivo gibt es eine solche gekürzte Variante des VEGFR 1. Der sFlt-1 besteht aus dem extrazellulären Anteil des VEGFR 1 und bindet VEGF mit der gleichen Stärke wie der vollständige Rezeptor[43]. sFlt-1 hemmt die Angiogenese indem es VEGF blockiert. Er wird in der Plazenta gebildet und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Präeklampsie[40]. Diese schwangerschaftsassozierte Erkrankung zeichnet sich durch eine ausgeprägte endotheliale Dysfunktion aus[7]. Auch Patienten, die mit VEGF-Inhibitoren im Rahmen einer Krebstherapie behandelt wurden, entwickelten als Nebenwirkung Proteinurie, Hypertonie und eine renale thrombotische Mikroangiopathie[37].

Neben den Tyrosinkinase-rezeptoren gibt es auch noch andere Strukturen, die VEGF binden und dadurch die Signaltransduktion beeinflussen, ohne selbst Signale zu übertragen, z. B. indem sie die Bindung von VEGF an VEGFR 2 stabilisieren. Dazu gehören Heparansulfate, Neutropilinrezeptoren und Integrine[40].

### 1.3.2 Die Regulation von VEGF

Die enge Kontrolle der VEGF-Sekretion ist in allen Stadien der Entwicklung von großer Bedeutung. Dies wird dadurch deutlich, dass auch eine Überexpression von VEGF in Mäuseembryonen letal endet[44] (siehe Abbildung 1.4). Diese Regulation erfolgt auf verschiedenen Ebenen, über die Transkription, die Boten Ribonukleinsäure (mRNA)-Stabilität, die Translation und die Proteinverfügbarkeit (z. B. über sFlt-1)[45]. Das VEGF-Gen liegt auf dem 6. Chromosom und besteht aus 8 Exons und 7 Introns. Eine Region von etwa 2360 Basenpaaren (bp) scheint in der Regulation der Expression eine Rolle zu spielen.

Ein wichtiger Faktor für die Stimulation der VEGF-Bildung ist Sauerstoffmangel. Dieser führt über den Hypoxie-induzierbaren Faktor (HIF-1), zu einer verstärkten Transkription sowie zu einer vermehrten mRNA-Stabilität[46]. Neben HIF-1 wurde auch für andere Transkriptionsfaktoren gezeigt, dass sie in verschiedenen Zelltypen für die VEGF-Bildung



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung der Bedeutung des Verhältnisses von VEGF und seinen Rezeptoren für die Entwicklung der Gefäße. A) normale Situation; B) die Deletion eines VEGF-Allels mit konsekutiver Minderproduktion führt zum embryonalen Tod mit unterentwickelter Gefäßbildung[34]; C) verstärkte VEGF-Bildung führt zu fehlgeformten Herzen und Herzversagen intrauterin[44]; D) Deletion des VEGFR 2 führt zum Tod, ohne dass sich Endothelzellen entwickelt haben[41]; E) Deletion des VEGFR 1 führt zu überschießendem Wachstum der Gefäße und ebenfalls zum Tod[42]; F) Deletion des Tyrosinkinaseabschnittes des VEGFR 1 mit Erhalt des extrazellulären Anteils führt zum Überleben der Mäuse[43] EC = Endothelzelle, TK= Tyrosinkinase, VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A, VEGFR = VEGF-Rezeptor

verantwortlich sind, z. B. Spezifitätsprotein 1 (SP-1)[45], AP-1[47] und frühe Wachstums Antwort-1 (Egr-1)[48]. Die Transkriptionsfaktoren wiederum werden neben dem Sauerstoffmangel durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren beeinflusst, z. B. durch Interleukin (Il)-6[49], Plättchen-aktivierenden Faktor[50], Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , TGF $\beta$ / $-\alpha$ , Fibroblasten-Wachstumsfaktor-4[51], Angiotensin II[52] und Thrombin[36].

Thrombin wird durch einen Komplex aus dem aktivierten Faktor X und aktivierten Faktor V aus Prothrombin gebildet und ist besonders für seine Rolle in der Gerinnung bekannt. Es ist eine Serinproteinase, die durch proteolytische Spaltung Fibrinogen in Fibrin umwandelt und damit die Bildung des Fibrinthrombus initiiert. Außerdem kann es die Gerinnungsfaktoren XI, VIII und V aktivieren und damit seine eigene Bildung begünstigen. Thrombin aktiviert die Proteinase-aktivierten Rezeptoren-1, 3 und 4 und führt dadurch unter anderem zu einer Thrombozytenaktivierung[53]. Weiterhin beeinflusst Thrombin die Gefäßbildung auf vielfältige Weise[54], unter anderem durch eine Induktion der Bildung von VEGF[36].

## 2 Zielstellung

VEGF ist ein zentrales Molekül für die Neubildung von Gefäßen und damit für die optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und O<sub>2</sub>. Die Freisetzung und Wirkung von VEGF sind streng reguliert, da sowohl ein Überschuss als auch ein Mangel fatale Folge für den Organismus haben kann.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses von Autoantikörpern von Patienten mit Nierentransplantatabstoßung auf die VEGF-Freisetzung von humanen kutanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1). Die Erkrankung ist unter anderem geprägt durch eine Fehlregulation der Angiogenese und weist funktionelle Autoantikörper auf.

Folgende einzelne Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

1. Bestimmung des Einflusses der isolierten Antikörper auf die VEGF-Transkription und -Sekretion
2. Überprüfung der Rezeptorspezifität mittels Einsatz spezifischer Blocker
3. Untersuchung der transkriptionellen Regulation mittels Gel Shift Assay
4. Identifikation der beteiligten Transkriptionsfaktoren mittels Promoterdeletionsanalysen
5. Untersuchung weiterer Faktoren, die die VEGF-Bioverfügbarkeit beeinflussen

# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

Für die Experimente wurden die Seren von drei nierentransplantierten (NTx) Patienten eingesetzt. Als Kontroll-Immunglobulin G (IgG) dienten die Seren von sechs gesunden Personen.

**Tabelle 3.1:** Zellkultursubstanzen

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog Nr.</b>
human recomb. EGF	Immunotools	11343406
DMEM 1 g/l Glucose	PAA	E15-005
Endothelial Basal Medium	PAA	E15-011
FBS Gold	PAA	A15-151
Penicillin/Streptomycin 100x	PAA	P11-010
L-Glutamine 200 mM	PAA	M11-004
Primocin	Invivogen	ant-pm-2
Trypsin EDTA (1:250) (10x)	PAA	L11-003
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Scientific	R0531
c-Fos siRNA (h)	Santa Cruz Biotechnology	sc-29221
Control siRNA-A	Santa Cruz Biotechnology	sc-37007

**Tabelle 3.2:** Zellkulturmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog Nr.</b>
Zellkulturschalen 10 cm	TPP	93100
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	831.813.002
Zellkulturflaschen 175 cm <sup>2</sup>	Sarstedt	831.812
Zellkulturplatten, 6 Loch	BD Falcon	353046
Aqua resist	VWR	462-7000
Pasteurpipetten, Glas	Brand	747715
Neubauer Zählkammer	Marienfeld	610030
serologische Pipetten 5 ml (steril)	Becton Dickinson Labware	35.75_25
serologische Pipetten 10 ml (steril)	Becton Dickinson Labware	35.75_43
serologische Pipetten 25 ml (steril)	Becton Dickinson Labware	35.75_51
serologische Pipetten 50 ml (steril)	TPP	P94550
Sterilfilter 0,2 µm	Carl Roth	P666.1
Sterilfilter 0,45 µm	Carl Roth	P667.1

**Tabelle 3.3:** Fertigkomponenten

Reagenzien	Hersteller	Katalog-Nr.
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific	34087
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific	34076
Human VEGF-A Antibody Pair	Invitrogen	CHG0113
Antibody Pair Buffer Kit	Invitrogen	CNB0011
Human sVEGFR1/Flt-1 ELISA	R&D	DVR100B
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega	E1910
NE-PER Nucleae and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo	78833
Biotin 3' End DNA Labeling Kit	Thermo	8988
Light Shift EMSA Optimisation & Control Kit	Thermo	20148X
Chemiluminescent Nucleotid Acid Detection Module	Thermo	89880

**Tabelle 3.4:** Komponenten für DNA- und RNA-Arbeiten

Reagenzien	Hersteller	Katalog-Nr.
MuLV Reverse Transkriptase	M0253S	New England Biolabs
10x MuLV RT Puffer	B0253S	New England Biolabs
RNase-Inhibitor	P18302	Applied Biosystems
RNaseZap	R2020	Sigma
dNTP Mix	N808-0260	Applied Biosystems
SYBR Green Master Rox	04913914001	Roche
RNase Inhibitor	N808-0019	Applied Biosystems
Oligo d(T)16	N808-0128	Applied Biosystems
Agarose	11404	Serva
Ethidiumbromid	E2515	Sigma

**Tabelle 3.5:** Chemikalien

Substanz	Hersteller	Katalog-Nr.
2-Propanol, Isopropanol	Carl Roth	CP41.4
3-Methyl-1-butanol (Isoamylalkohol)	Carl Roth	T870.1
Acrylamid 37,5:1, Rotiphorese R Gel	Carl Roth	3029.1
Albumin Fraktion V, BSA	Carl Roth	8076.2
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich	A9164
Bis-Tris	AppliChem	A1025
Borsäure	Roth	5935
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	B6131
Chloroform	Merck	K41162745_024
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich	D5758
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth	P030.1
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem	A1101
Essigsäure	Carl Roth	7332.1

**Tabelle 3.5:** Chemikalien (Fortsetzung)

Substanz	Hersteller	Katalog-Nr.
Ethanol (MEK, vergällt)	Herbeta Arzneimittel	70, 80, 96, 99%
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich	E2518
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	8040.2
Gelatine	Sigma	G1890
Glycerin	Carl Roth	3783.2
Glycin	Serva	23390
Isol-RNALysis Reagenz	5Prime	2302700
Kaliumchlorid	Merck	104.936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04873.1000
Magermilchpulver	AppliChem	A0830
Methanol	Carl Roth	4627.2
Natriumazid	Sigma Aldrich	71290
Natriumchlorid	Carl Carl Roth	3957.1
Natriumdihydrogenphosphat - Dihydrat	Carl Roth	T879.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	CN30.2
Ponceau Red S	Carl Roth	5938.2
Salzsäure (37 %), rauchend	Carl Roth	9277.1
Schwefelsäure 98 %	Carl Roth	X945.1
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich	87689
Tris	Carl Roth	4855.3
Tween 20	Appllichem	A7564
Xylene Cyanole FF	Sigma	X-4126

**Tabelle 3.6:** Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Endkonzentration	Zusammensetzung
RNA-Ladepuffer	56,74 %	Glycerin
	42,55 %	ddH <sub>2</sub> O
	0,71 %	Xylencyanol
1x PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,3 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,3
1x TBE	89 mM	Tris
	89 mM	Borsäure
	2 mM	EDTA pH 8,0

**Tabelle 3.6:** Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

Puffer und Lösungen	Endkonzentration	Zusammensetzung
Inkubations Puffer	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	24 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1%	BSA
	4,4 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	51 mM	EDTA
Detections Antikörper Lösung	1 %	BSA
	1,5 %	FCS
	150 mM	NaCl
	8,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1,9 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
APS (10 %)	10 %	Ammoniumpersulfat
IgG Bindepuffer	20 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7
IgG Elutionspuffer	100 mM	Glycin HCl pH 2,7
Neutralisationspuffer	1 M	Tris HCl pH 9
5x Laemmli Puffer	250 mM, pH 7,5	Tris-HCl
	500 mM	DTT
	30 %	Glycerol
	5 %	SDS
	0,25 %	Bromphenolblau
1x SDS Laufpuffer	50 mM	Tris
	200 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
		ph 8,3 mit HCL
1x TBS-T	50 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,1 %	Tween20

**Tabelle 3.6:** Puffer und Lösungen (Fortsetzung)

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Zusammensetzung</b>
		pH 7,6-8,0
Transfer-Puffer	39 mM 48 mM 0,037 % 10 %	Glycin Tris SDS Ethanol
SDS (10 %)	10 %	SDS
Tris für das Laufgel	1,5 M	Tris pH 8,8
Tris für das Sammelgel	1 M	Tris pH 6,8
Proteinmarker	2-5 µl pro Gel	Applichem A8889

**Tabelle 3.7:** Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalog-Nr.</b>
5-ml-Säule HiTrap™ G HP	VWR	17-0405
50 ml Perfusorspritzen	Becton Dickinson	2009-11
Dialysierschlauch Visking	Carl Roth	272-0653.1
Aluminiumfolie	Carl Roth	1770.1
Gefrierreaktionsgefäße 1,0 ml	Sarstedt	72.377
Gefrierreaktionsgefäße 1,6 ml	Sarstedt	72.380
Injektionsnadeln (steril)	Becton Dickinson	300 400
Injektionsnadeln (steril)	Becton Dickinson	301 300
Injektionsnadeln (steril)	Becton Dickinson	302 200
Injektionsspritzen 1, 10 und 15 ml	Becton Dickinson	300 147
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging	PM-999
Pasteurpipetten	Brand	7477_15
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Sarstedt	701.130
Pipettenspitzen 10-200 µl	Sarstedt	70.760.002
Pipettenspitzen 10-200 µl	Carl Roth	Y4119.1
Pipettenspitzen 200-1000 µl	Sarstedt	70.762.100
Pipettenspitzen 1-5 ml	Gilson	F161571
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt	72.706, 72.695
Skalpelli (einmal, steril)	Feather (Japan)	02.001.30.010
Transfermembran (PVDF 0,45 µm)	St Cruz	PV4HY000GL

**Tabelle 3.7:** Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung)

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalog-Nr.
Biodyne B Pre-Cut Modified Nylon Membranes, 0,45 µm	ThermoScientific	77016
Vacutainer SST II Advance	Becton Dickinson	367953
Vaculainer multiple Sample Luer Adapter	Becton Dickinson	367300
Vacutainer One Use Holder	Becton Dickinson	364815
Valu-Set	Becton Dickinson	387455
Zentrifugenröhrchen 15 ml	BectonDickson Labware	352070
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BectonDickson Labware	352096

**Tabelle 3.8:** Laborgerätschaften

Geräte	Hersteller	Katalogbezeichnung
<b>Kombigeräte</b>		
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Comfort no frost
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Premium Kombi
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Profi line (+4°C/-20°C)
Kühl/Gefrierschrank	Bosch	Comfort (+4°C/-20°C)
<b>Tiefkühlgeräte (-20°C)</b>		
Gefrierschrank	Siemens	no frost
Gefrierschrank	Liebherr	Premium no frost
<b>Tiefkühlgeräte (-80°C)</b>		
Gefrierschrank	New Brunswick	Ultra Low Freezer
<b>Analysenwaagen</b>		
Feinwaage	Ohaus	Discovery DV 214 CM
Laborwaage	Sartorius	Universal U 5000 D
<b>Zentrifugen</b>		
Tischzentrifuge Fresco 21	Heraeus	Fresco 21
Multifuge 15-R	Heraeus	Multifuge 15-R
GalaxyMiniStar SN	VWR	C1413V
Kühlzentrifuge Mikro 200 R	Hettich	Typ 2405
Tischzentrifuge Espresso	Thermo Elektron	Espresso 11210801
Kühlzentrifuge	Heraeus	Multifuge 1S-R
Kühlzentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5403
Ultrazentrifuge	Sorvall	Ultra Pro 80
Zentrifugeneinsatz	Sorvall	AH-629
<b>Heiz- und Magnetrührer</b>		
Heizrührer	IKA Labortechnik	RH basic
Heizrührer	IKA Labortechnik	RCT basic
Heizrührer	Heidolph	MR3001
Magnetrührer	IKA-Werke	Mini MR standard

**Tabelle 3.8:** Laborgerätschaften (Fortsetzung)

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalogbezeichnung</b>
Magnetrührer	IKA-Werke	Big SquidFroggy
<b>Heizeinheiten</b>		
Heizblock	VWR Digital	Heatblock II
Heizblock	Grant (UK)	QBD2
Mikrowelle	Bosch	HMT 812 B
Thermomixer Comfort	Eppendorf	5355
Wasserbad	Unitherm	WA12
Inkubator	Thermo Scientific	HERA cell 240
<b>Kühlgefäße / Aufbewahrung</b>		
Eismaschine	Ziegler	72898
Dewargefäß N <sub>2</sub>	Isotherm, KGW	26 B/BE
<b>Mischgeräte</b>		
Drehrad	Stuart	SB 2 Rotator
Minishaker (Vortexer)	IKA Labortechnik	MS1
Rütteltisch Titramax	Heidolph	Titramax 100
Taumelrollenmischer	Marienfeld, Karl Hecht	RM 5-40
Rollmischer	VWR	VWR Tube Rotator
<b>Netzgeräte</b>		
Power Source 300 V	VWR	TYP 300 Volt
<b>Elektrophoresekammer</b>		
Proteinelektrophorese	BioRad	Mini Protean 4Cell
Transferkammer	InvitroGen	X Cell II Blot Module
RNA-Elektrophorese	VWR	AGT-2
<b>Cycler</b>		
Peltier Thermal PTC-200	MJ Research	PTC-200
Thermal Cycler PX2	Electron Corporation	PX2
PCR System	Applied Biosystems	7500 Fast Real-Time
<b>Pipettierhilfen</b>		
Einkanalpipetten 0,5–1000 µl	Eppendorf	research
Einkanalpipetten 0,5–1000 µl	Brand	Transferpette S
Einkanalpipetten 10–5000 µl	Gilson	pipetMan
Mehrkanalpipette	Brand	Transferpette-8E
Mehrkanalpipette	VWR	613-5256
Pipettierhilfe	Hirschmann	Pipetus Standard
Pipettierhilfe	Roth	AccuJet
Pipettierhilfe	Neolab	NeoMotion D6016
<b>pH-Messung</b>		
pH-ElektrodeAg/AgCl	VWR	4002-789
pH-Messgerät	VWR	SymbHony SB 70P

**Tabelle 3.8:** Laborgerätschaften (Fortsetzung)

Geräte	Hersteller	Katalogbezeichnung
pH-Lösungen 4,7,10	Orion	910_104/_107_110
<b>Detektionsgeräte/zubehör</b>		
UV-Detektion	Syngene Bio Imaging	Gene Flash
Multiplatten Photometer	Thermo Scientific	Multiskan Ascent 354
Nanodrop	Peqlab Biotechnologie	ND-1000
Blotdetektionseinheit	Syngene Bio Imaging	G-Box XL 1.4
Luminometer	BMG Labtech	FLUOstar OPTIMA
<b>Mikroskope</b>		
Mikroskop	Carl Zeiss	Axiovert CFL
Kamera	Canon	PowerShotA640
<b>Sonstiges</b>		
Perfusor	Braun	secura FT
Messkolben 25-2000 ml	Brandt	Deutschland
Glasflaschen 50-2000 ml	Brandt	Deutschland
Wasserfilteranlage	Millipore	Milli-Q UF Plus

**Tabelle 3.9:** Verwendete Antikörper

Antikörper	kDa	Verwendung	Spezies	Hersteller
<b>Primärantikörper</b>				
βAktin	42	1:5000	Maus	Sigma M4789
cFos	62	1:1000	Kaninchen	abcam
<b>Sekundärantikörper</b>				
anti-Kaninchen-HRPO konjugiert		1:25 000	Esel	Dianova 711-035-152
anti-Maus-HRPO konjugiert		1:25 000	Esel	Dianova 715-035-151

**Tabelle 3.10:** verwendete Primer

Primer	Orientierung	Sequenz
β2 Mikroglobulin	sense	GTGCTCGCGCTACTCTCTCT
	antisense	CGGCAGGCATACTCATCTTT
VEGF	sense	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT
	antisense	ATCTGCATGGTGATGTTGGA
sFlt-1	sense	CTGCAAGATTCAGGCACCTA
	antisense	CCTTTTTGTTGCAGTGCTCA
cJun	sense	CCCCAAGATCCTGAAACAGA
	antisense	CCGTTGCTGGACTGGATTAT
cFos	sense	AGGAGAATCCGAAGGGAAAG
	antisense	CTTCTCCTTCAGCAGGTTGG
SP-1	sense	GCGAGAGGCCATTTATGTGT

**Tabelle 3.10:** verwendete Primer (Fortsetzung)

Primer	Orientierung	Sequenz
ER $\alpha$	antisense	GGCCTCCCTTCTTATTCTGG
	sense	GTGCCTGGCTAGAGATCCTG
	antisense	AGAGACTTCAGGGTGCTGGA
GCF	sense	CCAGAACCCTTGATGTGTCC
	antisense	GGCTGCCTGAATAAAAGCTG

**Tabelle 3.11:** Im EMSA verwendete DNA-Sequenz

Primer	Orientierung	Sequenz
VEGF-EMSA-Sequenz	sense	5'GGGGCGGGCCGGGGCGGGGTCCCGGCGGGGCGGAG
	antisense	3'CCCCGCCCGGCCCGCCCCAGGGCCCGCCGCTC

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 IgG-Gewinnung und -Isolation

Das NTx-IgG wurde aus dem Serum und dem Plasmapherese-Filtrat der NTx-Patienten isoliert. Die Patienten gaben schriftlich ihr informiertes Einverständnis zur wissenschaftlichen Verwendung des Materials (Ethikvotum: EA2/068/07).

Das Kontroll-IgG wurde aus dem Serum von gesunden Mitarbeitern des Labors isoliert. Diese gaben ebenfalls ihr Einverständnis zur Verwendung des Materials.

#### Materialgewinnung und Lagerung

Die Plasmasäcke der Patienten wurden von den Stationen geholt, aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Das Blut der gesunden Kontrollen wurde unter ärztlicher Aufsicht, mit der Hilfe von Valu-Set-Kanülen in Vacutainer-Serumröhrchen abgenommen. Nachdem es für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerinnen konnte, wurde es für 10 Minuten bei 4°C mit 1200 g zentrifugiert. Das Serum wurde unter der Sterilbank in 50er Falcons überführt und bei -80°C gelagert.

#### IgG-Isolation

Die IgG-Isolation wurde mit HiTrap-Protein-G-HP-Säulen durchgeführt. Protein G ist ein Oberflächenprotein von Gruppe-G-Streptokokken, das den Fc-Teil von IgGs bindet. Im Gegensatz zu Protein A (*Staphylococcus aureus*) bindet Protein G alle humanen IgG-Subklassen. Das Patientenmaterial wurde aufgetaut, durch einen 0,45  $\mu$ m Filter gefiltert und 1:1 mit IgG-Bindepuffer verdünnt. Die Säulen wurden mehrfach verwendet und waren zur Lagerung mit 20%igem Ethanol gefüllt.

Zu Beginn wurden die Säulen mit IgG-Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Serum-/Bindepuffermischung auf die Säulen gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und nochmals auf die Säule gegeben, um sicherzustellen, dass alles IgG gebunden wurde. Anschließend wurde die Säule einmal mit IgG-Bindepuffer gewaschen.

Zur Gewinnung der IgGs aus der Säule wurde diese mit Elutionspuffer gespült. Dieser hat einen pH-Wert von 2,7, wodurch die Bindung des IgG an das Protein G aufgehoben wird. Das eluierte IgG wurde sofort im Verhältnis 10:1 mit Neutralisationspuffer versetzt, um eine Schädigung der IgGs durch den unphysiologischen pH-Wert zu verhindern. Anschließend wurde die Säule mit IgG-Bindepuffer gewaschen und es konnte erneut Serum-/Bindepuffermischung aufgetragen werden.

Nach Beendigung der IgG-Isolation wurde die Säule erst mit 0,1%igem Natriumazid und anschließend mit 20% Ethanol gespült und bei 4°C gelagert.

## Dialyse

Da das IgG zur Verwendung in der Zellkultur bestimmt war, wurde es nach der Isolation gegen Dulbeccos modifiziertes Medium (DMEM) dialysiert. Zuerst wurde dazu der Dialyseschlauch durch kurzes Aufkochen aktiviert. Anschließend wurde er mit dem IgG befüllt und an beiden Enden mit Verschlussklammern verschlossen. Die Dialyse erfolgte für 36 Stunden bei 4°C auf dem Magnetrührer, wobei das Medium dreimal gewechselt wurde.

Anschließend wurde das IgG aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration der IgG-Subgruppen wurde im Serum und im Isolat mittels Sandwich-Enzymimmunoassay (ELISA) bestimmt. Die ET<sub>A</sub>R-/AT<sub>1</sub>R- und PAR-1-Autoantikörpertiter wurden ebenfalls mittels Sandwich-ELISA bestimmt.

## 3.2.2 Zellkultur

Die Zellkulturstudien wurden mit HMEC-1 durchgeführt. Bei HMEC-1 handelt es sich um eine Endothelzelllinie, die durch Transfektion mit dem SV40-T-Antigen immortalisiert wurde. Sie wächst schnell und weist zentrale Merkmale von Endothelzellen auf.[55] Die Zellen wurden uns freundlicherweise von Frau Prof. Gabriela Riemekasten zur Verfügung gestellt. Zellen der Passage 21 lagerten in flüssigem Stickstoff bei -162°C in einer Mischung aus 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und 80 % fetalem Kälberserum (FCS).

Alle Gefäße zur Kultivierung der Zellen wurden vor Verwendung für mindestens 20 Minuten mit 0,2%iger Gelatine beschichtet.

### Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden innerhalb von wenigen Minuten auf Raumtemperatur gebracht und in mindestens 15 ml Vollmedium (siehe Tabelle 3.12) suspendiert. Dann wurde mit 200 g für 3 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in

**Tabelle 3.12:** Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien; EBM = Basalmedium für Endothelzellen

	<b>Vollmedium</b>	<b>Minimalmedium</b>
EBM	500 ml	500 ml
Glutamin	10 mM	10 mM
Penicillin	100 E/ml	100 E/ml
Streptomycin	0,1 g/l	0,1 g/l
FCS	5 %	0,5 %
hEGF	10 ng/ml	
Hydrocortison	10 nM	

Vollmedium plus 100 µg/ml Primorcin resuspendiert. Die Zellen wurden in die T75er gegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen für eine Woche in Primorcin kultiviert. Um einer Kontamination mit Mykoplasmen vorzubeugen.

### **Passagierung der Zellen**

Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit wachsen gelassen, bis sie konfluent waren. Dann wurde das Medium abgesaugt und 3 ml Trypsin + 0,5 mM Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) auf die Zellen gegeben und für 5 Minuten inkubiert. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft und eventuell durch leichtes Klopfen unterstützt. Anschließend wurde die Zellsuspension zusammen mit Vollmedium in ein 15 ml Falcon überführt. Das im Medium enthaltene FCS beendet die Enzymaktivität des Trypsins. Anschließend wurde für 3 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in Vollmedium resuspendiert. Die Zellzahl je ml wurde mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen entsprechend verdünnt. Für die Weiterpassage wurden 1-2 Millionen Zellen in eine T75er Flasche gegeben.

### **Stimulationsexperimente**

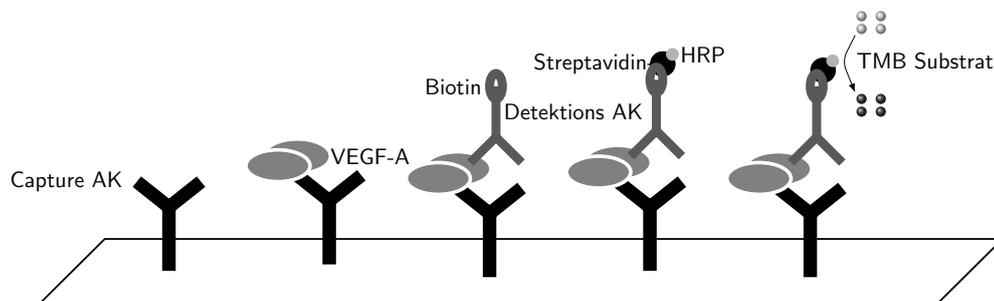
Für die RNA-Isolation und die Analyse der VEGF und sFlt-1 Sekretion wurden 150 000 Zellen pro Vertiefung in 6-Lochplatten ausgesät und wachsen gelassen, bis sie eine Konfluenz von 80-90 % erreichten. Für die Kernprotein-Extraktionen wurden je 500 000 Zellen in 10 cm Schalen ausgesät und ebenfalls bis zu einer Konfluenz von 80-90 % wachsen gelassen. 16 Stunden vor dem Experiment wurden die Zellen mit Minimalmedium (siehe Tabelle 3.12) ruhiggestellt. Die Stimulanzen wurden ohne Medienwechsel auf die entsprechenden Vertiefungen gegeben und durch sanftes Schwenken verteilt. Bei Stimulation mit IgG wurde die Kontrolle mit einer entsprechenden Menge DMEM Low Glucose behandelt.

Bei Experimenten mit Blockern wurden diese 1-3 Stunden vor der Stimulation zu den Zellen gegeben und ebenfalls durch sanftes Schwenken verteilt. Lösungsmittelkontrollen wurden durchgeführt.

Die Überstände wurden nach Beendigung der Experimente abgenommen, in Mikroreaktionsgefäße überführt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3 ELISA

Der ELISA ist ein Antikörper-basiertes Verfahren, mit dem sowohl Proteine als auch niedermolekulare Verbindungen in einer Probe nachgewiesen werden können.



**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA AK = Antikörper, TMB = 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

Für diese Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA verwendet. Hierbei kommen zwei Antikörper zum Einsatz, die beide das gesuchte Molekül an verschiedenen Epitopen binden. Der erste Antikörper ist an eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gebunden. Das Probenmaterial wird auf der Platte inkubiert und die gesuchten Moleküle binden an den Antikörper. Ungebundene Bestandteile werden abgewaschen und in einem nächsten Schritt wird ein Sekundärantikörper mit den Proben inkubiert, der spezifisch markiert ist, z. B. durch ein Enzym oder durch Biotin. Dieser bindet nun an die gesuchten Moleküle, sodass sie wie in einem Sandwich von zwei Antikörpern eingeschlossen sind. Zur Detektion werden, je nach Markierung, gleich das Substrat oder in einem Zwischenschritt ein an Streptavidin gebundenes Enzym und anschließend das Substrat hinzugegeben. Das Substrat verändert durch enzymatische Umbauprozesse seine Farbe. Durch eine mitgeführte Standardreihe aus rekombinantem Protein kann dann die Konzentration des gesuchten Moleküls in den Lösungen bestimmt werden.

#### VEGF-ELISA

Für den VEGF-ELISA wurde ein Antikörperpaar von Invitrogen sowie das dazugehörige Puffer-Kit verwendet. Gemäß den Herstellerangaben wurden alle Proben und Standards in Doppelbestimmung durchgeführt. Der Erstantikörper (Capture-Antikörper) wurde mit Coating-Puffer B aus dem Kit auf  $1,25\ \mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnt und zum Beschichten über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf die Platte gegeben. Nicht gebundene Antikörper wurden abgewaschen und freie Bindungsstellen auf der Platte mit Assay-Puffer aus dem Kit für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden die Proben zusammen mit Inkubationspuffer dazugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Überstände wurden abgewaschen und der in der Detektions-Antikörper-Lösung auf  $0,025\ \mu\text{g}/\text{ml}$  verdünnte Detektions-Antikörper

wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Proben inkubiert. Die nicht gebundenen Anteile wurden erneut abgewaschen und an Streptavidin gebundene Meerrettichperoxidase wurde für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur auf den Proben inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben und für eine halbe Stunde im dunklen bei Raumtemperatur inkubiert. TMB wird durch die Meerrettichperoxidase zu 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Diimine oxidiert. Durch die Zugabe von 1-molarer Schwefelsäure erfolgte der Farbumschlag von blau zu gelb. Mit dem Photometer wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Die Referenzmessung erfolgte bei 690 nm. Die Werte der Referenzmessung wurden von den Werten bei 450 nm abgezogen, um optische Fehler in der Platte zu berücksichtigen. Der Mittelwert der Leerwerte wurde von allen Werten abgezogen.

### **SFlt-1-ELISA**

Es wurde ein Kit von R&D Systems verwendet. Dieses enthielt vorbeschichtete Mikrotiterstreifen.

Die Herstelleranweisungen wurden befolgt. Der sFlt-1-Standard wurde in ddH<sub>2</sub>O gelöst und die Standardreihe wurde mit der Calibrator-Verdünnungslösung hergestellt. Als Blank diente die Calibrator-Verdünnungslösung. Das Probenmaterial wurde zusammen mit Assay-Verdünner im Verhältnis 1:1 in die Vertiefungen gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundenes Material abgewaschen und VEGF-R1-Konjugat dazugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde die Substratlösung dazugegeben. Diese wurde 5 Minuten vor Verwendung aus Farb-Reagenz A und Farb-Reagenz B (im Verhältnis 1:1) hergestellt und anschließend für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Durch die Zugabe der Stop-Lösung wurde die Reaktion beendet. Die Messung erfolgte, wie für den VEGF-ELISA beschrieben.

### **3.2.4 RNA-Aufreinigung und -Analyse**

Alle verwendeten Mehrwegmaterialien und die Arbeitsflächen wurden vor Arbeitsbeginn mit RNaseZap gereinigt. Es wurde mit Filterspitzen gearbeitet.

#### **RNA-Aufreinigung mit isol-RNA-Lysis-Reagenz**

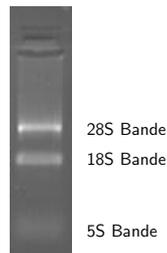
Die Zellen wurden mit phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend mit isol-RNA-Lysis-Reagenz lysiert. Das im Trizol enthaltene Guanidiniumthiocyanat inaktiviert RNAsen. Daneben lösen sich im Phenol Desoxyribonucleinsäure (DNA) und Proteine. Durch die Zugabe von Chloroform und anschließende Zentrifugation bei 12 000 g und 4°C erfolgte eine Trennung in drei Phasen: eine obere klare Wasserphase, in der die RNA gelöst

ist; eine Interphase, in der sich die DNA befindet und eine Phenolphase, in der sich die Proteine befinden.

Die Wasserphase wurde vorsichtig abgenommen und die RNA mit Isopropanol gefällt. Anschließend wurde die RNA zweimal mit reichlich Ethanol gewaschen, getrocknet und in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Die Konzentration wurde durch Messung der optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

## Überprüfung der Reinheit der RNA durch Gelelektrophorese



**Abbildung 3.2:** Repräsentatives Beispiel einer RNA Gelelektrophorese zur Kontrolle der RNA-Qualität

Für die Elektrophorese zur Überprüfung der Reinheit und Intaktheit der RNA wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Um die RNA sichtbar zu machen, wurde dem Gel Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) hinzugegeben. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der RNA, wodurch seine Eigenfluoreszenz um den Faktor 50-100 verstärkt wird. Als Laufpuffer wurde 1x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) verwendet. Für Jede Probe wurde der folgende Ansatz (siehe Tabelle 3.13) zusammen pipettiert und in die Taschen gegeben.

**Tabelle 3.13:** Probenansatz für das RNA-Gel

Komponente	Menge
RNA	100 ng
Ladepuffer	2,33 µl
DEPC ddH <sub>2</sub> O	auf 14 µl

Die Elektrophorese erfolgte bei 80 Volt (V) für 30 Minuten. Anschließend wurde das Ethidiumbromid mit ultraviolettem (UV) Licht sichtbar gemacht. Bei intakter RNA waren drei Banden zu sehen: die 28S-Bande, die 18S-Bande (hier sollte das Intensitätsverhältnis bei 2:1 liegen) und die deutlich schwächere 5S-Bande (siehe Abbildung 3.2). Eine Kontamination mit genomischer DNA zeigt sich durch ein Signal auf Höhe der Geltaschen.

## Erstellung von cDNA aus RNA

Die RNA wurde für die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Für diesen, als reverse Transkription (RT)

bezeichneten Vorgang, wurde für jede Probe der folgende Ansatz zusammengemischt (siehe Tabelle 3.14).

**Tabelle 3.14:** Ansatz für die reverse Transkription

Komponente	Menge
RNA	1000 ng
10x Puffer	5 $\mu$ l
dNTP's	8 $\mu$ l
RNase Inhibitor	0,4 U/ $\mu$ l
Oligo dT's	0,33 $\mu$ l
mLuv Reversetranskriptase	1 U/ $\mu$ l
DEPC ddH <sub>2</sub> O	auf 50 $\mu$ l

**Tabelle 3.15:** Ansatz für eine qRT-PCR-Messung

Komponente	Menge
cDNA	20 ng
Primer sense	0,192 $\mu$ M
Primer antisense	0,192 $\mu$ M
SYBR-Green	4 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	auf 13 $\mu$ l

Die Reaktion wurde für 45 Minuten bei 42°C mit einem anschließenden Inaktivierungsschritt von 5 Minuten bei 90°C durchgeführt. Gelagert wurden die cDNA-Proben bei -20°C.

### Analyse der Genexpression durch qRT-PCR

Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qRT-PCR mit produktspezifischen Primern. Die qRT-PCR wurde in Anwesenheit des Farbstoffes SYBR-Green durchgeführt, welcher sich an doppelsträngige (ds)DNA anlagert und in dieser gebundenen Form fluoresziert. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus[56].

Die Messung erfolgte für jede Probe in Doppelbestimmung. Der Ansatz für eine Messung setzte sich, wie in Tabelle 3.15 dargestellt, zusammen.

### 3.2.5 Promoterdeletionsanalysen

Die verwendeten VEGF-Promoterplasmide wurden uns freundlicherweise von Dr. A. Scholz zur Verfügung gestellt. Ihre Konstruktion erfolgte durch Finkenzeller et al.[57] Unterschiedlich lange Abschnitte des VEGF-Promoters waren jeweils mit dem Gen der Leuchtkäfer-Luciferase gekoppelt, sodass nach erfolgreicher Transfektion der Zellen eine Aktivierung des Promoters zur Produktion der Luciferase führte. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde ein Plasmid mit dem Gen der Renilla-Luciferase unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Cytomegalievirus (CMV)-Promoters ko-transfiziert. Dieses wurde bei der Firma Promega erworben.

Die Leuchtkäfer-Luciferase katalysiert in Anwesenheit von Magnesium die Reaktion von Luciferin zu Oxyluciferin, wobei O<sub>2</sub> und Adenosintriphosphat (ATP) verbraucht werden. Die Renilla-Luciferase verbraucht bei der Umwandlung von Coelenterazine zu Coelenteramid nur O<sub>2</sub>.

Die Aktivität der jeweiligen Enzyme wurde mit dem Photometer gemessen und anschließend die Aktivität der Leuchtkäfer-Luciferase auf die Aktivität der Renilla-Luciferase normalisiert.

## Transfektion

Es wurden 100 000 Zellen pro Vertiefung in 6-Lochplatten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % wachsen gelassen. Die Zellen wurden über Nacht mit Minimalmedium stillgelegt. Die Transfektion erfolgte mit Turbofect.

**Tabelle 3.16:** Transfektionsansatz für eine 6-Well-Vertiefung

<b>Komponente</b>	<b>Menge</b>
Minimalmedium	500 $\mu$ l
Turbofect	2 $\mu$ l
Renilla Plasmid	10 ng
DNA	1 $\mu$ g

Der Transfektionsansatz (siehe Tabelle 3.16) wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das alte Medium wurde abgesaugt und 1,5 ml frisches Minimalmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Vertiefungen verteilt und die ganze Platte noch einmal sanft geschwenkt. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium ersetzt.

## Stimulation

Die Stimulation erfolgte 8–20 Stunden nach der Transfektion. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und durch Minimalmedium mit den Stimulanzen ersetzt.

Beim Einsatz von Blockern wurde nach dem Absaugen des Mediums dieses durch Minimalmedium mit den Blockern ersetzt. Die Stimulanzen wurden nach ca. 3 Stunden tropfenweise dazugegeben und durch Schwenken verteilt.

## Lyse der Zellen und Messung der Luciferase-Aktivität

Die Messung der Luciferase Aktivität erfolgte mit dem Dual-Luciferase-Renilla-Assay (DLRA) Kit der Firma Promega. Nach dem Absaugen des Mediums und einmaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen für 5 Minuten mit passiven Lysepuffer (aus dem Kit) auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde je zwei Mal im Wechsel für jeweils 5 Minuten in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Heizblock bei 37°C erwärmt. Durch die starken Temperaturänderungen zerreißen die Zellmembranen ohne dass die Aktivität der Enzyme beeinträchtigt wird. Anschließend wurden die Proben entweder sofort gemessen oder bei -80°C gelagert.

Die Messung erfolgte in 96-Lochplatten mit dem Photometer. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Durch Zugabe der LARII Lösung wurde die Reaktion der Leuchtkäfer-Luciferase gestartet und innerhalb von 5 Minuten gemessen. Anschließend wurde durch die Stop&Glo Lösung die Leuchtkäfer Reaktion gestoppt und die der Renilla-Luciferase gestartet.

### 3.2.6 In-silico-Analysen von Transkriptionsfaktorbindungsstellen im Promoter

Die VEGF Promoter Region zwischen den Basenpaaren -86 und -52 wurde mit der Transkriptionselement Suchsystem-Software (TESS) untersucht. TESS wurde bis vor kurzem online vom Labor für rechnergestützte Biologie und Bioinformatik der Universität von Pennsylvania zur Verfügung gestellt (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>). Sie lokalisiert mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und bewertet die Wahrscheinlichkeit, mit der diese Tatsächlich als Bindungsstelle dienen.

### 3.2.7 Gel Shift Assay(EMSA)

Der Gel Shift Assay (EMSA) ist ein Verfahren, um die Interaktion von Proteinen mit Nukleinsäuren zu detektieren. Es wurde erstmals von Fried und Crothers beschrieben[58] und nutzt die Tatsache, dass proteingebundene Nukleinsäure langsamer durch ein elektrisches Feld wandert als ungebundene. Für die Detektion werden häufig radioaktiv markierte Nukleotide genutzt. Aber auch fluoreszente, chemilumineszente und immunhistochemische Methoden werden angewandt.[59] Chemilumineszenz ist ähnlich sensitiv wie radioaktive Methoden, jedoch ohne gesundheitliche Gefahren. Allerdings besteht durch die Verstärkungskaskade keine Linearität zwischen Substratmenge und Signalstärke.[60]

In diesen Versuchen wurde DNA verwendet, die mit Biotin markiert war. Sie wurde dann mit einem Modul zur chemilumineszenten Detektion von Nukleinsäuren von der Firma Thermo detektiert.

Der Verwendete DNA-Abschnitt war 33 bp lang und entspricht den letzten Basenpaaren des VEGF-Promoters. In ihm finden sich unter anderem Bindestellen für AP-1, SP-1, Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) und GCF. Durch qRT-PCR wurde überprüft, welcher dieser Faktoren durch die Stimulation der Zellen reguliert wurde. Die Spezifität der Bindung wurde nachgewiesen, indem sowohl der zu untersuchende DNA-Abschnitt als auch unspezifische DNA unmarkiert im Überschuss zu den Proben gegeben wurde.

Jeweils am Tag vor der Durchführung des EMSA wurden alle dafür benötigten Materialien gründlich gereinigt und über Nacht in ddH<sub>2</sub>O eingelegt.

### Kernproteinisolation

Für die Kernproteinisolation wurde das NE-PER-Kit von Thermo Scientific genutzt. Zu den Lösungen Cytoplasmatische Extraktions Reagenz I (CER I) und Kernprotein-Extraktions-Reagenz (NER) wurde direkt vor Verarbeitung Complete Protease Inhibitor Coctail der Firma Roche zu gegeben (im Verhältnis 1:100). Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zentrifuge wurde vor Arbeitsbeginn auf 4°C gekühlt. Auch zwischen den Zentrifugationsschritten wurde die Kühlung aufrechterhalten.

Zuerst erfolgte die Lyse der cytoplasmatischen Membran und die anschließende Pelletierung der Zellkerne durch Zentrifugation. Der Überstand mit den cytoplasmatischen Proteinen wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Anschließend wurde die Kernmembran lysiert und die Kernproteine durch wiederholte Agitation freigesetzt. Auch die Kernproteine wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Messung wurde mit einem Kit der Firma Bio Rad durchgeführt. Dieses basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry[61] und enthält die Lösungen A, S und B. In alkalischer Lösung bilden Kupferionen Komplexe mit den Proteinen. Anschließend tritt durch Reduktion mit Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz eine intensive Blaufärbung auf.

Für die Standardreihe wurde Bovines Serumalbumin (BSA) in Wasser gelöst. Die Standardreihe erstreckte sich von 0 mg/ml bis 2 mg/ml. Die Messung erfolgte in einer 96-Loch-Platte und alle Messpunkte wurden in Doppelbestimmung angelegt.

Zu 5  $\mu\text{l}$  unverdünnter Proteinlösung wurden 25  $\mu\text{l}$  einer Mischung aus Lösung A und S gegeben (im Verhältnis 50:1). Das Ganze wurde sofort mit 200  $\mu\text{l}$  der Lösung B vermischt und schließlich für 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 690 nm gemessen. Der Hintergrund (Messwert für reines Wasser) wurde von allen Werten abgezogen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Standardreihe ermittelt.

### Markierung der DNA und Oligo-Anleaning

Die Biotinylierung wurde mit einem Kit der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Es nutzt die Terminale deoxynucleotidyl Transferase (TdT),[62] um Biotin-11-dUTP an das 3'-Ende der Einzelstrang (ss)-DNA anzufügen. Dazu wurde für beide Polaritäten der in der Tabelle 3.17 dargestellte Ansatz pipettiert.

**Tabelle 3.17:** Ansatz für die Biotynilierung der DNA-Einzelstränge

Komponente	Menge
5x TdT-Reaktionspuffer	10 $\mu\text{l}$
ssDNA	0,5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$
Biotin-11-dUTP	5 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$
TdT	0,5 U/ $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 $\mu\text{l}$

**Tabelle 3.18:** Synthese der Doppelstrang-DNA

Komponente	Menge
biotinilierte ssDNA sense	0,225 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$
biotinilierte ssDNA antisense	0,225 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$
20x SSC	2,5 $\mu\text{l}$
ddH <sub>2</sub> O	auf 50 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 2,5  $\mu\text{l}$  von 0,2 M EDTA abgestoppt. Die überschüssigen Biotin-11-dUTPs wurden mit einer Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (Verhältnis 24:1) von der biotinylierten DNA getrennt. Zur Synthese der dsDNA wurde folgender Ansatz (siehe Tabelle 3.18) für 5 Minuten auf  $90^{\circ}\text{C}$  erhitzt und anschließend von  $80-55^{\circ}\text{C}$  um  $1^{\circ}\text{C}$  pro Minute abgekühlt. Anschließend blieb der Ansatz für 1 Stunde bei  $25^{\circ}\text{C}$  und wurde dann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## Gelelektrophorese

Die ersten vier Bestandteile aus der Tabelle 3.19 wurden gründlich gemischt und anschließend die Polymerisation mit N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) gestartet. Dabei polymerisiert das Acrylamid in der Gegenwart von Radikalen und bildet netzförmige Strukturen.

**Tabelle 3.19:** Zusammensetzung eines 6%igen Polyacrylamidgels (Menge Ausreichend für 2 Gele)

Komponente	Menge
5x TBE	2,4 ml
Acrylamid 37,5:1	4,8 ml
ddH <sub>2</sub> O	16,8 ml
APS (10%)	100 µl
TEMED	20 µl

**Tabelle 3.20:** Probenzusammensetzung für den EMSA. Die kursiv gesetzten Bestandteile wurden nur in bestimmten Proben verwendet

Komponente	Menge
10xBindepuffer	2 µl
Poly(dI:dC)	0,05 µg/µl
biotinilierte dsDNA	22,5 nM/µl
<i>nicht biotinilierte dsDNA</i>	2 µM
Kernproteine	10 µg
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl

Die Gelelektrophorese erfolgte bei 4°C und mit 100 V. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel für mindestens eine Stunde ohne Proben laufen gelassen. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet.

Beim Mischen der Ansätze für den EMSA (siehe Tabelle 3.20) wurde darauf geachtet, dass die Kernproteine als letztes dazu gegeben wurden, damit diese auf optimale Pufferkonzentrationen treffen [59]. Die Proben wurden durch Auf- und Abpipettieren gemischt, da das Mischen mit dem Vortexer zu anhaltendem Zerreißen der Protein-DNA-Interaktion führt [58]. Nach einer 40-minütigen Inkubation wurden die Proben mit 5 µl 5x Ladepuffer versetzt und für etwa 1 Stunde laufen gelassen.

## Blotten und Detektion

Vor dem Blotten wurde die Membran zum Äquilibrieren für 10 Minuten in 0,5x TBE eingelegt. Anschließend erfolgte der Blot bei 200 Milliampere (mA) für 1 Stunde. Als Puffer diente auch hier 0,5x TBE. Zum Blocken, Waschen und Detektieren wurde das Chemilumineszenz Kit der Firma Thermo verwendet. Detektiert wurde mit einer Chemilumineszenz-Detektionseinheit von Syngene.

### 3.2.8 Immunoblots

Mit dem Westernblot und angeschlossener Immundetektion kann die Menge eines bestimmten Proteins in einer Proteinlösung semiquantitativ bestimmt werden.

Zuerst werden die Kernproteine mit einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierfür werden die Proteine mit dem Laemmli-Puffer, der Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) enthält, aufgeköcht, wo-

durch sie denaturieren und anschließend mit SDS beladen in ihrer Primärstruktur vorliegen. Da SDS negativ geladen ist, wird die Eigenladung der Proteine überdeckt und ihre Laufgeschwindigkeit durch das Polyacrylamid-Netz hängt nur noch von ihrem Molekulargewicht ab. Das Gel für die SDS-PAGE besteht aus einem unteren Laufgel (siehe Tabelle 3.21) und einem darüber geschichteten Sammelgel (siehe Tabelle 3.22)

**Tabelle 3.21:** Ansatz für ein Laufgel (10 %)

Komponente	Menge
ddH <sub>2</sub> O	4 ml
Acrylamid 37,5:1	3,3 ml
Tris 1,5M pH 8,8	2,5 ml
10%-SDS	100 µl
10%-APS	100 µl
TEMED	10 µl

**Tabelle 3.22:** Ansatz für ein Sammelgel (5 %)

Komponente	Menge
ddH <sub>2</sub> O	2,1 ml
30%-AA-mix	500 µl
Tris 1M pH 6,8	380 µl
10%-SDS	30 µl
10%-Ammoniumpersulfat (APS)	30 µl
TEMED	5 µl

Die SDS-PAGE erfolgte in Einfach-SDS-Laufpuffer bei 120 V für ca. 2 Stunden. Die Auftrennung wurde anhand des mitlaufenden Proteinmarkers beurteilt.

Nach der SDS-PAGE werden die Proteine mit Einfach-Transferpuffer für eine Stunde bei 100 V auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran geblottet und freie Proteinbindungsstellen mit einer 1%igen BSA-Lösung geblockt. Für die Immundetektion wurden die Blots über Nacht im, in 1%-BSA verdünnten, cFos-Primärantikörper inkubiert und am nächsten Tag nach gründlichem Waschen für eine Stunde im, in 4%iger Milch gelösten, Sekundärantikörper inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz in der Blot-Detektionseinheit. Für die Ladekontrolle erfolgte nach nochmaligem gründlichen Waschen die Inkubation im  $\beta$ -Aktin-Primärantikörper über Nacht.

### 3.2.9 Gezielte Ausschaltung des cFos-Gens durch siRNA

Kurze interferierende RNA (siRNA) sind kurze, doppelsträngige RNA-Stücke, die Gene, zu denen sie abschnittsweise homolog sind, in ihrer Aktivität herabregulieren können[63]. Dies wird in der Forschung genutzt, um durch von außen in die Zelle eingebrachte siRNA einzelne Gene herabzuregulieren oder sogar auszuschalten.

Es wurden 100 000 Zellen pro Vertiefung in 6-Lochplatten bzw. 650 000 Zellen in 10-cm-Schalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % wachsen gelassen. Die Zellen wurden über Nacht mit Minimalmedium stillgelegt. Die Transfektion erfolgte mit Turbofect. Die siRNA wurde in mit DEPC-behandeltem ddH<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 10 µM gelöst und es wurden 1,06 µM/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Vom Turbofect wurden 0,21 µl/cm<sup>2</sup> eingesetzt. Turbofect und siRNA wurden in Minimalmedium gemeinsam vorinkubiert und anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel zu Vollmedium. Nach noch einmal 8 Stunden wurden die Zellen über Nacht mit Minimalmedium stillgelegt.

Die IgG wurden ohne Medienwechsel auf die entsprechenden Vertiefungen gegeben und durch sanftes Schwenken verteilt. Die Kontrolle mit einer entsprechenden Menge DMEM Low Glucose behandelt.

### **3.2.10 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism Software 6.0 durchgeführt (GraphPad Software, La Jolla, CA). Die Ergebnisse wurden mittels univariater Varianzanalyse auf Signifikanz getestet. Dabei wurde je nach Bedarf die einfaktorielle bzw. die zweifaktorielle Varianzanalyse gewählt. Als statistisch signifikant wurde  $p < 0,05$  gewählt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Regulation der endothelialen VEGF-Transkription und -Freisetzung durch NTx-IgG

Die in den Experimenten verwendeten Antikörper wurden von Patienten mit Nierentransplantatabstoßung isoliert, die positiv für AT<sub>1</sub>R-, ET<sub>A</sub>R- und PAR-1-Antikörper waren. Es wurde gezeigt, dass Autoantikörper gegen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R in der Nierentransplantatabstoßung eine pathogenetische Rolle spielen können[9]. Die Antikörpertiter wurden sowohl im Serum als auch im Isolat mittels eines Sandwich-ELISA bestimmt. Als positiv galten Werte > 9,23 Einheiten für AT<sub>1</sub>R-Antikörper und > 10,4 Einheiten für ET<sub>A</sub>R-Antikörper[10]. Die Gesamtkonzentration der IgGs sowie die der einzelnen Subgruppen wurde ebenfalls mittels Sandwich-ELISA bestimmt. Dabei gab es Variationen in den IgG-Konzentrationen, sowohl zwischen den Isolaten von verschiedenen Patienten, als auch zwischen den einzelnen Isolationen eines Patienten. Weiterhin unterschieden sich die Verhältnisse der IgG-Subgruppen zueinander teilweise deutlich zwischen dem Serum und den Antikörperisolaten.

### 4.1.1 NTx-IgG vermittelte mRNA-Expression und -Sekretion

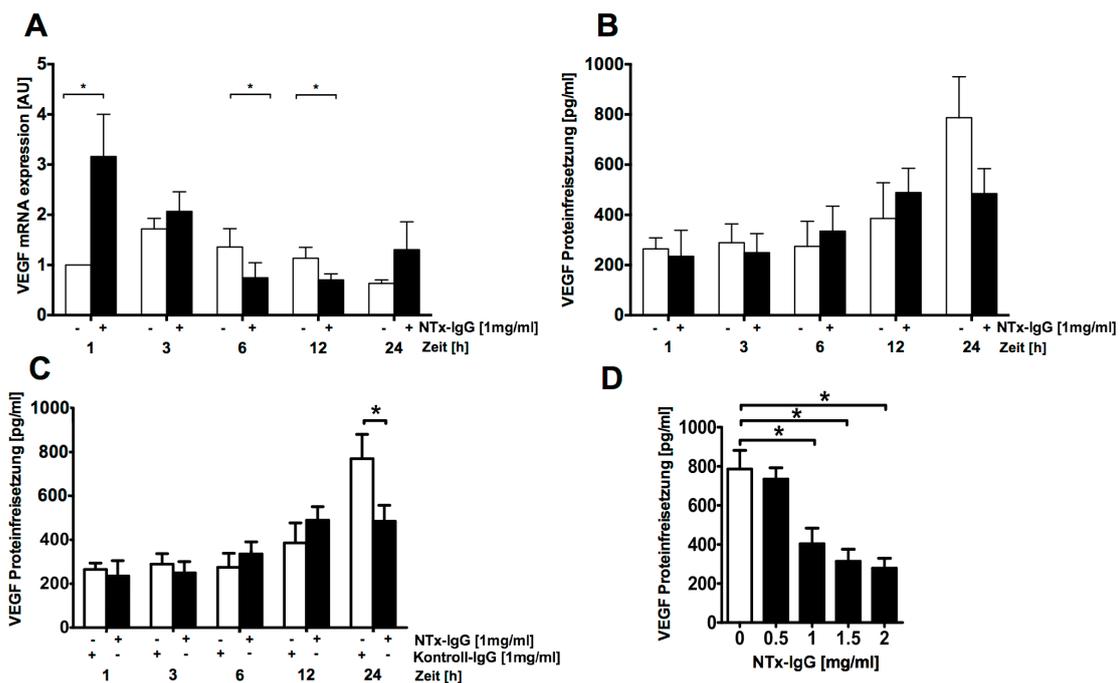
VEGF ist ein Wachstumsfaktor für endotheliale Zellen, der in vielen Krankheitsbildern eine pathophysiologische Rolle spielt. Dabei sind bei dem Einfluss von VEGF in unterschiedlichen Nierenerkrankungen deutliche Unterschiede zu erkennen. Bei der thrombotischen Mikroangiopathie der Nierengefäße scheint der Effekt protektiv zu sein[37], während erhöhte VEGF-Spiegel in der diabetischen Nephropathie eher zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes führen. Nach Nierentransplantationen konnte gezeigt werden, dass sowohl zu hohe als auch zu niedrige VEGF-Spiegel in der Biopsie mit einer Verschlechterung des Outcomes assoziiert sind [64].

Zur Einschätzung des zeitabhängigen Einflusses des NTx-IgG wurden die Zellen für eine, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden mit dem IgG in einer Endkonzentration von 1 mg/ml oder dem entsprechenden Volumen DMEM stimuliert. Die Stimulation der HMEC-1 mit NTx-IgG führte zu einem 3-fachen Anstieg der VEGF-mRNA ( $p < 0,0001$ ) nach einer Stunde. Nach sechs und zwölf Stunden zeigte sich ein deutlicher Abfall der VEGF-mRNA im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (0,5-fach und 0,6-fach,  $p = 0,043$ ) (Siehe Abbildung 4.1 A). Auf Proteinebene zeigte sich nach 24 Stunden eine deutliche, aber nicht signifikante ( $p = 0,065$ ) Reduktion der VEGF-Sekretion von 769 pg/ml ( $\pm 111$  pg/ml) auf 485 pg/ml ( $\pm 72$  pg/ml) (Siehe Abbildung 4.1 B). Dies zeigte sich sowohl im Vergleich zu mit Kontrollmedium stimulierten Zellen als auch im Vergleich zu mit IgG von gesunden Probanden stimulierten Zellen

(Siehe Abbildung 4.1 C). Im Vergleich mit der Stimulation mit Kontroll-IgG erreichte das Ergebnis Signifikanz.

Weiterhin fiel auf, dass das VEGF-Basisniveau nach 24 Stunden gegenüber dem 1-Stundenwert stark anstieg. Hier war ein Anstieg des Mittelwertes von 265 pg/ml ( $\pm 29$  pg/ml) auf 769 pg/ml ( $\pm 111$  pg/ml) ( $p = 0,002$ ) zu beobachten.

Nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen NTx-IgG zeigte sich nach 24 Stunden eine Herabregulation der VEGF-Sekretion von 769 pg/ml ( $\pm 111$  pg/ml) auf 400 pg/ml ( $\pm 72$  pg/ml) nach einer Stimulation mit 1 mg/ml sowie auf 350 pg/ml und 300 pg/ml nach der Stimulation mit 1,5 und 2 mg/ml (Siehe Abbildung 4.1 D).



**Abbildung 4.1:** Analyse der VEGF-A-mRNA-Expression mittels qRT-PCR (Angabe in relativen Einheiten) und der Proteinsekretion mittels ELISA (Angabe in pg/ml). Die Zellen wurden für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden entweder mit NTx-IgG oder mit Kontroll-IgG stimuliert. (A) VEGF-mRNA-Expression der mit NTx-IgG stimulierten Zellen im Vergleich zu mit Kontrollmedium stimulierten Zellen ( $n = 3$ ,  $* p < 0,05$ ) (B) VEGF-Sekretion der mit NTx-IgG behandelten Zellen im Vergleich zu mit Kontrollmedium stimulierten Zellen ( $n = 3$ ) (C) VEGF-Sekretion der mit NTx-IgG behandelten Zellen im Vergleich zu mit Kontrollmedium stimulierten Zellen ( $n = 6$ ,  $* p < 0,05$ ) (D) Die Zellen wurden für 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen NTx-IgG stimuliert. Dargestellt ist die VEGF-Sekretion im Vergleich zu Zellen, welche mit Kontrollmedium stimuliert wurden ( $n = 4$ ,  $* p < 0,05$ ).

Die Behandlung der Zellen mit NTx-IgG führt zu einer Herabregulation der VEGF-mRNA-Expression sowie -Proteinsekretion nach zwölf bzw. 24 Stunden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl im Vergleich zu Zellen, welche mit Kontroll-IgG stimuliert wurden als auch im Vergleich zu Zellen, welche nicht mit Kontroll-IgG stimuliert wurden. Weiterhin zeigte sich ein Dosisseffekt mit stärkerer Suppression bei höheren Konzentrationen.

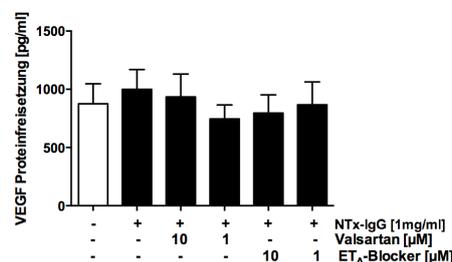
### 4.1.2 Rezeptorspezifität der VEGS-Sekretion

Funktionelle Antikörper gegen  $AT_1R$  und  $ET_A R$  wurden bei Patienten mit akuter Nierentransplantatabstoßung beschrieben[9]. Auch in der Präeklampsie und in der malignen Hypertonie wurde eine pathogenetische Funktion von  $AT_1R$ -Antikörpern beschrieben [4, 18]. Spezifische Inhibitoren für  $AT_1R$  und  $ET_A R$  blockieren auch die funktionellen Effekte der Antikörper. Bei Patienten mit Nierentransplantatabstoßung, die  $AT_1R$ -Autoantikörper-positiv waren, konnte das Transplantatüberleben durch eine Behandlung mit Losartan und Plasmapherese signifikant verbessert werden [9].

Die HMEC-1 wurden für eine Stunde entweder mit dem  $AT_1R$ -Antagonisten Valsartan oder mit dem  $ET_A R$ -Antagonist BQ123 vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit Patienten-IgG stimuliert. Valsartan zeigte bei einer Konzentration von 1  $\mu M$  eine Reduktion der VEGF-Sekretion von 1000 pg/ml ( $\pm 169$  pg/ml) auf 746 pg/ml ( $\pm 120$  pg/ml) bei NTx-IgG stimulierten Zellen. Dieser Effekt erreichte keine Signifikanz, außerdem zeigten die IgG-stimulierten Zellen im Vergleich mit den Kontrollen keinen deutlichen Effekt bzw. eher eine Hochregulation.

Der  $ET_A R$ -Antagonist führte allenfalls zu einer leichten Reduktion der VEGF-Sekretion.

Die Vorbehandlung der Zellen mit  $AT_1R$ - und  $ET_A R$ -Blockern alleine beeinflusste die VEGF-Sekretion nicht.



**Abbildung 4.2:** Bestimmung der VEGF-A-Sekretion mittels ELISA. Die Zellen wurden für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen des  $ET_A R$ -Blockers BQ123 und des  $AT_1R$ -Blockers Valsartan vorgeblockt und anschließend für 24 Stunden mit NTx-IgG ( $n = 5$ ) behandelt (in pg/ml).

Ebenso wie der  $AT_1R$  und der  $ET_A R$  gehört der PAR-1 zu den GPCR und es wurden Autoantikörper gegen ihn bei Patienten mit Raynaud-Syndrom und Herz-Kreislauf-Erkrankungen beschrieben[12]. Der PAR-1 gehört zu einer Familie von GPCR, die durch Proteinasen aktiviert werden. Er wurde erstmalig durch Vu et al. (1991) auf Thrombozyten und Endothelzellen beschrieben[13]. Der Ligand ist ein Bestandteil des Rezeptors und wird durch die Abspaltung einer N-terminalen Peptidsequenz demaskiert. Bei PAR-1 erfolgt diese Spaltung vor allem durch Thrombin[15]. Thrombin ist eine Serinproteinase, die eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung der Gerinnung und von Thrombozyten spielt. Daneben wird ihr auch ein Einfluss auf Tumorwachstum, Metastasierung, Apoptose, pathologischen Gewebsumbau und Entzündung zugeschrieben[53].

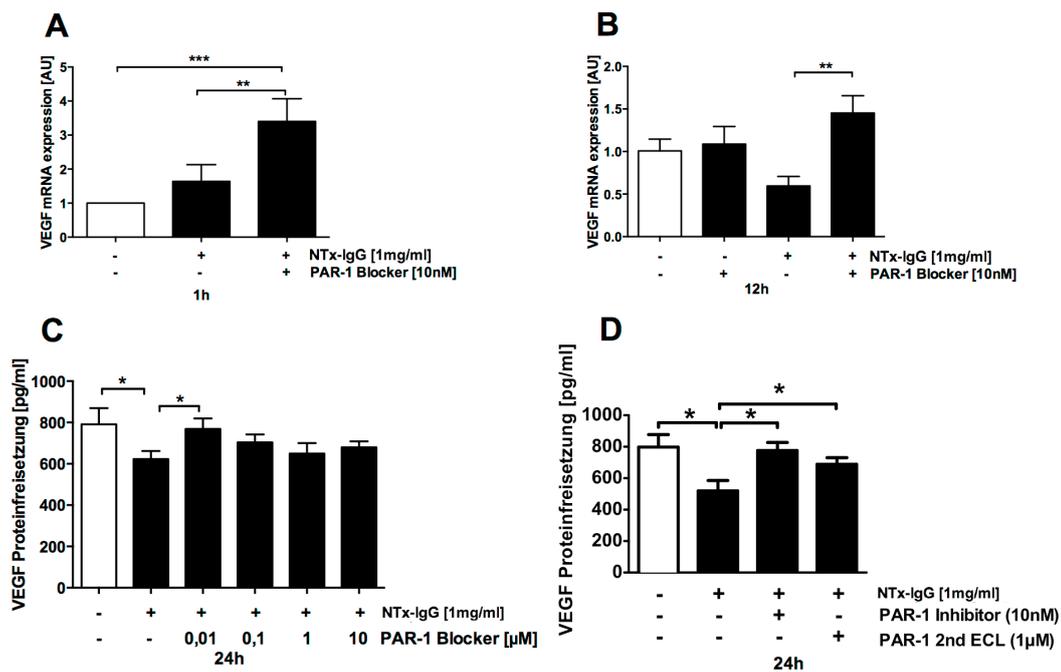
Eine Hemmung des PAR-1 kann durch Peptidsequenzen erfolgen, welche dem natürlichen Liganden ähneln, den Rezeptor aber nicht aktivieren und eine stärkere Bindung zum Rezeptor aufweisen. Ein solches Peptid ist BMS200261[65]. Gegen GPCR gerichtete Antikörper binden bevorzugt an der 2. extrazellulären Schleife (2. ECL) der Rezeptoren[11]. Durch Inkubation von Antikörpern mit einer Peptidsequenz, welcher dem 2. ECL des entsprechenden Rezeptors entspricht, wird die Bindungsstelle des Antikörpers blockiert und somit die Aktivität der Antikörper gehemmt. Dies stellt somit eine weitere Möglichkeit zur Inhibition der Antikörperwirkung dar.

Nach der Vorbehandlung der Zellen mit dem PAR-1-Inhibitor BMS200261 und anschließender Stimulation mit NTx-IgG stiegen die VEGF-mRNA-Level im Vergleich zu denen, die nur mit NTx-IgG stimulierten Zellen um den Faktor 2 nach einer Stunde ( $p < 0,05$ ) und um den Faktor 2,4 nach zwölf Stunden ( $p < 0,01$ ). Der PAR-1-Blocker allein zeigte nach zwölf Stunden keinen Effekt auf die VEGF-mRNA (Siehe Abbildung 4.3 A und B).

Nach 24 Stunden führte die Stimulation mit NTx-IgG zu einer Reduktion der VEGF-Freisetzung von 791 pg/ml ( $\pm 78$  pg/ml) auf 623 pg/ml ( $\pm 39$  pg/ml) bzw. 519 pg/ml ( $\pm 54$  pg/ml) (Siehe Abbildung 4.3 C und D). Die Vorbehandlung mit dem PAR-1-Blocker führte zu einer Normalisierung der VEGF-Proteinfreisetzung wobei sich 10 nM als am wirksamsten erwies ( $769 \pm 51$  pg/ml).

Die Inkubation der IgGs mit dem 2. ECL für eine Stunde vor der Zugabe zu den Zellen, führte ebenfalls zu einer Normalisierung der VEGF-Proteinfreisetzung (Siehe Abbildung 4.3 D).

Zusammenfassend zeigte sich eine Herabregulation der VEGF-Sekretion durch die Stimulation mit NTx-IgG. Diese wurde durch die spezifische Inhibierung der  $AT_1R$ - und  $ET_A R$ -Rezeptoren nicht beeinflusst. Durch die spezifische Inhibierung des PAR-1 konnte die VEGF-Sekretion normalisiert werden. Somit ist davon auszugehen, dass die Herabregulation der VEGF-Sekretion durch PAR-1-Autoantikörper vermittelt wird.



**Abbildung 4.3:** Analyse der VEGF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR (Angabe in relativen Einheiten) und -Proteinsekretion mittels ELISA (Angabe in pg/ml) nach Vorbehandlung der Zellen mit dem PAR-1-Blocker BMS200261 für eine Stunde vor der Stimulation oder Vorinkubation der IgGs mit dem 2. ECL für eine Stunde vor der Zugabe zu den Zellen. (A) VEGF-mRNA-Expression nach Vorbehandlung der Zellen mit 10 nM PAR-1-Blocker mit anschließender einstündiger Stimulation mit NTx-IgG (n = 3, \*\* p < 0,01,\*\*\* p < 0,001) (B) VEGF-mRNA-Expression nach Vorbehandlung der Zellen mit 10 nM PAR-1-Blocker mit anschließender zwölfstündiger Stimulation mit NTx-IgG (n = 4, \*\* p < 0,01) (C) VEGF-Proteinsekretion nach Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen PAR-1-Blocker mit anschließender Stimulation mit NTx-IgG für 24 Stunden (n = 4, \* p < 0,05) (D) Vorinkubation der NTx-IgGs mit 1  $\mu$ M 2. ECL für eine Stunde, bzw. Vorbehandlung der Zellen mit 10 nM PAR-1-Blocker, mit anschließender Stimulation der Zellen für 24 Stunden mit den IgGs und Messung der VEGF-Sekretion (n = 4, \* p < 0,05)

## 4.2 Regulation der endothelialen VEGF-Transkription und -Freisetzung durch den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR-1)-Agonisten Thrombin

Zum besseren Verständnis der Wirkung des PAR-1-Autoantikörpers wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Endothelzellsystem verschiedene Experimente mit Thrombin, dem natürlichen Aktivator des PAR-1, durchgeführt.

Thrombin wird durch einen Komplex aus dem aktivierten Faktor X und dem aktivierten Faktor V aus Prothrombin gebildet und ist besonders für seine Rolle in der Gerinnung bekannt. Es ist eine Serinproteinase, die durch proteolytische Spaltung Fibrinogen in Fibrin umwandelt und damit die Bildung des Fibrinthrombus initiiert. Außerdem kann es die Gerinnungsfaktoren XI, VIII und V aktivieren und damit ihre eigene Bildung begünstigen. Thrombin aktiviert die Proteinase-aktivierten Rezeptoren 1, 3 und 4 und führt dadurch unter anderem zu einer Thrombozytenaktivierung[53].

Neben seiner Rolle in der Gerinnung beeinflusst Thrombin auch Entzündungsvorgänge, indem es die Freisetzung proinflammatorischer Cytokine, u. a. aus Endothel- und Fettzellen stimuliert[53].

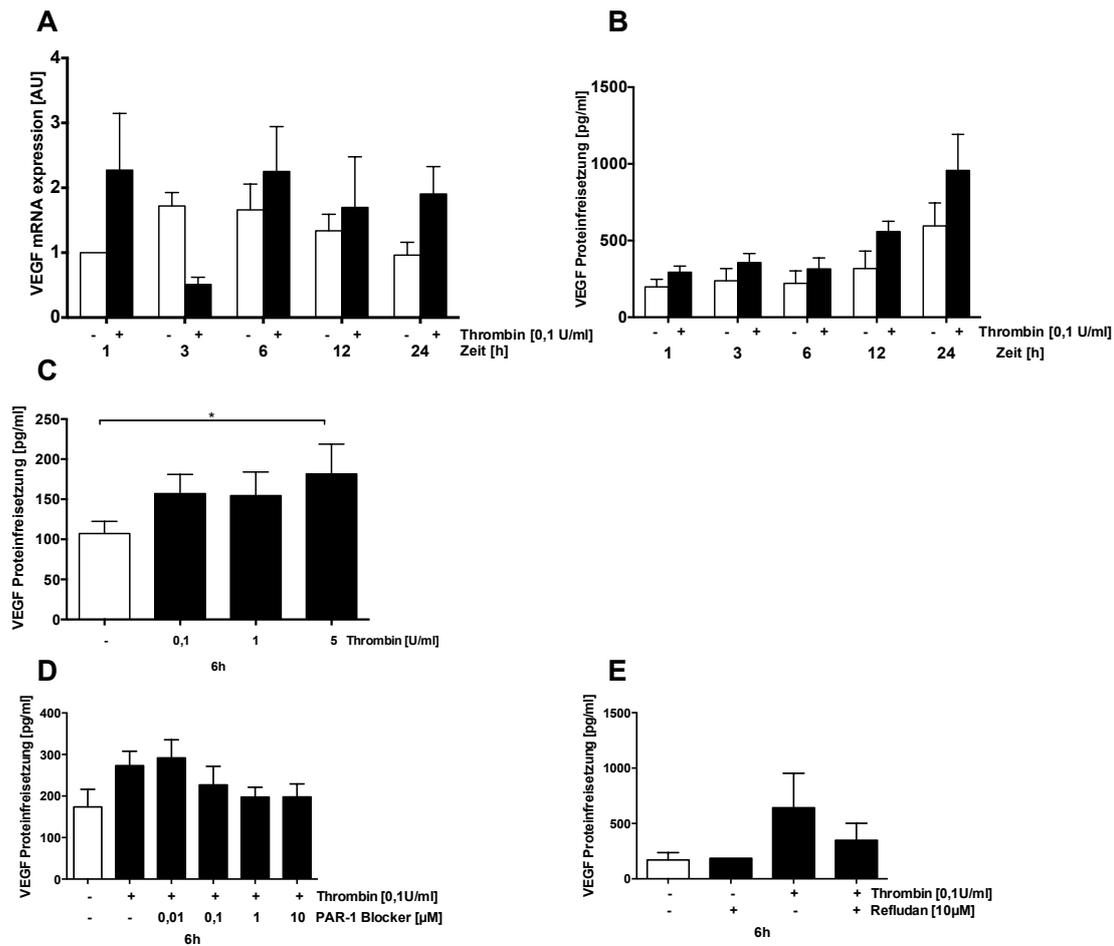
### 4.2.1 Thrombin-vermittelte mRNA-Expression und -Sekretion

Die Fähigkeit von Thrombin, die VEGF-Sekretion herauf zu regulieren, wurde für eine Reihe von Zellen gezeigt, u. a. in glatten Gefäßmuskelzellen [66], in Fibroblasten [67], in Thrombozyten[68], in diversen Krebszelllinien [69–71], in Stromazellen des Endometriums [72] und in Endothelzellen[36]. Außerdem beeinflusst Thrombin auch die die Bildung des VEGF-Rezeptors 2, über den der stärkste pro-angiogenetische Effekt von VEGF vermittelt wird.

Die Behandlung der HMEC-1 mit 0,1 U/ml Thrombin führte zu einer 2,5-fachen Erhöhung der VEGF-mRNA-Level nach einer Stunde (siehe Abbildung 4.4 A). Nach drei Stunden fielen die VEGF-mRNA-Level auf das 0,3-fache der entsprechenden Kontrolle ab, um anschließend wieder auf das 1,3- bis 1,9-fache anzusteigen.

Die VEGF-Sekretion stieg nach einer einstündigen Stimulation leicht an und blieb nach drei, sechs, zwölf und 24 Stunden über der jeweiligen Kontrolle, wobei das Kontrollniveau nach 24 Stunden gegenüber dem Einstundenwert wiederum deutlich erhöht war (Siehe Abbildung 4.4 B).

Die VEGF-Sekretion nach Stimulation mit Thrombin zeigte eine leichte Dosisabhängigkeit. Thrombin mit 0,1 U/ml führte zu einer Erhöhung der VEGF-Freisetzung von 107 pg/ml ( $\pm 15$  pg/ml) auf 157 pg/ml ( $\pm 24$  pg/ml), während die Stimulation mit 5 U/ml in einer Erhöhung auf 182 pg/ml ( $\pm 37$  pg/ml,  $p < 0,05$ ) resultierte (siehe Abbildung 4.4 C).



**Abbildung 4.4:** Analyse der VEGF-mRNA-Expression mittels qRT-PCR (Angabe in relativen Einheiten) und der VEGF-Sekretion mittels ELISA (Angabe in pg/ml) nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit von der Zeit, der Dosis und verschiedener Blocker des Thrombinsystems. A und B Stimulation der Zellen mit 0,1 U/ml für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden und anschließende Analyse der VEGF-mRNA (A) und VEGF-Sekretion (B) (n=4); C-E Analyse der VEGF-Sekretion nach sechsständiger Stimulation mit Thrombin, (C) Thrombin-Dosisreihe (n = 4) (D) einstündige Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen PAR-1-Blocker-Konzentrationen (n = 4) (E) einstündige Vorbehandlung der Zellen mit 10 µM Refludan (n = 2)

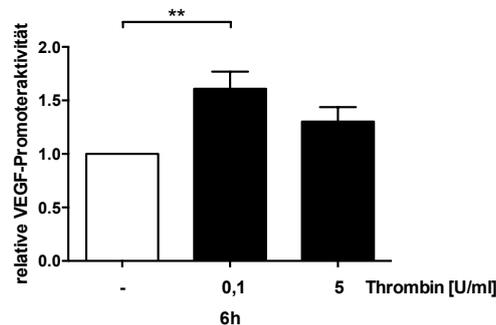
Sowohl die Vorbehandlung der Zellen mit dem PAR-1-Blocker BMS200261 als auch mit dem direkten Thrombininhibitor Refludan normalisierte den Effekt von Thrombin tendenziell (siehe Abbildung 4.4 D und E).

Thrombin stimuliert im verwendeten Zellsystem die Bildung von VEGF-mRNA sowie die Sekretion von VEGF. Dieser Effekt ist PAR-1-vermittelt, da er sowohl durch die gezielte Hemmung von Thrombin als auch durch die Hemmung des PAR-1 aufgehoben wird.

#### 4.2.2 Transkriptionelle Regulation der VEGF-Promoteraktivität durch Thrombin

Die HMEC-1 wurden mit dem an das Gen der Leuchtkäfer-Luziferase gekoppeltem VEGF-Promoter transfiziert und anschließend mit Thrombin in niedriger (0,1 U/ml) und hoher (5 U/ml) Konzentration stimuliert. Die mit Thrombin stimulierten Zellen zeigten nach sechs

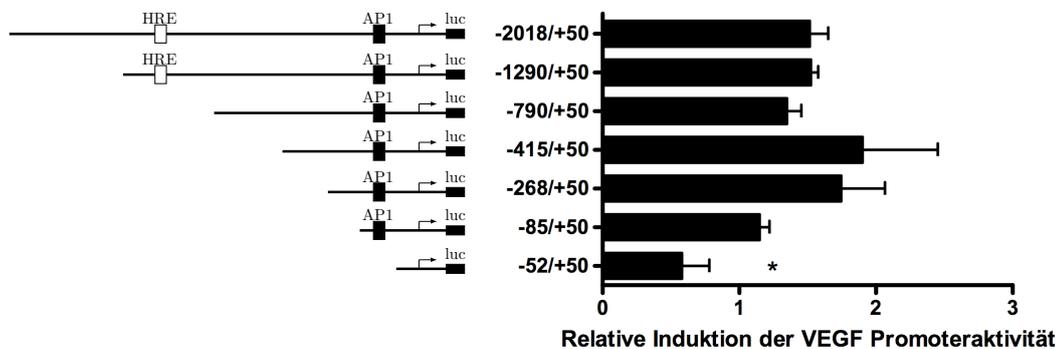
Stunden eine erhöhte Luziferase-Aktivität, mit 0,1 U/ml erhöhte sich die Aktivität um den Faktor 1,6 ( $p < 0,01$ ) und mit 5 U/ml um den Faktor 1,3 (siehe Abbildung 4.5)



**Abbildung 4.5:** Aktivität des VEGF-Promoters nach Stimulation mit Thrombin. Die HMEC-1 wurden mit pLuc -2018/+50 und einem Renilla-Plasmid unter der Kontrolle des CMV-Promoters ko-transfiziert und nach 24 Stunden mit Thrombin stimuliert. Die Messung erfolgte mit dem Dual-Luciferase-Assay (Promega). Es wurde der Quotient aus der Luziferase-Aktivität und der Renilla-Aktivität gebildet und anschließend auf die Kontrolle normalisiert. ( $n = 6$ , \*\*  $p < 0,01$ )

Anschließend wurden HMEC-1 mit einer Promoter-Deletionsreihe transfiziert und mit 0,1 U/ml Thrombin stimuliert. Auch hier zeigte sich bei dem Promoter in voller Länge eine etwa 1,5-fache Induktion der Promoteraktivität. Mit Deletion des Abschnittes zwischen dem 86. und dem 52. Basenpaar kam es zu einem Sistieren der Grundaktivität des Promoters sowie zu einem Verlust der Stimulationsfähigkeit (siehe Abbildung 4.6).

Die wahrscheinliche Bindungsstelle für die Regulation der VEGF-Sekretion in Antwort auf die Stimulation durch Thrombin liegt zwischen dem 86. und dem 52. Basenpaar.



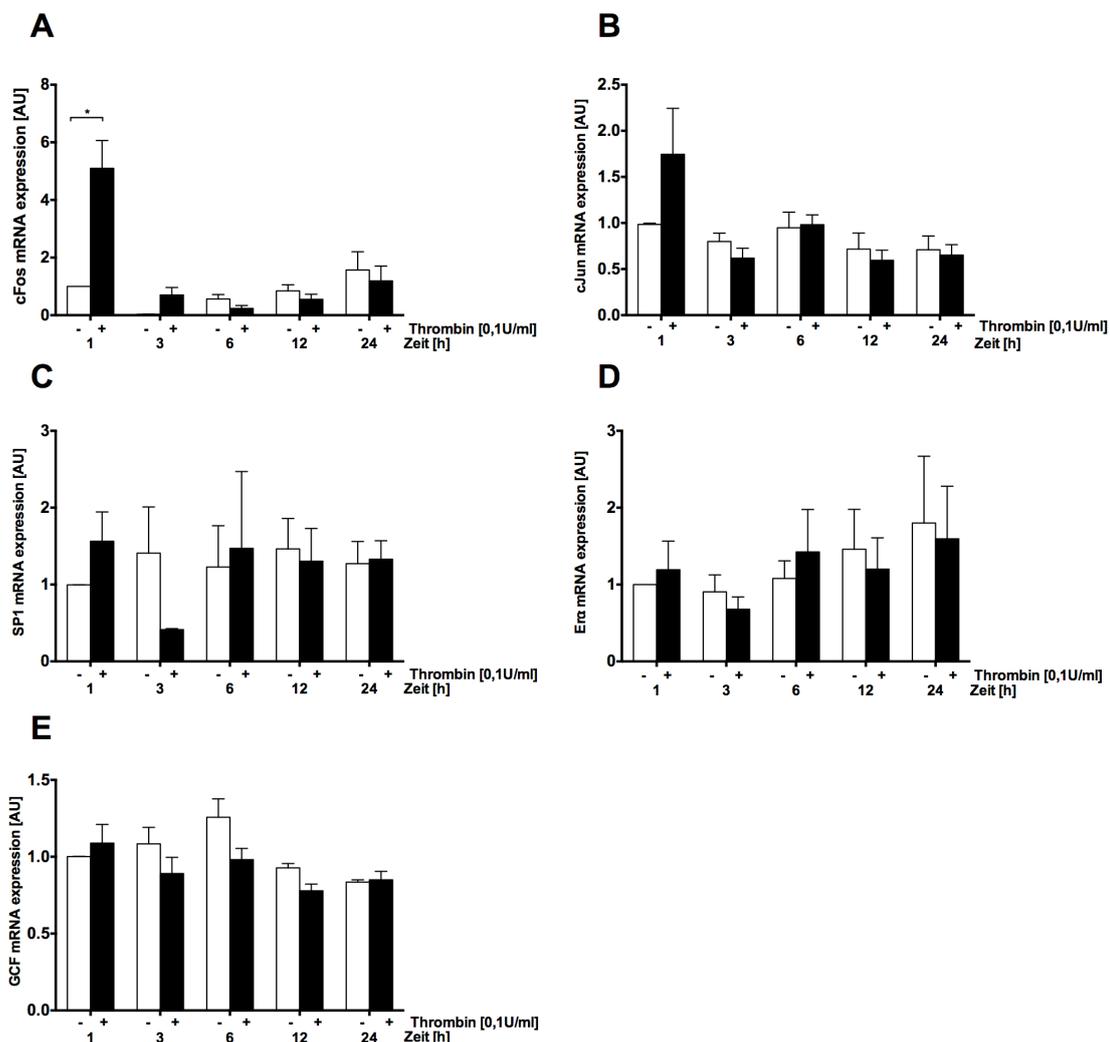
**Abbildung 4.6:** Thrombin-abhängige Regulation des VEGF-Promoters. Die verschieden langen Promoterkonstrukte wurden transfiziert und anschließend für sechs Stunden mit Thrombin stimuliert. Die Messung erfolgte mit dem Dual-Luciferase-Assay (Promega). Dargestellt ist die Änderung der Signalintensität im Verhältnis zur entsprechenden unbehandelten Kontrolle ( $n = 4$ , \*  $p < 0,05$  vs. -2018/+50)

### 4.2.3 In-silico-Analyse auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen und in-vitro-Expressionsanalyse möglicher Transkriptionsfaktoren

Die Sequenz zwischen Basenpaar -86 und -52 wurde in silico auf Transkriptionsfaktorbindungsstellen untersucht. Hierbei fanden sich mögliche und wahrscheinliche Bindungsstellen

für SP-1, AP-1, ER $\alpha$  und GC-Faktor (GCF) (siehe Abbildung 4.7 C). AP-1 ist ein Heterodimer, das sich aus Mitgliedern der Genfamilie Fos (c-Fos, Fos B, Fra-1, Fra-2) und der Genfamilie Jun (c-Jun, JunB, JunD) zusammensetzt[73].

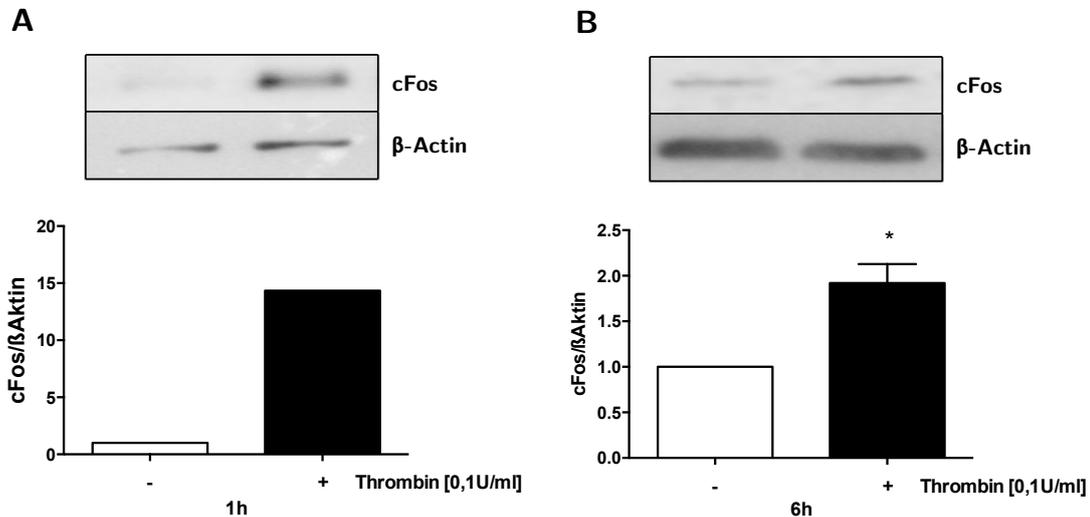
Anschließend wurden qRT-PCR für SP-1, ER $\alpha$ , GCF, sowie für cJun und cFos durchgeführt. Thrombin führte nach einer Stunde zu einer 1,7-fachen Induktion von cJun-mRNA ( $p < 0,05$ ) und zu einer 5-fachen Induktion von cFos-mRNA ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 4.7 A und B). SP-1-mRNA wird nach einer Stunde um den Faktor 1,5 ( $\pm 0,3$ ) erhöht, nach drei Stunden zeigte sich eine Herabregulation um den Faktor 0,3 (siehe Abbildung 4.7 C). Weder ER $\alpha$  noch GCF werden durch Thrombin reguliert (siehe Abbildung 4.7 E und F).



**Abbildung 4.7:** Analyse der mRNA-Expression von (A) cFos, (B) cJun, (C) SP1, (D) ER $\alpha$  und (E) GCF mittels qRT-PCR nach Stimulation der Zellen mit 0,1 U/ml Thrombin für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden. Normalisierung erfolgte auf die Kontrolle zum Zeitpunkt 1 Stunde ( $n = 4$ , \*  $p < 0,05$ )

Auf Proteinebene konnte für cFos im Westernblot in einem Experiment nach einer Stunde eine Steigerung auf das 14-fache der nicht-stimulierten Kontrolle gezeigt werden (siehe Abbildung 4.8 A). Die sechsstündige Stimulation mit Thrombin führte zu einem Anstieg von cFos auf das 2-fache der nicht stimulierten Kontrolle ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 4.8 B).

AP-1 konnte in silico als möglicher Transkriptionsfaktor für die Sequenz zwischen dem 86. und dem 52. Basenpaar identifiziert werden. CFos zeigte als wichtiges Teilprotein von AP-1, eine Hochregulation durch Thrombin sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene.



**Abbildung 4.8:** Analyse der Wirkung von Thrombin auf die cFos-Proteinexpression im Kernproteinextrakt mittels Westernblot. Als internes Kontrollprotein wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. (A) cFos-Proteinexpression nach einer Stunde Thrombin-Stimulation ( $n = 1$ ), (B) cFos-Proteinexpression nach sechs Stunden Thrombin-Stimulation, oben repräsentativer Westernblot, unten Auswertung von drei Experimenten (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.2.4 Analyse der VEGF-Promoterregulation mittels EMSA

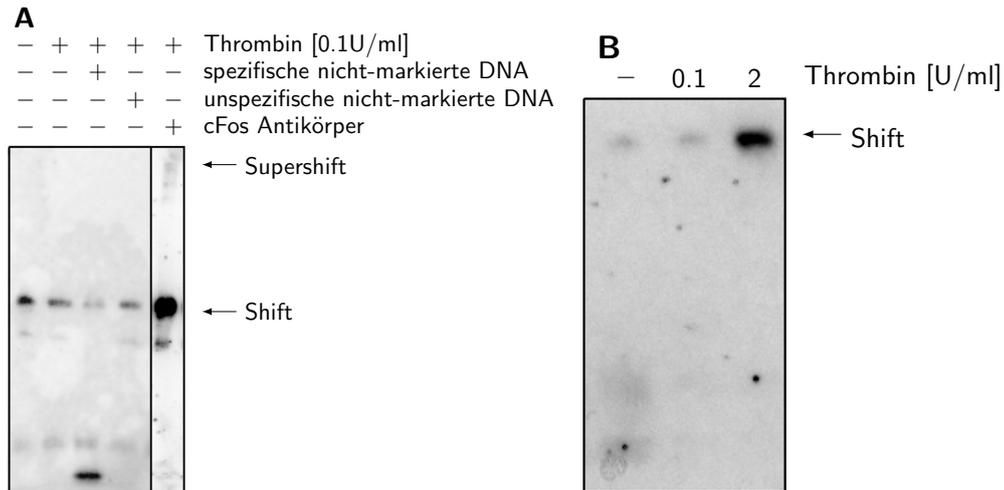
Aufgrund ihrer geringen Länge wurde die gesamte Sequenz zwischen Basenpaar -86 und -52 für den EMSA verwendet. Thrombin führte in der Konzentration 0,1 U/ml nach sechs Stunden zur Verminderung der Komplexbildung, während eine Konzentration von 2 U/ml die Komplexbildung verstärkte (siehe Abbildung 4.9 B).

Die Zugabe nicht-markierter, spezifischer DNA im Überschuss ließ den Komplex verschwinden, während eine nicht spezifische Sequenz, die gegen SP-1 gerichtet war, dies nicht bewirkte. Das spricht für die Spezifität der Bindung.

Ein cFos-spezifischer Antikörper band an den DNA-Proteinkomplex und führte zur Bildung eines noch größeren Komplexes, der dementsprechend langsamer durch das Gel migrierte und zu einem Supershift führte (siehe Abbildung 4.9 A). Dies deutet auf eine Rolle von cFos in der Regulation dieses Abschnittes hin.

#### 4.2.5 Einfluss der Inhibition von AP-1 auf die Thrombin-induzierte VEGF-Sekretion

Dass AP-1 die VEGF-Sekretion beeinflussen kann, ist bekannt. Es spielt unter anderem eine Rolle in der VEGF-Bildung in Antwort auf Hypoxie und wird, unabhängig von HIF1- $\alpha$ , durch



**Abbildung 4.9:** EMSA-Analyse der Kernproteinextrakte von mit Thrombin stimulierten Zellen. Die Kernproteinextrakte wurden mit dem mit Biotin markierten Abschnitt des VEGF-Promoters zwischen -86 und -52 inkubiert, anschließend auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt und mit Chemilumineszenz sichtbar gemacht. (A) Zum Nachweis der Spezifität der Bindung wurde nicht-markierte spezifische und unspezifische DNA im Überschuss zu den Zellen gegeben. Für den Supershift wurde ein cFos-spezifischer Antikörper zum Ansatz gegeben. (B) Die Zellen wurden vor der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen Thrombin stimuliert.

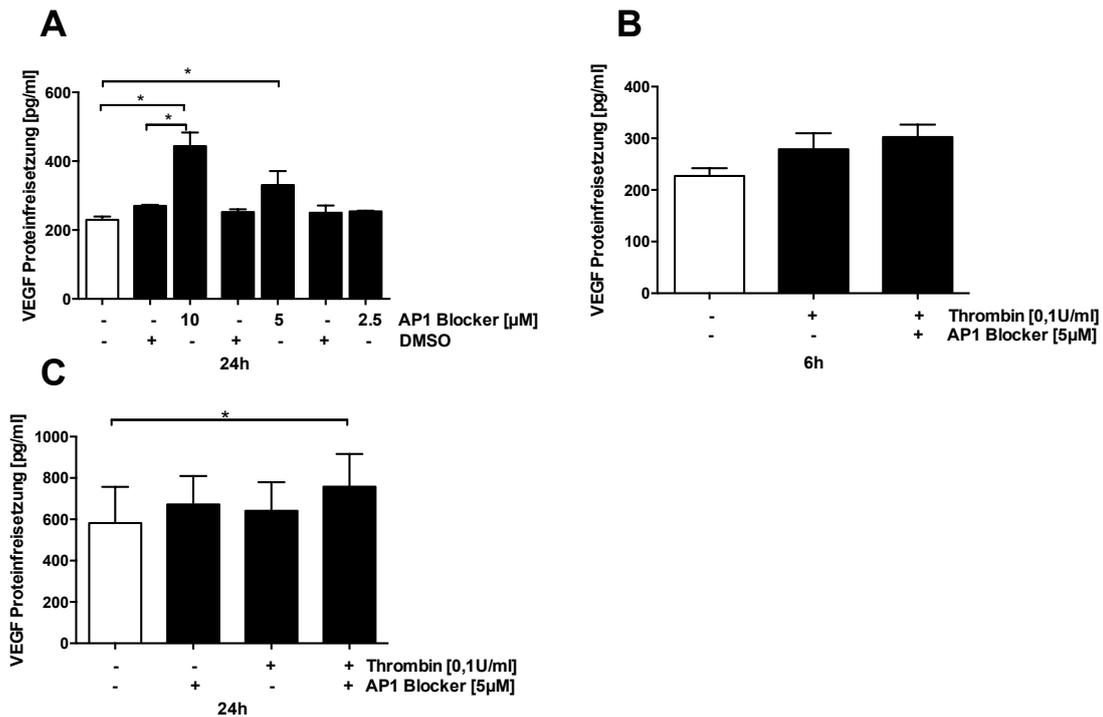
einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration induziert[74]. Ein Einfluss von AP-1 auf die VEGF-Sekretion wurde unter anderem in humanen peritonealen Mesothelzellen gezeigt [47]. Auch in Magenkrebszellen wurde ein Zusammenhang zwischen Inhibition von AP-1 und einer verminderten VEGF-Sekretion beobachtet [75]. In Podozyten führte die Hemmung der AP-1-Komponente JunD zu einer verstärkten VEGF-Sekretion [76].

Zuerst wurde die Wirkung der alleinigen Blockade von AP-1 auf die VEGF-Sekretion untersucht. Dazu wurden die HMEC-1 für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des AP-1-Blockers SR-11302 behandelt, bzw. mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittels DMSO. Dabei zeigte sich eine dosisabhängige Hochregulation durch 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M des Blockers ( $444 \pm 39$  pg/ml sowie  $331 \pm 40$  pg/ml) gegenüber der mit DMSO behandelten Kontrolle ( $270 \pm 3$  pg/ml) und der unbehandelten Kontrolle ( $230 \pm 9$  pg/ml) (siehe Abbildung 4.10 A).

Für die Versuche mit Thrombin wurden die Zellen für eine Stunde mit dem AP-1-Blocker in einer Konzentration von 5  $\mu$ M vorbehandelt und anschließend für sechs Stunden mit Thrombin stimuliert. Es zeigte sich eine leichte Erhöhung der VEGF-Level von  $227 \pm 15$  pm/ml auf  $278 \pm 31$  pm/ml durch die Stimulation mit Thrombin und eine zusätzliche Erhöhung auf  $302 \pm 24$  pm/ml durch die Vorbehandlung mit dem AP-1-Blocker (siehe Abbildung 4.10 B).

Nach 24 Stunden Stimulation ergab sich ein ähnliches Bild. Schon der AP-1-Blocker alleine führte zu einer leichten Hochregulation der VEGF-Level von  $582 \pm 174$  pm/ml auf  $672 \pm 138$  pm/ml (siehe Abbildung 4.10 C).

Die Inhibition der AP-1-Wirkung führte im Zellkultursystem zu einer vermehrten VEGF-Sekretion mit und ohne Thrombinstimulation. Dies deutet auf eine hemmende Wirkung des

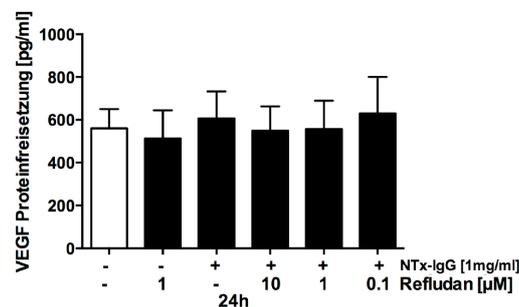


**Abbildung 4.10:** Analyse des Einflusses der AP-1-Inhibition durch den AP-1-Blocker SR-11302 auf die VEGF-Sekretion mittels ELISA. (A) Die Zellen wurden für 24 Stunden mit dem AP-1-Blocker und dem Lösungsmittel DMSO in verschiedenen Konzentrationen behandelt ( $n = 2$ ,  $* p < 0,05$ ). (B) Die Zellen wurden für eine Stunde mit  $5 \mu\text{M}$  AP-1-Blocker vorbehandelt und anschließend für sechs Stunden mit  $0,1 \text{ U/ml}$  Thrombin stimuliert ( $n = 2$ ). (C) Nach einstündiger Vorbehandlung mit  $5 \mu\text{M}$  AP-1-Blocker wurden die Zellen für 24 Stunden mit  $0,1 \text{ U/ml}$  Thrombin behandelt ( $n = 4$ ,  $* p < 0,05$ ) (in  $\text{pg/ml}$ ).

Transkriptionsfaktors hin, die schon unter nicht-stimulierten Bedingungen wirkt.

### 4.3 VEGF-Sekretion durch NTx-IgG in Gegenwart von Thrombininhibitoren

Um zu überprüfen, ob der Effekt der IgGs ein unmittelbarer Effekt am Rezeptor ist, oder ob er Thrombinvermittelt ist, wurden die Zellen für eine Stunde mit dem direkten Thrombin-Inhibitor Refludan inkubiert und anschließend mit IgG behandelt. In diesen Experimenten zeigt schon das IgG alleine keinen deutlichen Effekt. Auch die Vorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen Refludan führte zu keinem zusätzlichen Effekt. Es lässt sich allenfalls eine leichte Herabregulation der VEGF-Sekretion erahnen (siehe Abbildung 4.11) Auch Refludan alleine beeinflusste die VEGF-Sekretion nicht.



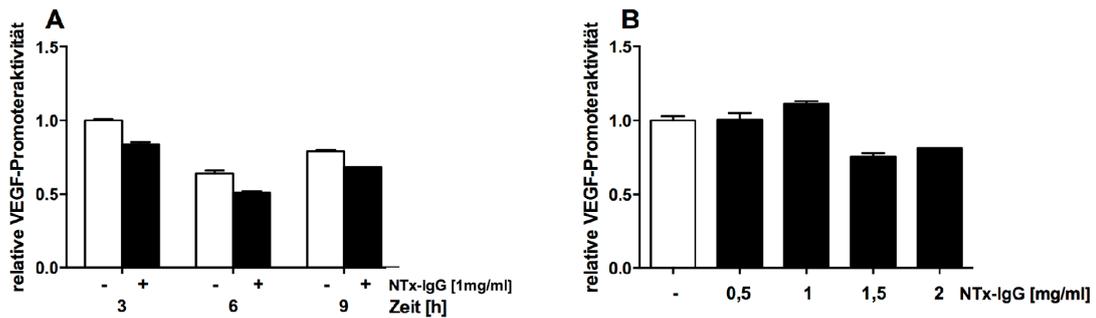
**Abbildung 4.11:** Analyse des Einflusses von Refludan auf die Wirkung der IgGs auf die VEGF-Sekretion mittels ELISA. Die Zellen wurden für eine Stunde mit verschiedenen Konzentrationen Refludan vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit NTx-IgG (n = 2) behandelt (in pg/ml).

### 4.4 Identifizierung der Transkriptionsfaktoren für die NTx-IgG-abhängige VEGF-Regulation

Der Einsatz eines PAR-1-spezifischen Inhibitors, nicht aber der Einsatz des Thrombin-spezifischen Inhibitors Refludan normalisierte den Effekt des NTx-IgG auf die VEGF-Sekretion. Somit gehen wir von einer PAR-1-vermittelten Wirkung des NTx-IgGs aus. Im nächsten Schritt wurden die zellulären Mechanismen der Antikörperwirkung untersucht.

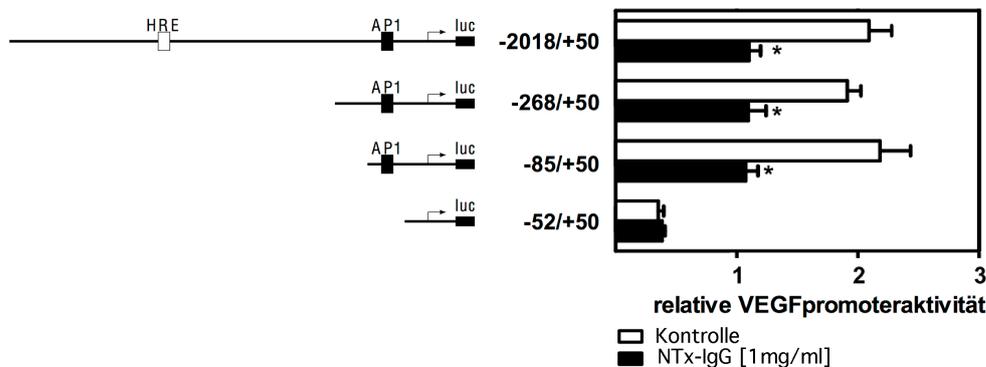
#### 4.4.1 Einfluss des NTx-IgG auf die VEGF-Promoterregulation

Nach Transfektion der HMEC-1 mit dem VEGF-Promoter wurden diese für drei, sechs und neun Stunden mit NTx-IgG stimuliert. Es zeigte sich nach drei Stunden eine deutliche Herabregulation der VEGF-Promoteraktivität um den Faktor 0,8 für das NTx-IgG. Diese Herabregulation der Promoteraktivität bestand auch nach sechs und neun Stunden fort (siehe Abbildung 4.12 A). Bei der Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen der Antikörper für sechs Stunden reduzierte das NTx-IgG die Promoteraktivität bei 1,5 und 2 mg/ml (siehe Abbildung 4.12 B).



**Abbildung 4.12:** Messung der VEGF-Promoteraktivität in Abhängigkeit von der Stimulation mit IgGs. Die Zellen wurden mit dem Promoter -2018/+50 transfiziert und anschließend für drei, sechs und neun Stunden mit NTx-IgG (A) stimuliert bzw. mit verschiedenen Konzentrationen NTx-IgG (B) für sechs Stunden stimuliert. Die Messung erfolgte mit dem Dual-Luciferase-Assay (Promega). Für alle Versuche ist  $n = 1$ , die Darstellung erfolgt relativ zur Kontrolle.

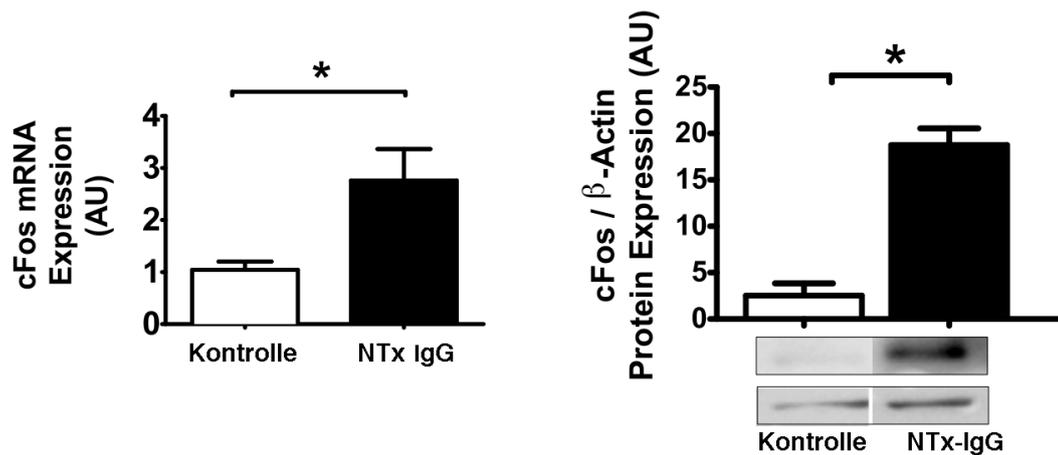
Auch in der anschließende durchgeführten Promoter-Deletionsreihe, bei der die Zellen nach der Transfektion für sechs Stunden mit NTx-IgG stimuliert wurden, zeigte sich eine signifikante Verminderung der Promoteraktivität durch die IgGs. Aufgrund des deutlichen Effektes in den Versuchen mit Thrombin wurde die Promoter-Deletionsreihe in vermindertem Umfang durchgeführt. Es kam wiederum durch die Deletion des Abschnittes zwischen den Basenpaaren -86 und -52 zu einem Sistieren der Promoteraktivität und der Beeinflussbarkeit durch die IgGs (siehe Abbildung 4.13).



**Abbildung 4.13:** IgG-abhängige Regulation des VEGF-Promoters, die verschiedenen langen Promoterkonstrukte wurden transfiziert und anschließend für sechs Stunden mit NTx-IgG ( $n = 4$ ,  $* p < 0,05$ ) stimuliert. Die Messung erfolgte mit dem Dual-Luciferase-Assay (Promega). Die Darstellung erfolgte im Verhältnis zur Kontrolle von pLuc -2018/+50.

#### 4.4.2 In-vitro-Expressionsanalyse möglicher Transkriptionsfaktoren

Der Abschnitt zwischen -86 und -52 scheint auch für die IgGs eine Rolle zu spielen. Deshalb wurde erneut die Regulation der Transkriptionsfaktoren cFos, cJun, SP-1, ER $\alpha$  und GCF auf mRNA-Ebene, jeweils zu den Zeitpunkten eins, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden, untersucht. NTx-IgG induzierte cFos-mRNA nach einer Stunde um den Faktor  $2,7 \pm 1,2$  (siehe Abbildung 4.14 A) und cJun-mRNA um den Faktor  $2,7 \pm 0,8$  ( $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 4.15 A). Die

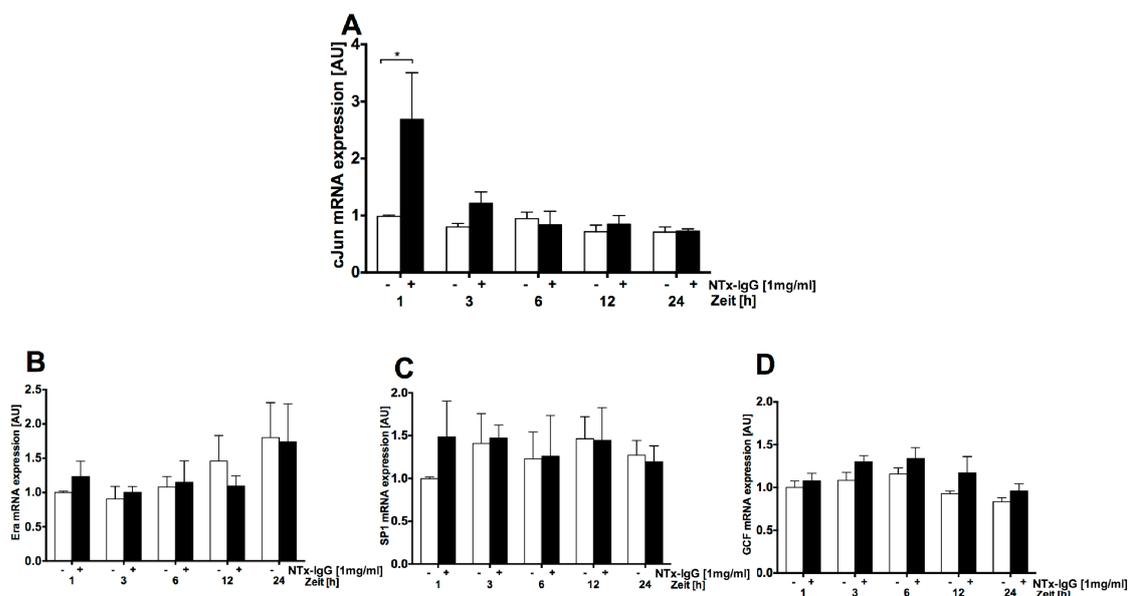


**Abbildung 4.14:** Analyse der Wirkung von NTx-IgG auf die cFos-Proteinexpression im Kernproteinextrakt mittels Westernblot. Als internes Kontrollprotein wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die unbehandelte Kontrolle wurde auf 1 gesetzt. (A) cFos-mRNA-Expression nach einer Stunde Stimulation mit NTx-IgG ( $n = 4$ ). (B) cFos Proteinexpression nach sechs Stunden Stimulation mit NTx-IgG, unten repräsentativer Westernblot, oben Auswertung von vier Experimenten.

IgGs zeigten keinen Einfluss auf die mRNA von SP-1, ER $\alpha$  und GCF.

Im Westernblot zeigte sich nach sechs Stunden eine deutliche Induktion des cFos-Protein von 2,5 relativen Einheiten auf 19 relative Einheiten nach Inkubation der Zellen mit NTx-IgG (siehe Abbildung 4.14 B).

Auch bei der Behandlung der Zellen mit NTx-IgG sind die Promotersequenz zwischen -86 und -52 als auch der Transkriptionsfaktor AP-1 und das Protein cFos von grundlegender Bedeutung.

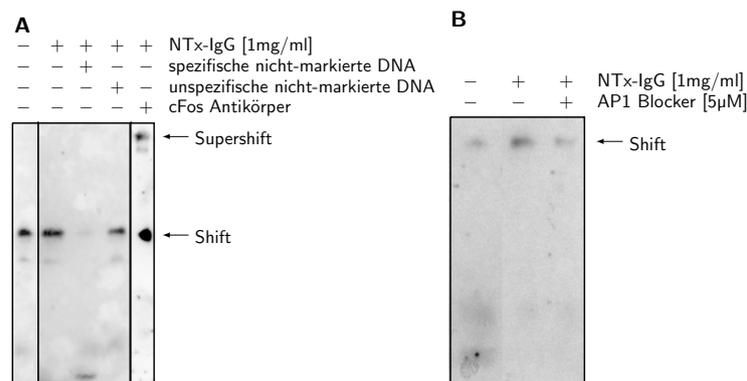


**Abbildung 4.15:** Analyse der mRNA-Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels qRT-PCR. Die Zellen wurden für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden mit 1mg/ml NTx-IgG stimuliert und anschließend wurde die mRNA von cJun (A), ER $\alpha$  (B), SP-1 (C) und GCF (D) untersucht (in relativen Einheiten,  $n = 4$ , \*  $p < 0,05$ ).

### 4.4.3 Analyse der NTx-IgG-induzierten VEGF-Promoterregulation mittels EMSA

Im EMSA führte die Behandlung der Zellen mit NTx-IgG in der Konzentration 1 mg/ml nach sechs Stunden zur verstärkten Komplexbildung. Die Zugabe nicht-markierter, spezifischer DNA im Überschuss ließ den Komplex verschwinden, während eine nicht spezifische Sequenz, die gegen SP-1 gerichtet war, dies nicht bewirkte. Dies spricht für die Spezifität der Bindung. Die Zugabe eines cFos-spezifischen Antikörpers führte zu einem Supershift (siehe Abbildung 4.16 A).

Somit konnte gezeigt werden, dass es nach Stimulation der Endothelzellen mit NTx-IgG zu einer vermehrten Bindung von isolierten Kernproteinen an die VEGF-Promotersequenz zwischen -86 und -52 Basenpaaren kommt. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um das Protein cFos. Es ist somit denkbar, dass der Transkriptionsfaktor AP1 eine Rolle in der Regulation der VEGF-Synthese durch NTx-IgG spielt.



**Abbildung 4.16:** EMSA-Analyse der Kernproteinextrakte von mit NTx-IgG stimulierten Zellen. Die Kernproteinextrakte wurden mit dem mit Biotin-markierten Abschnitt des VEGF-Promoters zwischen -86 und -52 inkubiert, anschließend auf einem nicht-denaturierenden Gel aufgetrennt und mit Chemilumineszenz sichtbar gemacht. (A) Zum Nachweis der Spezifität der Bindung wurde nicht-markierte spezifische und unspezifische DNA im Überschuss zu den Zellen gegeben. Für den Supershift wurde ein cFos-spezifischer Antikörper zum Ansatz gegeben. (B) Vorbehandlung der Zellen mit dem AP-1-Blocker SR-11302 und anschließende Stimulation mit NTx-IgG.

### 4.4.4 Nachweis von AP-1-Komplex als Regulator der NTx-IgG-abhängigen VEGF-Transkription

Im vorgehenden Abschnitt wurde beschrieben, dass die EMSA-Experimente darauf hindeuten, dass der Transkriptionsfaktor AP-1, der das Protein cFos enthält, für die Regulation der VEGF-Sekretion durch NTx-IgG eine Rolle spielt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem spezifischen AP-1-Blocker SR-11302 vorbehandelt und anschließend für 24 Stunden mit NTx-IgG stimuliert.

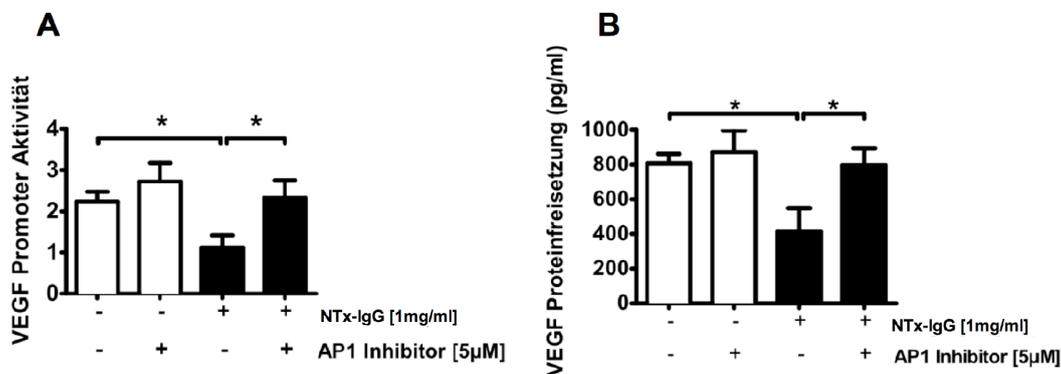
Bereits der AP-1-Blocker alleine führt zu einer deutlichen dosisabhängigen Hochregulation der VEGF-Sekretion. Am deutlichsten wird dies bei einer Dosis von 10 µM. Die VEGF-

Spiegel wurden von 216 pm/ml auf 405 pm/ml angehoben. Dieser Effekt ist vom Lösungsmittel des Blockers DMSO unabhängig (siehe Abbildung 4.10 A). Die Behandlung mit NTx-IgG reduzierte die VEGF-Sekretion von  $807 \pm 120$  pg/ml auf  $517 \pm 220$  pg/ml. Die Vorbehandlung der Zellen mit dem AP-1-Blocker führte zu einer Wiederangleichung an das Kontrollniveau ( $796 \pm 220$  pg/ml; siehe Abbildung 4.17 B).

Auch in den Experimenten mit dem VEGF-Promoter -2018/+50 konnte die, durch das NTx-IgG deutlich reduzierte Promoteraktivität durch den AP-1-Blocker normalisiert werden (siehe Abbildung 4.17 A).

In den EMSA-Experimenten konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit dem AP-1-Blocker SR-11302 für eine Stunde vor der Stimulation mit NTx-IgG die verstärkte Bindung von Kernprotein an die Nucleotidsequenz aufgehoben werden (siehe Abbildung 4.16 B).

Diese Ergebnisse bestätigen den Verdacht, dass der Transkriptionsfaktor AP1 eine Rolle in der Reduktion der VEGF-Sekretion durch NTx-IgG spielt.



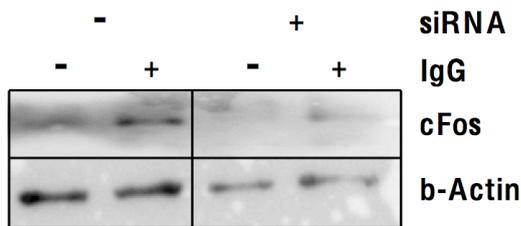
**Abbildung 4.17:** (A) Messung der VEGF-Promoteraktivität in Abhängigkeit von der Stimulation mit IgGs. Die Zellen wurden mit dem Promoter -2018/+50 transfiziert und anschließend mit 5 µM AP-1-Blocker (SR-11302) vorbehandelt und mit NTx-IgG für 6 Stunden stimuliert. Es erfolgte die Darstellung der VEGF-Promoteraktivität. (B) Analyse der VEGF-Sekretion mittels ELISA nach Vorbehandlung der Zellen mit 5 µM AP-1-Blocker (SR-11302) für eine Stunde und anschließender Stimulation für 24 Stunden mit NTx-IgG (n = 5, \* p < 0,05)

#### 4.4.5 Identifikation von cFos als essentiellen Regulator im AP-1-Komplex

In Säugetierzellen kann siRNA eingesetzt werden, um die Expression von Genen herabzuregulieren[63]. Dieses Prinzip wird vielfach eingesetzt, um die Wirkung bestimmter Gene auf die Abläufe in einer Zelle zu studieren. Zunehmend wächst auch das Interesse, die siRNA zum therapeutischen Stilllegen von Genen zu verwenden.

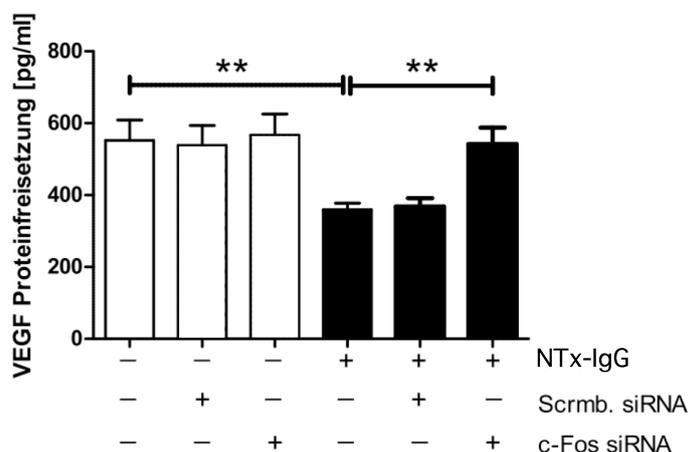
Die Transfektion der HMEC-1 mit cFos-siRNA führte basal und nach einstündiger Stimulation mit IgG zu einer deutlichen Herabregulation des cFos-Protein im Westernblot.

Die Transfektion mit cFos-siRNA oder Scrambled siRNA alleine zeigt keinen Einfluss auf die VEGF-Sekretion. Die mit NTx-IgG stimulierten Zellen zeigten eine Herabregulation von



**Abbildung 4.18:** Analyse des Einflusses der cFos-siRNA auf die cFos-Expression. Der Einsatz der cFos-siRNA führte zu einer deutlichen Herabregulation der cFos-Expression sowohl mit als auch ohne einstündige Stimulation mit IgG, der auch nach der Normalisierung auf  $\beta$ -Actin erhalten bleibt. siRNA = kurze-interferierende-RNA (n = 1)

553  $\pm$  138 pg/ml auf 360  $\pm$  44 pg/ml, die durch die siRNA normalisiert wurde (543  $\pm$  110 pg/ml). Die Transfektion der Zellen mit Scrambled siRNA beeinflusste weder die VEGF-Proteinsekretion in den stimulierten noch in den unstimulierten Zellen (siehe Abbildung 4.19).



**Abbildung 4.19:** Analyse der VEGF-Proteinfreisetzung in mit cFos-transfizierten HMEC in Reaktion auf die Stimulation mit NTx-IgG mittels ELISA. Die Zellen wurden mit cFos-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und nach 4 Stunden für 24 Stunden mit den NTx-IgGs stimuliert (n = 6, \*\* p < 0,001, in pg/ml).

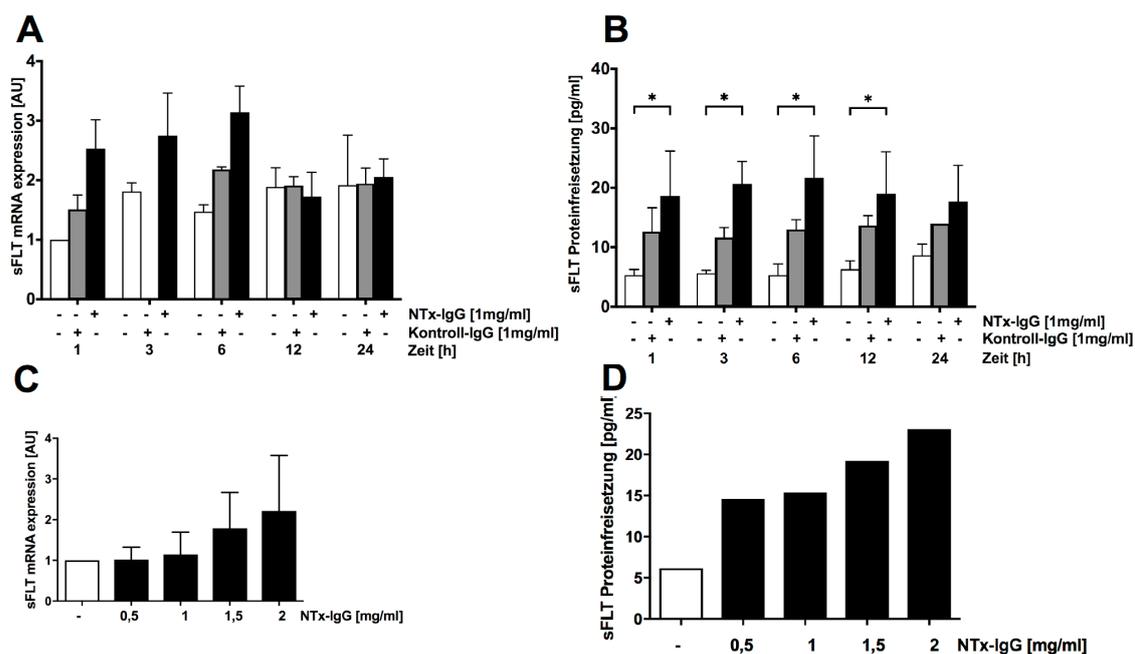
Durch die Transfektion der Zellen mit cFos-siRNA konnte die cFos-Expression der Zellen deutlich reduziert werden. Hierdurch wurde der herabregulierende Effekt des NTx-IgGs auf die VEGF-Sekretion normalisiert. Somit bestätigt sich der Verdacht, dass cFos eine Rolle in der Regulation der VEGF-Sekretion durch NTx-IgG spielt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die NTx-IgG-Wirkung durch cFos, einem Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1, vermittelt wird und dieser an den Promoterabschnitt zwischen den Basenpaaren -85 und -52 bindet.

## 4.5 Einfluss von NTx-IgG und Thrombin auf die sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion in Endothelzellen

Die Regulation der Wirkung von VEGF geschieht nicht nur auf Ebene der Transkription, sondern auch nach erfolgter Sekretion (siehe Abschnitt 1.3.2). Hierfür ist sFlt-1 von Bedeutung. Bei sFlt-1 handelt es sich um die lösliche Form des VEGFR 1. Es hat eine starke Affinität zu VEGF. Durch die Bindung von VEGF an sFlt-1 steht dieses nicht mehr für die Bindung an den VEGFR 2 zur Verfügung und kann nicht biologisch wirksam werden. Bei Untersuchungen mit Patienten mit chronischem Nierenversagen konnte gezeigt werden, dass sFlt-1 zur endothelialen Dysfunktion beiträgt [77]. Es wurde daher die Regulation von sFlt-1 durch das NTx-IgG untersucht.

### 4.5.1 Die Regulation der sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion durch NTx-IgG in HMEC-1



**Abbildung 4.20:** Analyse der sFlt-1-mRNA-Expression mittels qRT-PCR und sFlt-1-Sekretion mittels ELISA, zeit- und dosisabhängig nach Stimulation mit NTx-IgG. (A) sFlt-1-mRNA-Expression nach Stimulation mit NTx-IgG für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden (in relativen Einheiten,  $n = 3$ , signifikanter Effekt der Behandlung in der Varianzanalyse). (B) sFlt-1-Sekretion nach Stimulation mit NTx-IgG für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden (in pg/ml,  $n = 2$ ,  $*p < 0,05$ ). (C) sFlt-1-mRNA-Expression nach Stimulation mit NTx-IgG in verschiedenen Dosen (in relativen Einheiten,  $n = 2$ ) (D) sFlt-1-Sekretion nach Stimulation mit NTx-IgG in verschiedenen Dosen (in pg/ml,  $n = 1$ ).

Die Zellen wurden für eine, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden mit NTx-IgG stimuliert und anschließend wurden die sFlt-1-mRNA-Expression der Zellen und die sFlt-1-Konzentration im Überstand mittels ELISA bestimmt. Die Behandlung mit NTx-IgG hatte in der zweifaktori-

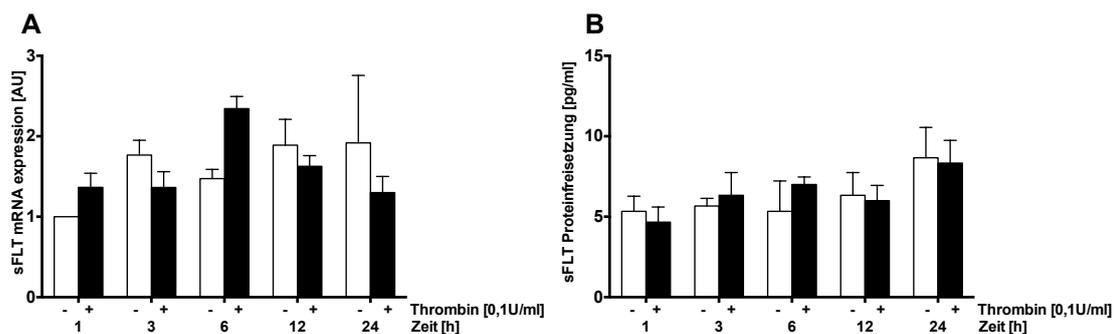
ellen univariaten Varianzanalyse einen signifikanten Effekt auf die sFlt-1-mRNA-Expression. Nach einer Stunde zeigten die behandelten Zellen eine 2,5-fache ( $\pm 0,5$ ) Erhöhung der sFlt-1-mRNA. Nach zwölf Stunden zeigte sich kein Einfluss mehr (siehe Abbildung 4.20 A). Die sFlt-1-Konzentrationen im Überstand lagen schon nach einer Stunde deutlich über dem Kontrollniveau ( $5,3 \pm 0,6$  pg/ml vs.  $18,6 \pm 5,3$  pg/ml,  $p < 0,05$ ; siehe Abbildung 4.20 B und D). Diese markante Hochregulation blieb bis 24 Stunden erhalten. Die mit Kontroll-IgG behandelten Zellen zeigten keine verstärkte sFlt-1-Sekretion.

Nach der Behandlung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen NTx-IgG für sechs Stunden zeigte sich eine Zunahme sowohl der sFlt-1-mRNA-Expression als auch der sFlt-1-Sekretion mit höheren IgG-Konzentrationen (siehe Abbildung 4.20 E und F).

#### 4.5.2 Einfluss von Thrombin auf die sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion

Thrombin erhöht in Deziduazellen des ersten Trimesters, nicht aber in Deziduazellen des letzten Trimesters der Schwangerschaft deutlich die sFlt-1 Sekretion. Dieser Effekt ist dosisabhängig[78]. In Sepsispatienten, die an einer disseminierten intravasalen Gerinnung erkrankten, korrelierte die Thrombin Entstehung mit den Plasma-sFlt-1-Leveln[79].

Die Zellen wurden mit 0,1 U/ml Thrombin für eine, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die sFlt-1-mRNA-Expression mittels qRT-PCR und die sFlt-1-Sekretion mittels ELISA bestimmt. Es zeigte sich kein Effekt durch die Stimulation mit Thrombin (siehe Abbildung 4.21).



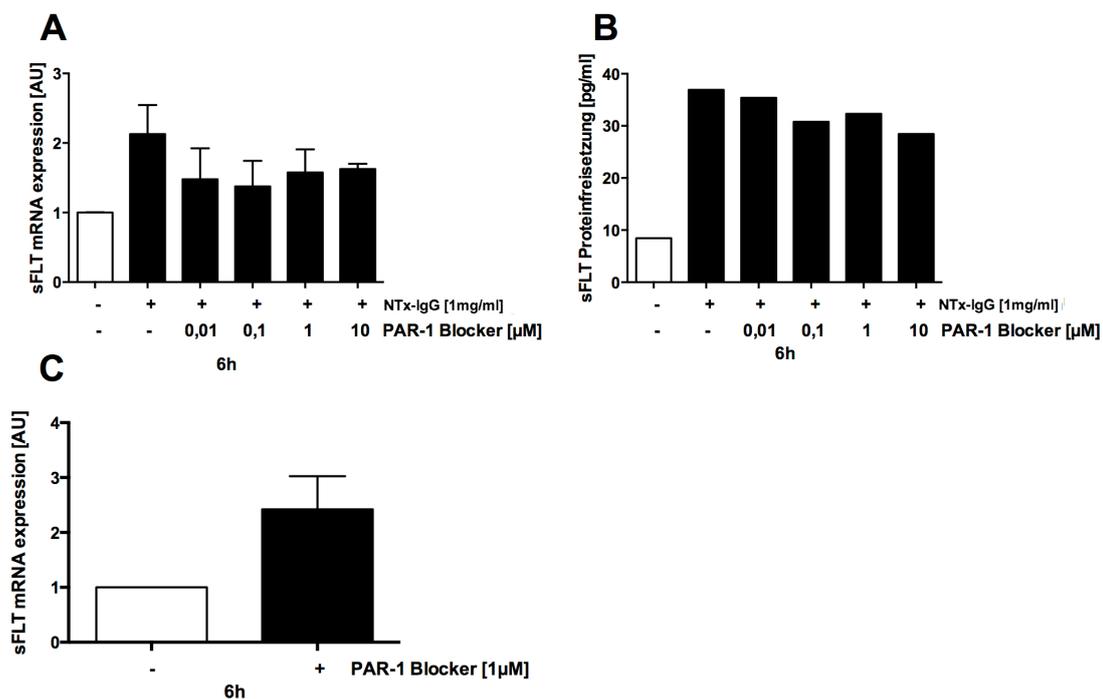
**Abbildung 4.21:** Analyse der sFlt-1 mRNA Expression und sFlt-1-Sekretion nach der Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin für 1, 3, 6, 12 und 24 Stunden. (A) sFlt-1 mRNA Expression bestimmt mit qRT-PCR (in relativen Einheiten,  $n = 3$ ). (B) sFlt-1 Sekretion bestimmt mittels ELISA (in pg/ml,  $n = 2$ ).

#### 4.5.3 Regulation von sFlt-1 durch PAR-1

Auch in Trophoblastzellen führt Thrombin in einer Konzentration von 10 U/ml zu einem deutlichen Anstieg der sFlt-1-mRNA-Bildung und sFlt-1-Sekretion. Dieser Effekt konnte durch die PAR-1-aktivierende Peptidsequenz SFLLRN imitiert werden, was die Vermutung

nahelegt, dass die Effekte von Thrombin in den Trophoblastzellen PAR-1-vermittelt sind[80]. Es wurde untersucht, ob die NTx-IgG-abhängige, verstärkte sFlt-1-Sekretion durch die gleichen Signalwege vermittelt ist wie der Einfluss auf die VEGF-Sekretion.

Die Stimulation mit NTx-IgG für sechs Stunden führte zu einem 2,1-fachen ( $\pm 0,4$ ) Anstieg der sFlt-1-mRNA. Durch die Vorbehandlung mit dem PAR-1-Blocker BMS200261 in verschiedenen Konzentrationen wurden die sFlt-1-mRNA-Level reduziert. Der deutlichste Effekt zeigte sich bei einer Konzentration des Blockers von 0,1  $\mu\text{M}$ . Hier ergab sich im Vergleich zur NTx-IgG-stimulierten Gruppe eine Reduktion um den Faktor  $0,7 \pm 0,1$  (siehe Abbildung 4.22 A). Der PAR-1-Blocker ohne anschließende Stimulation führte zu einer 1,4-fachen ( $\pm 0,6$ ) Induktion der sFlt-1-mRNA (siehe Abbildung 4.22 E). Auf Proteinebene zeigte der Blocker allenfalls eine leichte Wirkung - am effektivsten in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . In der NTx-IgG-behandelten Gruppe reduzierte der PAR-1-Blocker die sFlt-1-Level von 37 pg/ml auf 28 pg/ml. Die unbehandelte Kontrolle lag bei 8 pg/ml (siehe Abbildung 4.22 B). Die Behandlung der Endothelzellen mit NTx-IgG führt zu einer deutlichen, dosisabhängigen Heraufregulation der sFlt-1-Sekretion. Diese scheint nicht PAR-1-vermittelt zu sei, da der Einsatz des PAR-1-Blockers keinen Effekt zeigte.



**Abbildung 4.22:** Analyse der sFlt-1-mRNA-Expression mittels qRT-PCR und sFlt-1-Sekretion mittels ELISA nach der Präinkubation der HMEC-1 mit dem PAR-1-Blocker BMS200261 für eine Stunde und anschließender Stimulation mit NTx-IgG für 6 Stunden. (A) sFlt-1-mRNA-Expression nach Stimulation mit NTx-IgG (in relativen Einheiten,  $n = 6$ ). (B) sFlt-1-Sekretion nach Stimulation mit NTx-IgG (in pg/ml,  $n = 1$ ). (C) sFlt-1-mRNA nach 6-stündiger Inkubation mit dem PAR-1-Blocker (in relativen Einheiten,  $n = 6$ ).

# 5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung des Einflusses von Autoantikörpern von Patienten nach Nierentransplantatabstoßung auf die VEGF-Freisetzung von HMEC-1 sowie die Identifizierung von beteiligten Signalwegen.

VEGF ist ein bedeutender Wachstumsfaktor für endotheliale Zellen und spielt eine tragende Rolle als Regulator der Gefäßneubildung [35]. Weiterhin ist VEGF auch bei Entzündungsvorgängen bedeutsam, da er auch als chemotaktischer Faktor für Entzündungszellen wirkt. In bereits bestehenden Gefäßen kann er eine erhöhte Gefäßdurchlässigkeit bewirken[35]. VEGF wird von verschiedenen Zellen produziert und kann sowohl autokrin als auch parakrin wirken[40]. Produziert wird es unter anderem in glatten Muskelzellen, Makrophagen, Gliazellen, Keratinozyten, Fibroblasten, Tumorzellen und Endothelzellen [36]. Bayliss et al. zeigten in Biopsien nach Herztransplantationen, dass der Ursprung der VEGF-Produktion je nach Schädigungsmechanismus verschieden ist. Bei der akuten zellulären Abstoßung sind vor allem Lymphozyten positiv für VEGF, während bei der akuten antikörpervermittelten Abstoßung in erster Linie die Endothelzellen und Monozyten positiv für VEGF waren[81].

Für die Zellkulturexperimente der vorliegenden Arbeit wurden Endothelzellen verwendet, welche sowohl Ziel als auch Produzent von VEGF sind.

## 5.1 Regulation der VEGF-Freisetzung durch Autoantikörper

### 5.1.1 VEGF-Freisetzung durch Autoantikörper

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IgG, das von HLA-negativen Patienten mit Nierentransplantatabstoßung isoliert wurde (NTx-IgG), zu einer verminderten VEGF-Sekretion in Endothelzellen nach 24 Stunden führte.

Weitere Versuche in der Arbeitsgruppe ergaben, dass NTx-IgG zu einer deutlichen Reduktion der Fähigkeit der Endothelzellen, auf Matrigel Netzwerke zu bilden, führte (unveröffentlichte Daten). Dies lässt auf funktionelle Auswirkungen der verminderten VEGF-Produktion schließen.

Das NTx-IgG beeinflusste in Abhängigkeit von der Zeit sowohl die VEGF-mRNA-Bildung als auch die VEGF-Sekretion der HMEC-1. Trotz einer initialen Induktion der VEGF-mRNA kam es langfristig zu einer Herabregulation der VEGF-Freisetzung durch die Behandlung mit dem NTx-IgG. Eine solche Herabregulation der VEGF-Sekretion durch Antikörper konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden.

Dass Antikörper die Signalwege von Zellen beeinflussen können, ist allgemein bekannt und auch für die VEGF-Produktion wurde bereits gezeigt, dass sie durch Antikörper beeinflusst

wird. Bieri et al. zeigten dies für HLA-Antikörper, die zu einer Hochregulation der VEGF-Produktion in Endothelzellen führten[82]. Die vermehrte VEGF-Produktion von Endothelzellen durch HLA-Antikörper führte sowohl zu einer vermehrten parazellulären Durchlässigkeit der Endothelzellen als auch zu einer verstärkten Endothelzellproliferation. Sie trug also sowohl zum Erhalt der Entzündung bei, indem sie die Extravasation von Plasmamolekülen und Entzündungszellen ermöglichte, könnte aber gleichzeitig die Heilung von Schäden begünstigen[82]. Auch in der durch Arsen ausgelösten Schwarzerkrankung wurden gegen Endothelzellen gerichtete Antikörper nachgewiesen, die die VEGF-Freisetzung der Zellen erhöhten. Das spezielle Ziel dieser Antikörper auf den Endothelzellen wurde nicht identifiziert[83].

### 5.1.2 Zusätzliche Einflussfaktoren auf die VEGF-Freisetzung

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich ein Anstieg der basalen VEGF-Sekretion mit der Zeit. Für alle Experimente wurden die Zellen mit Minimalmedium inkubiert, welches mit 0,5 % FCS sowie ohne zusätzliches Cortison und ohne epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) angesetzt wird. Dies stellt im Vergleich zum Vollmedium eine Mangelsituation dar.

Dass Serumentzug einen Anstieg der VEGF-Produktion von Zellen auslösen kann, ist schon seit längerem bekannt. Jung et al. zeigten dies in Darmkrebszellen[84]. Auch für Endothelzellen konnte Lantham et al. einen Anstieg der VEGF-Sekretion nach 12 und 24 Stunden Serumentzug zeigen[85]. Somit wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Anstieg der Basalen VEGF-Sekretion im Rahmen des Serumentzugs gewertet.

Insgesamt zeigte sich der Effekt des NTx-IgGs in seiner Ausprägung variabel. In einigen Experimenten zeigte sich kaum oder keine Reduktion der VEGF-Sekretion.

Die isolierten Antikörper stellen ein Gemisch sämtlicher IgG-Antikörper eines Patienten dar, wobei über die exakte Zusammensetzung jedes einzelnen Aliquots keine klare Aussage gegeben werden kann. Außerdem unterschieden sich die einzelnen IgG-Subgruppen zwischen dem Serum und den verschiedenen Isolaten deutlich, wie Messungen der Arbeitsgruppe zeigten. Eine Ursache dafür könnte die unterschiedliche Affinität des Protein G auf den Isolationssäulen zu den verschiedenen IgG-Subgruppen sein. Protein G bindet im Gegensatz zu Protein A alle 4 IgG-Subklassen, wobei für die Bindungsaffinität gilt:  $IgG3 > IgG4 > IgG2 > IgG1$ [86], während das natürliche Vorkommen der Subgruppen im Serum  $IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4$  entspricht[87].

Die vier IgG-Subklassen haben verschiedene Funktionen[87] und es gibt Hinweise dafür, dass sie auch in Autoimmunkrankheiten eine differenzierte Funktion haben. So erkrankten Patienten mit IgG-Antikörpern der Subgruppe 4 gegen Desmoglein 3 an Pemphigus vulgaris, einer blasenbildenden Autoimmunerkrankung der Haut, nicht aber Patienten mit Antikörpern der Subgruppe 1, die gegen dasselbe Antigen gerichtet sind[87]. Auch bei Autoantikörpern, die den  $AT_1R$  aktivierten, konnte gezeigt werden, dass besonders IgGs der Subgruppe 1 und 3 von

Bedeutung sind[9]. Diese Ergebnisse passen gut zu der Tatsache, dass IgG 1 und 3 in erster Linie durch Eiweißantigene induziert werden, während IgG 2 und 4 eher bei Polysaccharid-Antigenen eine Rolle spielen[87]. Daraus lässt sich schließen, dass Schwankungen, sowohl der IgG-Subgruppen als auch der IgG Spezifitäten, die durch die Isolation entstehen, für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein könnten.

### **5.1.3 Beteiligung von GPCR-Rezeptoren bei der NTx-IgG-induzierten VEGF-Freisetzung**

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation verantwortlicher Rezeptorsysteme, welche als Antigen für die funktionellen Antikörper dienen. Hierfür wurden verschiedene GPCR in der Literatur identifiziert. Funktionelle Antikörper gegen  $AT_1R$  und  $ET_A R$  wurden bei Patienten mit akuter Nierentransplantatabstoßung beschrieben[9]. Ebenso wie der  $AT_1R$  und der  $ET_A R$  gehört der PAR-1 zu den GPCR und es wurden Autoantikörper gegen ihn bei Patienten mit Raynaud-Syndrom und Herz-Kreislauf-Erkrankungen beschrieben[12]. Auch diese Erkrankungen gehen, ähnlich wie die Nierentransplantatabstoßung, mit einer endothelialen Dysfunktion einher, weshalb eine Beteiligung von VEGF in der Pathogenese möglich ist. Die untersuchten Patientenserum waren alle positiv für  $AT_1R$ -,  $ET_A R$ - und PAR-1-Antikörper.

#### **Angiotensin-II-Rezeptor 1 ( $AT_1R$ )**

Die Vorbehandlung der Endothelzellen mit  $AT_1R$ -Inhibitor Valsartan zeigte keinen signifikanten Effekt auf die verminderte VEGF-Sekretion nach Behandlung mit NTx-IgG. Es zeigte sich eher eine tendenzielle Verstärkung der Herabregulation der VEGF-Sekretion durch den Inhibitor. Die alleinige Behandlung der Zellen mit Valsartan ohne anschließende Stimulation zeigte keinen Effekt auf die VEGF-Sekretion.

Antikörper gegen den  $AT_1R$  beeinflussen das Transplantatüberleben nach Nierentransplantation[9, 21, 88]. Es wurde bereits gezeigt, dass die  $AT_1R$ -Antikörper verschiedene Zellen in gleicher Weise beeinflussen wie der natürliche Ligand[4, 9, 10]. Weiterhin ist bekannt, dass Angiotensin II die Angiogenese beeinflusst. In welche Richtung dies jedoch geschieht, ist noch nicht abschließend geklärt. Anandanadesan et al. fanden eine Heraufregulation von VEGF-mRNA und Protein durch Angiotensin II in vier verschiedenen Pankreaskrebszelllinien. In zwei der untersuchten Zelllinien war diese Hochregulation sowohl durch  $AT_1R$  als auch durch Angiotensin-II-Rezeptor Typ 2 ( $AT_2R$ ) vermittelt, in den anderen zwei Zelllinien nur durch  $AT_1R$ [89]. Pan et al. konnten eine Hochregulation von VEGF durch Angiotensin II in der Endothelzelllinie EA.Hy 926 zeigen. Angiotensin führte in seinen Experimenten zu einer verstärkten Proliferation von Endothelzellen, die durch den  $AT_1R$ -Inhibitor Losartan komplett und durch einen Anti-VEGF-Antikörper teilweise inhibiert werden konnte[52].

Es wurde jedoch auch gezeigt, dass verschiedene AT<sub>1</sub>R-Inhibitoren zu einer verstärkten Proliferation von Endothelzellen und einer Induktion von VEGF in diesen führen[90, 91]. Wie es zu diesem Effekt kommt, ist noch nicht geklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass das durch die AT<sub>1</sub>R-Blockade vermehrt vorhandene Angiotensin II über den AT<sub>2</sub>R zu einer vermehrten VEGF-Bildung führt.

Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass der durch das NTx-IgG vermittelte Effekt AT<sub>1</sub>R-vermittelt ist. Da der Einsatz des AT<sub>1</sub>R-Antagonisten Valsartan sogar zu einer tendenziellen Verstärkung der Herabregulation führte, ist eine VEGF-steigernde Wirkung der AT<sub>1</sub>R-Antikörper denkbar, die durch andere Antikörper antagonisiert wird.

### **Endothelinrezeptor a (ET<sub>A</sub>R)**

Der ET<sub>A</sub>R-Inhibitor zeigte keinen Effekt auf die VEGF-Sekretion.

Der ET<sub>A</sub>R vermittelt die zellulären Effekte von ET-1. Er befindet sich unter anderem auf glatten Gefäßmuskelzellen, wo er eine Kontraktion bewirkt[12]. Außerdem ist auch noch der Endothelinrezeptor Typ B (ET<sub>B</sub>R) von Bedeutung. Dieser findet sich besonders auf Endothelzellen[92]. Funktionelle Antikörper gegen den ET<sub>A</sub>R wurden in der SSc beschrieben und zeigen dort eine ausgeprägte Korrelation mit dem Vorkommen von AT<sub>1</sub>R-Antikörpern[10]. Auch in Patienten mit Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Raynaud-Syndrom und pulmonaler Hypertonie (PAH) wurde ihr Vorkommen beschrieben[12]. Die Antikörper führten zu einer Verringerung der Pulsationsrate von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, vergleichbar mit ET-1, dem natürlichen Liganden des ET<sub>A</sub>R[12]. Weiterhin führten sie zu einer Induktion von TGFβ in HMEC-1, die ebenfalls vergleichbar mit dem natürlichen Liganden war[10].

In vielen Tumorentitäten wurde beschrieben, dass ET-1 sowohl über ET<sub>A</sub>R als auch über ET<sub>B</sub>R die Angiogenese beeinflusst. Wu et al. konnten zeigen, dass ET-1 in Chondrosarkomzellen zu einer dosisabhängigen Induktion von VEGF-Protein und mRNA führte, die ET<sub>A</sub>R-vermittelt war[93]. Auch in glatten Gefäßmuskelzellen kommt es ET<sub>A</sub>R-abhängig zur Induktion von VEGF-mRNA und -Protein[94].

In lymphatischen Endothelzellen zeigten Garrafa et al. eine Induktion von VEGF, die jedoch ET<sub>B</sub>R-abhängig war[95]. Auch in humanen venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) ist die Induktion von VEGF durch ET-1 ET<sub>B</sub>R-vermittelt[96].

Die durch ET-1-vermittelte Änderung der VEGF-Sekretion scheint in Endothelzellen abhängig vom ET<sub>B</sub>R zu sein und wird deshalb durch die ET<sub>A</sub>R-Antikörper oder einen ET<sub>A</sub>R-Inhibitor nicht beeinflusst.

### **Proteinase-aktivierter Rezeptor 1 (PAR-1)**

Der hemmende Effekt der IgGs auf die endotheliale VEGF-Produktion ließ sich durch einen PAR-1-Blocker vollständig aufheben. Auch in Versuchen mit Matrigel ließ sich der hemmende

Effekt des NTx-IgGs auf die Netzbildung durch den PAR-1-Blocker normalisieren (unveröffentlichte Daten). Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Effekte der Antikörper PAR-1-vermittelt sind. Ein solcher hemmender Einfluss von funktionalen PAR-1-Antikörpern auf die VEGF-Sekretion von Endothelzellen wurde in dieser Arbeit erstmalig nachgewiesen. PAR-1 ist ein GPCR, der unter anderem durch Thrombin aktiviert wird. Er wurde erstmalig durch Vu et al. beschrieben. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Abspaltung einer N-terminalen Peptidsequenz durch Thrombin, wodurch der gebundene Ligand mit der Aminosäuresequenz SFLLRN demaskiert wird. Dieser bindet dann an den 2. ECL des Rezeptors[13].

Entgegen der hemmenden Wirkung der PAR-1-Antikörper wurden in der Literatur funktionelle Antikörper gegen den PAR-1 mit einer aktivierenden Wirkung an neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nachgewiesen, z. B. in Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Raynaud-Syndrom. Beide Erkrankungen gehen mit einer endothelialen Dysfunktion einher[12], welche auch in der akuten Nierentransplantatabstoßung und der CTD eine wichtige Rolle spielt.

## 5.2 Wirkung von Thrombin auf die VEGF-Bildung

Um die Wirkungsweise der PAR-1-abhängigen Aktivierung durch die Autoantikörper besser zu verstehen, wurde die Wirkung des natürlichen Aktivators des PAR-1 auf die VEGF-Sekretion der HMEC-1 untersucht.

Durch die Stimulation der Endothelzellen mit Thrombin kam es zu einem Anstieg der VEGF-Sekretion. Es war eine Zunahme der VEGF-Freisetzung mit höheren Konzentrationen zu beobachten. Durch den Einsatz eines spezifischen PAR-1-Inhibitors konnte der Effekt des Thrombins normalisiert werden.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen anderer Arbeitsgruppen. So wurde erstmals 1993 auf Chorion-Allantois-Membranen von Hühnereiern gezeigt, dass Thrombin die Angiogenese stimuliert. Tsopanoglou et al. fanden weiterhin heraus, dass der Angiogenese-induzierende Effekt von Thrombin von seiner katalytischen Aktivität, nicht aber von seiner Fähigkeit, Fibrinogen zu binden, abhängt[97]. Thrombin stimuliert die Freisetzung von VEGF aus einer Vielzahl von Zellen. Für viele von ihnen konnte nachgewiesen werden, dass dieser Effekt PAR-1-abhängig ist[68, 70, 72]. Dupuy et al. konnten zeigen, dass Thrombin in HUVEC die VEGF-mRNA und -Sekretion erhöht. Die durch Thrombin induzierte Netzbildung im Kollagengel ließ sich durch Anti-VEGF-Antikörper inhibieren[36]. Tsopanoglou et al. fanden weiterhin heraus, dass Thrombin in hohen Konzentrationen die Angiogenese wieder hemmt[97]. Auch Blackburn et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen[98]. Dass Thrombin in verschiedenen Konzentrationen unterschiedliche Effekte haben kann, ist auch im Zusammenhang mit Entzündungsvorgängen gezeigt worden, wo niedrige Thrombin-Konzentrationen antientzündlich wirken, während höhere Konzentrationen die Entzündung fördern[53].

## 5.3 Wirkung von PAR-1-Autoantikörper auf die VEGF-Freisetzung

Die Stimulation der Zellen mit den Antikörpern führte zu einer initialen Induktion der VEGF-mRNA, welche durch den Einsatz eines PAR-1-Inhibitors noch verstärkt wurde. Nach 12 Stunden kam es zu einer deutlichen Hemmung der VEGF-mRNA, welche durch den PAR-1-Inhibitor aufgehoben wurde. Die VEGF-Proteinsekretion wurde durch die Stimulation mit dem NTx-IgG nach 24 Stunden gehemmt. Auch dieser Effekt wurde durch den PAR-1-Inhibitor normalisiert. Somit scheint die Hemmung der VEGF-Sekretion und mRNA-Bildung PAR-1-vermittelt zu sein, wohingegen der stimulierende Effekt vermutlich durch andere Antikörperfraktionen vermittelt ist.

Die im Rahmen der Untersuchung zur vorliegenden Arbeit beobachtete Wirkung der gegen den PAR-1 gerichteten Antikörper zeigte sich also verschieden von der des Thrombins. Es gibt Ergebnisse, die zeigen, dass die Wirkung von Thrombin abhängig von der Dosis und den vorhandenen Umgebungsfaktoren ist. Thrombin hemmt in niedrigen Dosen und in Gegenwart von Thrombomodulin und aktiviertem Protein C Entzündungsvorgänge, während es sie in höheren Dosen begünstigt. Hierbei sind jeweils unterschiedliche Signalwege beteiligt[53]. Die Angiogenese wird durch höhere Konzentrationen von Thrombin gehemmt[98]. Der PAR-1 ist also in der Lage, je nach Stimulus verschiedene Signalwege zu aktivieren.

Weiterhin könnte es eine Rolle spielen, dass der PAR-1 außer durch Thrombin auch durch einige andere Faktoren aktiviert werden kann, die ebenfalls in der Lage sind, zwischen Arginin 41 und Serin 42 zu spalten. Dazu gehören unter anderem der aktivierte Faktor X, das aktivierte Protein C, sowie Trypsin und Cathepsin G[99]. Der PAR-1 kann, z. B. durch Matrix-Metalloproteinasen, auch an anderen Positionen gespalten werden. Hierbei kommt es zur Aktivierung der gleichen Signalkaskaden wie durch Thrombin - allerdings mit einer anderen Kinetik und mit Aktivierung von anderen Effektormolekülen[98]. In den Arbeiten von Freier zeigten PAR-1-Autoantikörper von Patienten mit Raynaud-Syndrom eine aktivierende Wirkung auf die Schlagzahl von Kardiomyozyten neugeborener Ratten, die vergleichbar war mit der Wirkung des synthetisch hergestellten PAR-1-Liganden. Auf Thrombozyten hatten die Antikörper unterschiedlichen Einfluss. Einige Isolate führten zu einer verstärkten Aggregation und Serotoninfreisetzung im Vergleich zum Kontroll-IgG. Andere führten hingegen zu einer verminderten Aggregation und Serotoninfreisetzung[12]. Es scheint folglich sowohl hemmende als auch aktivierende Subpopulationen der PAR-1-Antikörper zu geben. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die PAR-1-Antikörperspiegel bei den gesunden Kontrollen teilweise höher waren als bei den Patienten, das Kontroll-IgG aber keine PAR-1-abhängigen Effekte zeigte (unveröffentlichte Daten).

### 5.3.1 Bindungsort der gegen PAR-1 gerichteten Antikörper

Die Inkubation des NTx-IgG mit einer Peptidsequenz, welche der zweiten extrazellulären Schleife des PAR-1-Rezeptors entspricht, führte zu einer Normalisierung der VEGF-Proteinsekretion. Dies spricht dafür, dass die zweite extrazelluläre Schleife der Bindungsort des Antikörpers ist.

Freier konnte ebenfalls zeigen, dass die PAR-1-Antikörper gegen den 2. ECL gerichtet sind[12]. Auch die gegen AT<sub>1</sub>R und ET<sub>A</sub>R gerichteten Antikörper haben die 2. ECL der jeweiligen Rezeptoren als Ziel[4]. Der natürliche Ligand bindet hingegen im Kern des Rezeptors, der durch die sieben transmembranen Helices gebildet wird und führt dadurch zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und zur Aktivierung[100].

Antikörper können Rezeptoren auf verschiedene Weise beeinflussen. Zum einen könnten die Antikörper dadurch hemmend wirken, dass sie die Bindungsstelle des Rezeptors blockieren und darüber hinaus zum vermehrten Abbau der Rezeptoren führen, wie es auch bei der Myasthenia gravis der Fall ist[3]. Sie können an den Rezeptor binden und diesen in gleicher Weise aktivieren wie der natürliche Ligand, wie es auch beim Morbus Basedow der Fall ist [2]. Daneben induziert er eigene Signale, die sich vom natürlichen Liganden unterscheiden, so wie es auch bei der Aktivierung von PAR-1 durch Matrix-Metalloproteasen der Fall ist[98]. Für den ersten Fall wäre es notwendig, dass eine basale Thrombinaktivität vorhanden ist, die durch den Antikörper unterbunden wird. Das in den Versuchen verwendete Minimalmedium enthält unter anderem 0,5 % FCS. Dieses ist nicht hitzeinaktiviert, wurde aber gegen 0,9 % NaCl dialysiert. Prothrombin liegt mit einem Molekulargewicht von 72 Kilodalton deutlich über dem Cutoff der Dialysemembran von 14 Kilodalton. Es ist also möglich, dass funktionelles Prothrombin im Zellkulturmedium vorhanden ist und durch endothelzellständige Proteinasen wie z. B. Fibrinogenlikeprotein 2[101] in aktives Thrombin umgewandelt werden könnte. Dadurch käme es zu einer basalen Aktivierung von PAR-1, die durch die Antikörper unterbunden würde. Ein solcher Effekt würde allerdings durch den PAR-1-Inhibitor nicht aufgehoben, sondern höchstens verstärkt werden. Auch würde man einen ähnlichen Effekt wie den der Antikörper durch die Behandlung mit dem PAR-1-Inhibitor alleine oder durch die Behandlung mit dem spezifischen Thrombininhibitor Refludan erwarten. Ein solcher Effekt wurde nicht beobachtet.

Eine Aktivierung des Rezeptors durch die PAR-1-Antikörper in gleicher Weise wie der natürliche Ligand liegt nicht vor, da die Antikörper in genau entgegengesetzter Richtung wirken. Also bleibt als Erklärungsansatz die Aktivierung des PAR-1 durch die Antikörper auf eine Thrombin-unabhängige Weise, indem er an die zweite extrazelluläre Schleife bindet und so zu einer Konformationsänderung führt.

## 5.4 Intrazelluläre Regulationsmechanismen der VEGF-Freisetzung

Zum besseren Verständnis der Wirkung der PAR-1-Antikörper wurden die zellulären Regulationswege der VEGF-Freisetzung sowohl nach Stimulation mit Thrombin als auch nach Stimulation mit den NTx-IgGs untersucht.

### 5.4.1 Promoterdeletionsanalysen

Durch die Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren kommt es in Endothelzellen zur Aktivierung verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Diese können Transkriptionsfaktoren aktivieren. Die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von VEGF in Endothelzellen erfolgte mit Promoterdeletionsanalysen.

Thrombin zeigte eine konzentrationsabhängige Aktivierung des VEGF-Promoters. Die Deletion des Abschnittes zwischen -85 und -52 bp führte sowohl zu einem Verlust der Induzierbarkeit durch Thrombin als auch zu einem Verlust der Basalaktivität, wobei die Induktion des Promoters durch Thrombin schon vorher tendenziell abnahm. Auch das NTx-IgG führte zu einer zeit- und dosisabhängigen Herabregulation der Promoteraktivität des -2018/+50-VEGF-Promoters. In den Promoterdeletions-Experimenten zeigte sich ebenfalls eine Herabregulation durch NTx-IgG, die erst durch die Deletion des Abschnittes zwischen -85 und -50 bp verschwand.

Die Bedeutung des Abschnittes zwischen -85 und -50 bp konnte auch durch die EMSA-Versuche bestätigt werden. Hier zeigte sich eine verstärkte Bindung des Kernproteinextraktes an die DNA-Sequenz nach Stimulation der Zellen mit Thrombin und NTx-IgG. In den zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass der genannte Abschnitt in der Regulation der VEGF-Sekretion durch NTx-IgG eine Rolle spielt. Finkenzeller et al. etablierte das für die vorliegende Arbeit verwendete Promoterdeletionsystem und beobachtete ebenfalls einen Verlust der Basalaktivität des Promoters nach Deletion des Abschnittes zwischen -85 und -52 bp [57]. Der Abschnitt zwischen -85 und -52 bp ist auch für die Induktion von VEGF in verschiedenen anderen Zellsystemen und in Antwort auf verschiedene andere Stimulatoren von Bedeutung, z. B. in Fibroblasten als Antwort auf Blutplättchenwachstumsfaktor (PDGF)[57], in Leberkrebszellen als Antwort auf Activin A[102] und in Glioblastomzellen als Antwort auf Il-6[49]. In humanen-embryonalen-Nieren-293-Zellen wurde gezeigt, dass dieser Abschnitt auch für die Hemmung der VEGF-Sekretion durch p73 von Bedeutung ist[103].

Im Gegensatz zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zeigten Dupuy et al., dass Thrombin VEGF in HUVEC möglicherweise über HIF-1 $\alpha$  erhöht[36]. Dessen Bindungsstelle befindet sich im VEGF-Promoter, etwa auf der Höhe -970[45].

## 5.4.2 Identifikation beteiligter Transkriptionsfaktoren

Der Abschnitt des VEGF-Promoters zwischen -85 und -50 bp in silico wurde mithilfe der TESS-Software nach Transkriptionsfaktorbindungsstellen abgesucht. Dies ergab eine hohe Bindungswahrscheinlichkeit für SP-1, AP-1, ER $\alpha$  und GCF in der entsprechenden Basensequenz.

ER $\alpha$ - und GCF-mRNA wurden weder durch Thrombin noch durch das NTx-IgG relevant beeinflusst. Das gleiche gilt für SP-1, obwohl hier die ausgeprägte Herabregulation nach drei Stunden durch Thrombin relevant ist, die sich auch in der VEGF-mRNA nach drei Stunden findet. Die Herabregulation der VEGF-mRNA nach drei Stunden spiegelt sich allerdings nicht in der Proteinsekretion wider. Sowohl die Behandlung mit Thrombin als auch die Behandlung mit NTx-IgG führte zu einer deutlichen Induktion von cFos-mRNA und-Protein sowie zu einer Induktion von cJun-mRNA. Beide sind mögliche Bestandteile des Transkriptionsfaktors AP-1[73].

Im Unterschied zu den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wurden die verschiedenen Transkriptionsfaktoren durch andere Arbeitsgruppen als bedeutsam für die VEGF-Regulation beschrieben. So wurde die SP-1-Bindungsstellen und ihre Bedeutung für die VEGF-Regulation mehrfach beschrieben[49, 57, 103]. Weiterhin wurden in der Literatur Bindestellen für SP-3, Egr-1 und AP-2 für diese Region beschrieben[45, 49]. Kim et al. zeigten, dass Egr-1 für die Induktion von VEGF durch den plättchenaktivierenden Faktor von Bedeutung ist[50].

Für AP-1 wurde im Zusammenhang mit einer TGF $\beta$ -induzierten VEGF-Sekretion in Mesothelzellen eine Bindungsstelle weiter proximal beschrieben[47]. Auch eine ER $\alpha$ -vermittelte Induktion von VEGF in Brustkrebszellen wurde beschrieben. Die hierfür relevante Bindungsstelle befindet sich zwischen den bp -2275 und -1176[104]. GCF ist ein Transkriptionsfaktor mit vorwiegend hemmenden Eigenschaften. Für ihn wurde gezeigt, dass er die Bildung von Epidermal growth factor receptor, TGF- $\alpha$  und Insulinähnlicher Wachstumsfaktor II hemmt[105].

## 5.4.3 Bedeutung des Transkriptionsfaktors AP1 in der VEGF-Regulation in HMEC-1

Um eine Interaktion von AP-1 und der untersuchten Promotersequenz nachzuweisen, wurde EMSA durchgeführt. Hier zeigte sich eine verminderte Bindung eines cFos enthaltenden Komplexes an den Abschnitt zwischen -85 und -52 bp nach Stimulation mit 0,1 U/ml Thrombin. Die pharmakologische Inhibition der Zellen mit einem AP-1-spezifischen Blocker erhöhte die Thrombin-induzierte VEGF-Sekretion tendenziell. Die Behandlung der Zellen mit dem AP-1-Inhibitor alleine führte zu einer deutlichen Hochregulation der VEGF-Sekretion. In dem in dieser Arbeit untersuchten Setting scheint AP-1 also einen hemmenden Einfluss auf die endotheliale VEGF-Sekretion zu haben.

Eine Stimulation mit 2 U/ml Thrombin führte zu einer verstärkten Komplexbildung im EMSA. Diese Ergebnisse bestätigen die stark dosisabhängigen Effekte des Thrombins [53, 98]. Im EMSA zeigte sich eine verstärkte Bindung eines cFos enthaltenden Komplexes an die DNA-Sequenz zwischen -85 und -50 bp nach Stimulation mit NTx-IgG, was ebenfalls für eine inhibitorische Wirkung von AP1 spricht. Der AP-1-Inhibitor normalisiert die durch NTx-IgG reduzierte VEGF-Freisetzung. Es ist also durchaus wahrscheinlich, dass die gegen PAR-1 gerichteten Autoantikörper ihren Effekt über AP-1 vermitteln.

Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein dimeres Protein, das sich aus Mitgliedern der Genfamilien Jun (cJun, JunB, JunD), Fos (cFos, FosB, Fra-1, Fra-2) und ATF (ATF1-4, ATF-6,  $\beta$ -ATF, und ATFx) zusammensetzt[76]. Die Mitglieder der Jun-Familie sind in der Lage, sowohl Homo- als auch Heterodimere zu bilden und an DNA zu binden. Die Mitglieder der Fos-Familie können hingegen nur als Heterodimere mit Jun an DNA binden. Sie bilden dann aber deutlich stabilere Komplexe und haben eine stärkere DNA-Bindungsaktivität[73]. Für den Transkriptionsfaktor JunD wurde gezeigt, dass er die Bildung von VEGF in Podozyten hemmt[76]. Auch für JunB wurde gezeigt, dass es eine hemmende Wirkung auf AP-1-induzierte Gene hat[73].

Die Bedeutung von AP-1 in der Regulation von VEGF wurde in Magenkrebszellen[75] und in Mesothelzellen[47] gezeigt. Außerdem scheint AP-1 eine Rolle in der VEGF-Induktion als Antwort auf erhöhte intrazelluläre Calcium- ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Spiegel, z. B. im Rahmen einer Hypoxie, zu spielen[106]. Auch die Aktivierung des PAR-1 durch Thrombin führt zu erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln[13] und könnte dadurch die VEGF-Sekretion erhöhen.

Der Zusammenhang zwischen Thrombin und AP-1 ist bis jetzt nur wenig untersucht. Es ist aber bekannt, dass Thrombin das ERK-Signalsystem induziert[70, 72, 98]. Dieses wiederum kann cFos-mRNA induzieren und cFos phosphorylieren[107, 108]. Nach der Stimulation mit  $\text{AT}_1\text{R}$ -Antikörpern ist cJun an einer verstärkten AP-1-Komplexbildung in glatten Gefäßmuskulzellen beteiligt[9].

#### 5.4.4 Wirkung der cFos-siRNA

Um detaillierte Analysen der cFos-abhängigen VEGF-Regulation durchzuführen, wurden cFos-siRNA-Experimente durchgeführt, welche die Ergebnisse, der pharmakologischen AP-1-Hemmung bestätigten. Insgesamt zeigten die mit cFos-siRNA behandelten Zellen ein deutlich geringeres Wachstum, was in der Funktion von cFos in der Regulation des Zellwachstums begründet ist[73]. cFos alleine kann nicht an DNA binden und somit auch nicht die Signalwege der Zelle beeinflussen[73], es braucht immer auch einen Partner. Hier kommt unter anderem cJun in Frage, da die cJun-mRNA durch die Stimulation mit den Antikörpern erhöht wurde.

Somit konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die PAR-1-Antikörper wahrscheinlich durch Induktion des Transkriptionsfaktors cFos zu einer verminderten VEGF-Bildung führen. cFos bindet mit einem noch nicht identifizierten Partner als Heterodimer

AP-1 im Abschnitt zwischen -85 und -52 bp an den VEGF-Promoter und vermittelt dort seine hemmende Wirkung.

## 5.5 sFlt-1-Freisetzung durch Autoantikörper

Die Behandlung der HMEC-1 mit NTx-IgG führte zu einer dosisabhängigen Induktion von sFlt-1. Kontroll-IgG erhöhte die sFlt-1-Sekretion nicht signifikant, was in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden konnte.

sFlt-1 ist ein löslicher VEGF-Rezeptor, der eine starke antiangiogenetische Wirkung hat und die VEGF-induzierte Angiogenese herabregulieren kann[43]. Die pathogenetische Bedeutung von sFlt-1 für die endotheliale Dysfunktion wurde besonders in der Präeklampsie beschrieben[78, 80]. Eine Dysregulation der sFlt-1-Level könnte also eine mögliche Ursache für die IgG-induzierte VEGF-Dysregulation sein.

In einem Maus-Modell der Präeklampsie wurde gezeigt, dass die Infusion von AT<sub>1</sub>R-Autoantikörpern ebenfalls die zirkulierenden sFlt-1-Spiegel erhöht. Daneben kam es durch die Antikörper zu einer gesteigerten sFlt-1-Sekretion in humanen Trophoblastenzellen[7]. Zhou et al. zeigten weiterhin, dass das durch die Antikörper induzierte sFlt-1 die Proliferation und Netzbildung beeinträchtigte[7]. Es ist bekannt, dass ein VEGF-Mangel, wie er z. B. durch erhöhte sFlt-1-Spiegel entstehen kann, zu einer endothelialen Dysfunktion führt[37]. Auch die Infusion von AT<sub>1</sub>R in Ratten führte zu einer endothelialen Dysfunktion[6], welche durch erhöhte sFlt-1-Spiegel erklärt werden kann.

Auch im Setting der Nierentransplantation wurde bereits gezeigt, dass sFlt-1 von Bedeutung ist. So zeigten Chapal et al. einen deutlichen Anstieg des Serum-sFlt-1-Spiegels nach Nierentransplantationen[109]. Dabei war der Anstieg bei einer Niere von einem Spender mit Herzstillstand stärker ausgeprägt als bei einem hirntoten Spender und hier auch wieder stärker ausgeprägt als bei einem Lebendspender. Dass der Anstieg von sFlt-1 tatsächlich mit der Spende und nicht mit der Operation assoziiert war, zeigte sich dadurch, dass sich bei vierzehn Lebendspendern nach der Operation kein Anstieg von sFlt-1 zeigte. Ein sFlt-1-Wert von > 250 pg/ml korrelierte mit einem deutlich erhöhten Verlust von PTC nach drei Monaten[109]. Dieser wiederum korreliert mit einem Verlust der Nierenfunktion nach zwölf Monaten[27]. Auch Basile et al. fanden in Ratten nach Ischämie-/Reperfusion-Versuchen an der Niere erhöhte Serum sFlt-1-Spiegel.

Ob die erhöhten sFlt-1-Spiegel für die erniedrigten VEGF-Spiegel verantwortlich sind, lässt sich nicht sicher sagen. Der sFlt-1-ELISA misst laut Herstellerangaben sowohl freies als auch an VEGF gebundenes sFlt-1. Entsprechende Angaben lagen für den VEGF-ELISA nicht vor. Sollte der VEGF-ELISA nur das ungebundene VEGF messen, könnte der Abfall auch sFlt-1-abhängig sein. Angesichts der Dynamik mit einem ausgeprägten Abfall des VEGF nach 24 Stunden während die sFlt-1-Spiegel anhaltend erhöht bleiben, ist ein solcher Zusammenhang jedoch unwahrscheinlich.

### **5.5.1 Wirkung von Thrombin und PAR-1 auf die sFlt-1-Freisetzung in HMEC-1**

Da die Effekte der Antikörper auf die VEGF-Sekretion PAR-1-vermittelt war, wurde der Effekt von Thrombin und einer PAR-1-Inhibition auf die sFlt-1-Sekretion durch die Endothelzellen untersucht.

#### **Thrombin und sFLT**

Thrombin mit einer Konzentration von 0,1 U/ml zeigte keinen Effekt auf die sFlt-1-Produktion durch HMEC-1. Vorerst gibt es somit keine Hinweise dafür, dass Thrombin sFlt-1 aus Endothelzellen freisetzt.

Im Gegensatz dazu konnte, sowohl in Dezidua- als auch in Trophoblastenzellen, gezeigt werden, dass Thrombin die sFlt-1-Sekretion erhöht[78, 80]. In Sepsispatienten mit disseminierter intravasaler Gerinnung korrelieren die Serum-sFlt-1-Level mit der Thrombinaktivität[79]. In der Sepsis gilt sFlt-1 als ein Marker der endothelialen Dysfunktion. Es wird vermutet, dass sFlt-1 in Sepsispatienten schützend wirkt, da es den proinflammatorischen Effekten von VEGF entgegen wirkt[110]. Ob der Ursprung der erhöhten sFlt-1-Spiegel tatsächlich das Endothel ist, ist allerdings nicht geklärt. Auch Makrophagen oder zirkulierende monozytäre Zellen könnten eine Quelle für sFlt-1 sein[77, 111].

Da die in dieser Arbeit verwendeten Thrombin-Konzentrationen sehr gering waren, wäre es sinnvoll, nochmals höhere Konzentrationen von Thrombin in ihrer Wirkung auf die sFlt-1-Sekretion von Endothelzellen zu untersuchen.

#### **PAR-1 und sFLT**

Der PAR-1-Inhibitor BMS200261 führte nur zu einer leichten Herabregulation der IgG-induzierten sFlt-1-mRNA-Bildung und Proteinfreisetzung. PAR-1 scheint also nicht für die erhöhten sFlt-1-Spiegel verantwortlich zu sein.

In anderen Zellsystemen beeinflusst PAR-1 die sFlt-1-Bildung durchaus. Die Thrombin-induzierte sFlt-1-Freisetzung in Trophoblasten ist PAR-1-abhängig[80]. Al-Ani et al. zeigten, dass die Aktivierung von PAR-2 in Endothelzellen über die Induktion des ERK-Signalweges zu einer vermehrten sFlt-1-Freisetzung führt[112]. Da auch die Aktivierung des PAR-1-Rezeptors zur vermehrten ERK-Phosphorylierung führt[98], wäre es denkbar, dass es über diesen Weg zur vermehrten sFlt-1-Freisetzung kommt.

## 5.6 Beurteilung der Wirkung von VEGF im Kontext der Nierentransplantation

Die Autoantikörper führen zu einer Reduktion der VEGF-Bildung in humanen Endothelzellen. An dieser Stelle stellt sich die Frage, wie ihre Bedeutung zu bewerten ist. Sowohl ein Überschuss als auch ein Mangel von VEGF kann schädigende Wirkung haben[44, 113]. Im Kontext der Nierentransplantation ist noch nicht endgültig geklärt, ob VEGF einen protektiven oder schädigenden Einfluss hat.

Nach der Transplantation kommt es im Transplantat zu einem frühen Verlust von PTC, der mit einer verminderten späteren Transplantatfunktion korreliert[27]. Ein Vermindertes VEGF-Angebot könnte hier als ursächlicher Faktor beteiligt sein. Im Rahmen von akuten Abstoßungen scheint VEGF durch seine proinflammatorischen Wirkmechanismen das Outcome hingegen zu verschlechtern. So konnte in einem Mausmodell der akuten Abstoßung durch VEGF-Inhibition das Transplantatüberleben verbessert werden[114]. Patienten mit einem Einzelnukleotid-Polymorphismus im VEGF-Promoter, der mit einer vermehrten VEGF-Bildung assoziiert ist, zeigten ein vierfach erhöhtes Risiko für das Auftreten einer akuten Abstoßung[115]. Gleichzeitig verringert der beschriebene Polymorphismus das Risiko einer CTD[116]. Das Langzeitüberleben des Transplantates wird also durch vermehrte VEGF-Bildung möglicherweise positiv beeinflusst. Dies wird unterstützt durch die Ergebnisse von Lemos et al, die ein verbessertes Transplantatüberleben bei Patienten mit dem beschriebenen VEGF-Polymorphismus fanden[117]. Bei Modelli de Andrade et al. fanden sich in den Biopsien sowohl ein vermehrter als auch ein verminderter VEGF-Nachweis. Dabei wiesen Patienten mit einer mittleren VEGF-Nachweisbarkeit das beste Transplantatüberleben auf[64].

Relevant ist auch, dass VEGF im Rahmen der Atherosklerose inzwischen zunehmend kritisch bewertet wird. Erste Arbeiten sprachen ihm einen protektiven Wert durch verbesserte Vaskularisierung zu[118]. Inzwischen zeigt sich, dass es durch eine verstärkte Plaque-Angiogenese diesen destabilisiert und dadurch zu akuten vaskulären Verschlüssen führen kann[119]. Auch nach Herztransplantationen finden sich in vielen Plaques sowohl Angiogenese als auch Blutungen, die miteinander assoziiert sind und zu Plaque-Instabilität führen[120]. Bei nierentransplantierten Patienten besteht ein deutlich erhöhtes Atherosklerose-Risiko[121], weshalb ein niedrigerer VEGF-Spiegel möglicherweise das kardiovaskuläre Risiko senken könnten. Auch in Dialysepatienten korrelieren erhöhte VEGF-Spiegel mit einer erhöhten Mortalität[122].

Die Antikörper könnten also auch einen protektiven Effekt haben. Dies wird durch Messungen von PAR-1-Antikörpern in Patientenserum gestützt. Die Patienten, die nach der Transplantation eine akute Abstoßung entwickeln, zeigen einen ausgeprägten Abfall der Antikörpertiter, der zumeist vor der Abstoßung begann. Die Patienten ohne eine Abstoßungsreaktion hingegen wiesen gleichbleibende Titer auf. Der Wegfall des hemmenden Effektes der Antikörper

auf die VEGF-Sekretion könnte also durch die proinflammatorische Wirkung von VEGF eine Abstoßungsreaktion begünstigen.

Zusammenfassend ist VEGF im Rahmen der Transplantation ein wichtiger Faktor. Ob es jedoch protektiv oder schädigend wirkt, ist noch nicht endgültig geklärt. Es kann also nicht sicher beurteilt werden, ob der Einfluss der Autoantikörper schädigend ist, indem sie den Verlust von PTC begünstigen und so zur IF/TA beitragen oder ob sie die Entzündungsprozesse abmildern und somit protektiv wirken. Dabei muss betrachtet werden, dass die Hauptquelle des VEGF in der akuten zellulären Abstoßung die Lymphozyten sind[81] und nicht gesagt werden kann, ob die Antikörper auf diese den gleichen Effekt zeigen wie auf die Endothelzellen.

### **5.6.1 Beurteilung der Wirkung von sFlt-1 im Kontext der Nierentransplantation**

Weiterhin gibt es verschiedene Arbeiten zu sFlt-1 im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz, die zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. DiMarco et al. fanden erhöhte sFlt-1-Level im Serum von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz, die negativ mit der Nierenfunktion und positiv mit dem koronaren Risiko korrelierten. Diese erhöhten Level gingen einher mit verstärkter endothelialer Dysfunktion. Das Serum der Patienten reduzierte sFlt-1-vermittelt die Gefäßbildung im Hühnerei-Chorion-Allantois-Versuch[77]. Onoue et al. hingegen fanden eine positive Korrelation zwischen den sFlt-1-Leveln aus Blutproben aus der Aorta von herzkatheterisierten Patienten und der Nierenfunktion. Sie kamen zu dem Schluss, dass verminderte sFlt-1-Spiegel mit einer Progression der Atherosklerose einhergehen[123]. Relevant sind in diesem Zusammenhang auch die kürzlich erschienenen Ergebnisse von Matsui et al., die zeigten, dass die Plasma-sFlt-1-Level nach Heparin-Gabe ansteigen und erst etwa eine Stunde später wieder ihren Ausgangswert erreichten. Biologisch aktives sFlt-1 findet sich auch gebunden an extrazelluläre Matrix[124], weshalb sich die aktiven sFlt-1-Spiegel erst nach Heparin-Gabe messen lassen. Der sFlt-1-Anstieg fiel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz deutlich geringer aus als bei gesunden Kontrollen. Vor der Gabe von Heparin zeigte sich eine negative Korrelation der sFlt-1-Spiegel mit der Nierenfunktion, nach der Gabe jedoch eine positive Korrelation[124]. Dadurch können sowohl die Ergebnisse von DiMarco et al. als auch die Ergebnisse von Onoue et al. erklärt werden. Auch Matsui et al. werten sFlt-1 als einen protektiven Faktor im Rahmen der Atherosklerose und identifizierten erniedrigte sFlt-1-Spiegel nach Heparin-Gabe als einen kardiovaskulären Risikofaktor. Es wird vermutet, dass sFlt-1 durch die Hemmung der proangiogenetischen Faktoren VEGF und PDGF und damit der Plaque-Angiogenese, zur Stabilisierung der Plaques beiträgt[124]. Yuan et al. fanden bei dialysierten Patienten erhöhte sFlt-1-Spiegel im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Diese waren allerdings nicht mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Eine solche Assoziation lag nur dann vor, wenn gleichzeitig der Entzündungsmarker Il-6 erhöht

war. Im Gegensatz dazu waren erhöhte VEGF-Spiegel deutlich mit einer erhöhten Mortalität assoziiert[122]. Ebenso wie die Rolle von VEGF kann auch die Rolle von sFlt-1 in der Nierentransplantation noch nicht abschließend beurteilt werden.

## 5.7 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass Autoantikörper, die gegen den GPCR PAR-1 gerichtet sind, zu einer deutlichen Herabregulation der VEGF-mRNA-Bildung und Proteinsekretion führen. Dies wird über eine Induktion von cFos vermittelt, welches mit einem noch unbekanntem Partner als Heterodimer AP-1 an den VEGF-Promoter bindet und die Bildung von VEGF-mRNA hemmt.

Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass Antikörper, welche von Patienten mit akuter Nierentransplantatabstoßung isoliert wurden, die HLA-negativ waren, zu einer deutlichen Induktion der sFlt-1-Sekretion von HMEC-1 führten.

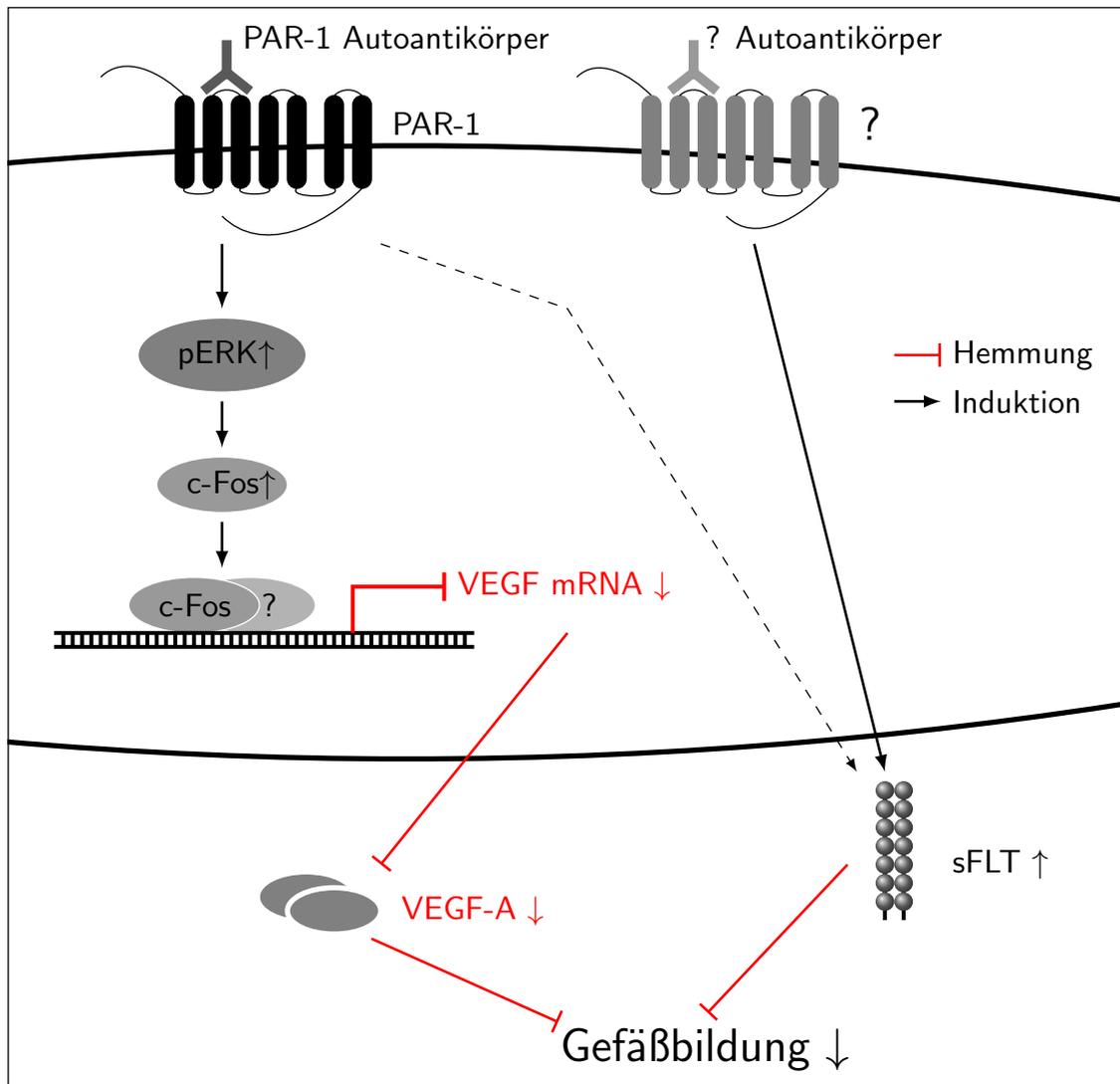
Abbildung 5.1 gibt einen Überblick über die Regulation der VEGF-Sekretion durch die PAR-1-Autoantikörper, wie sie sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit sowie bisher unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe schlussfolgern lässt.

Obwohl in der Arbeit neue und bedeutsame Aspekte zur Regulation von VEGF durch Autoantikörper in Endothelzellen gezeigt werden konnten, bleiben noch viele Fragen offen, die Möglichkeiten für neue Forschungsarbeiten bieten.

Die Arbeit mit Zellkulturen bietet gute Möglichkeiten für die Grundlagenforschung. Sie kann aber die komplexen Zusammenhänge im menschlichen Organismus nur unzureichend darstellen. Zur Bewertung der klinischen Relevanz der Antikörper sind klinische Studien mit Messung der VEGF-Spiegel und der Antikörpertiter notwendig, diese sollten nach Möglichkeit prospektiv angelegt sein.

Die Identifikation des Bindungspartners von cFos im Kontext der Herabregulation von VEGF durch die Autoantikörper stellt eine bedeutsame Fragestellung für die Grundlagenforschung dar.

Auch die genaue Regulation von sFlt-1 durch die Autoantikörper bietet interessantes Material, sowohl für weitere Grundlagenforschung und Zellkulturexperimente als auch für klinische Studien.



**Abbildung 5.1:** Eine schematische Darstellung der Regulation von VEGF durch die PAR-1-Autoantikörper. Die Antikörper führen zu einer PAR-1-abhängigen Phosphorylierung von ERK, wodurch es wiederum zu einer Induktion von cFos kommt. CFos bildet zusammen mit einem noch nicht identifizierten Partner das Heterodimer aktivierendes Protein 1 (AP-1) und bindet an den VEGF-Promoter, wo es die Bildung von VEGF-mRNA, und dadurch auch die Bildung von VEGF-Protein, hemmt. Außerdem kommt es, vermittelt durch einen noch nicht identifizierten Rezeptor, zur vermehrten Bildung von sFlt-1, wobei ein kleiner Teil der Wirkung auch PAR-1-vermittelt sein könnte. Zusammen führen die vermehrte sFLT-Bildung und die verminderte VEGF-Bildung zu einer gestörten Gefäßneubildung.

# Literaturverzeichnis

- [1] R M Hinman, M J Smith, and J C Cambier. B cells and type 1 diabetes in mice and men. *Immunol Lett*, Jan 2014. doi: 10.1016/j.imlet.2014.01.010.
- [2] F Menconi, C Marcocci, and M Marinò. Diagnosis and classification of graves' disease. *Autoimmun Rev*, Jan 2014. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.013.
- [3] R A Lewis, J F Selwa, and R P Lisak. Myasthenia gravis: immunological mechanisms and immunotherapy. *Ann Neurol*, 37 Suppl 1:51–62, May 1995.
- [4] G Wallukat, V Homuth, T Fischer, C Lindschau, B Horstkamp, A Jüpner, E Baur, E Nissen, K Vetter, D Neichel, J W Dudenhausen, H Haller, and F C Luft. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin at1 receptor. *J Clin Invest*, 103(7):945–952, Apr 1999. doi: 10.1172/JCI4106.
- [5] Y Kawaguchi, K Takagi, M Hara, C Fukasawa, T Sugiura, E Nishimagi, M Harigai, and N Kamatani. Angiotensin ii in the lesional skin of systemic sclerosis patients contributes to tissue fibrosis via angiotensin ii type 1 receptors. *Arthritis Rheum*, 50(1):216–226, Jan 2004. doi: 10.1002/art.11364.
- [6] M R Parrish, M J Ryan, P Glover, J Brewer, L Ray, R Dechend, J N Martin, and B B Lamarca. Angiotensin ii type 1 autoantibody induced hypertension during pregnancy is associated with renal endothelial dysfunction. *Genet Med*, 8(3):184–188, Jun 2011. doi: 10.1016/j.genm.2011.04.003.
- [7] C C Zhou, S Ahmad, T Mi, S Abbasi, L Xia, M C Day, S M Ramin, A Ahmed, R E Kellems, and Y Xia. Autoantibody from women with preeclampsia induces soluble fms-like tyrosine kinase-1 production via angiotensin type 1 receptor and calcineurin/nuclear factor of activated t-cells signaling. *Hypertension*, 51(4):1010–1019, Apr 2008. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.097790.
- [8] C C Zhou, S Ahmad, T Mi, L Xia, S Abbasi, P W Hewett, C Sun, A Ahmed, R E Kellems, and Y Xia. Angiotensin ii induces soluble fms-like tyrosine kinase-1 release via calcineurin signaling pathway in pregnancy. *Circ Res*, 100(1):88–95, Jan 2007. doi: 10.1161/01.RES.0000254703.11154.18.
- [9] D Dragun, D N Müller, J H Bräsen, L Fritsche, M Nieminen-Kelhä, R Dechend, U Kintscher, B Rudolph, J Hoebeke, D Eckert, I Mazak, R Plehm, C Schönemann, T Unger, K Budde, H H Neumayer, F C Luft, and G Wallukat. Angiotensin ii type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med*, 352(6):558–569, Feb 2005. doi: 10.1056/NEJMoa035717.

- [10] G Riemekasten, A Philippe, M Näther, T Slowinski, D N Müller, H Heidecke, M Matucci-Cerinic, L Czirják, I Lukitsch, M Becker, A Kill, J M van Laar, R Cartar, F C Luft, G R Burmester, B Hegner, and D Dragun. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*, 70(3):530–536, Mar 2011. doi: 10.1136/ard.2010.135772.
- [11] J Hoebeke. La seconde boucle extracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G : une cible préférentielle pour des autoanticorps fonctionnels. *M/S Synthèse*, 11(12):1661–1667, Dec 1995.
- [12] J-Freier. *Charakterisierung von Autoantikörpern gegen Protease-aktivierte Rezeptoren 1 und 2 und gegen Endothelin-Rezeptor ET(A): Einfluss auf die Funktion von Zellen des Herz-Kreislauf- Systems*. PhD thesis, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin, 2007.
- [13] T K Vu, D T Hung, V I Wheaton, and S R Coughlin. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell*, 64(6):1057–1068, Mar 1991.
- [14] H Lee and J R Hamilton. Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease. *Pharmacol Ther*, 134(2):246–259, May 2012. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.01.007.
- [15] A Ortiz-Stern, X Deng, N Smoktunowicz, P F Mercer, and R C Chambers. Par-1-dependent and par-independent pro-inflammatory signaling in human lung fibroblasts exposed to thrombin. *J Cell Physiol*, 227(11):3575–3584, Nov 2012. doi: 10.1002/jcp.24061.
- [16] H P Luther, V Homuth, and G Wallukat. Alpha 1-adrenergic receptor antibodies in patients with primary hypertension. *Hypertension*, 29(2):678–682, Feb 1997.
- [17] G Wallukat, E Nissen, R Morwinski, and J Müller. Autoantibodies against the beta- and muscarinic receptors in cardiomyopathy. *Herz*, 25(3):261–266, May 2000.
- [18] M L Fu, H Herlitz, W Schulze, G Wallukat, P Micke, P Eftekhari, K G Sjögren, A Hjalmarsen, W Müller-Esterl, and J Hoebeke. Autoantibodies against the angiotensin receptor (at1) in patients with hypertension. *J Hypertens*, 18(7):945–953, Jul 2000.
- [19] P Eftekhari, L Sallé, F Lezoualc’h, J Mialet, M Gastineau, J P Briand, D A Isenberg, G J Fournié, J Argibay, R Fischmeister, S Muller, and J Hoebeke. Anti-ssa/ro52 autoantibodies blocking the cardiac 5-HT<sub>4</sub> serotonergic receptor could explain neonatal lupus congenital heart block. *Eur J Immunol*, 30(10):2782–2790, Oct 2000. doi: 10.1002/1521-4141(200010)30:10<2782::AID-IMMU2782>3.0.CO;2-9.

- [20] S S Baroni, M Santillo, F Bevilacqua, M Luchetti, T Spadoni, M Mancini, P Fraticelli, P Sambo, A Funaro, A Kazlauskas, E V Avvedimento, and A Gabrielli. Stimulatory autoantibodies to the pdgf receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*, 354(25): 2667–2676, Jun 2006. doi: 10.1056/NEJMoa052955.
- [21] M Taniguchi, L M Rebellato, J Cai, J Hopfield, K P Briley, C E Haisch, P G Catrou, P Bolin, K Parker, W T Kendrick, S A Kendrick, R C Harland, and P I Terasaki. Higher risk of kidney graft failure in the presence of anti-angiotensin ii type-1 receptor antibodies. *Am J Transplant*, 13(10):2577–2589, Oct 2013. doi: 10.1111/ajt.12395.
- [22] U.S. Renal Data System. Usrds 2013 annual data report: Atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the united states. Technical report, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2013. Band 2, Kapitel 5.
- [23] A J Matas, J M Smith, M A Skeans, B Thompson, S K Gustafson, M A Schnitzler, D E Stewart, W S Cherikh, J L Wainright, J J Snyder, A K Israni, and B L Kasiske. Optn/srtr 2012 annual data report: kidney. *Am J Transplant*, 14 Suppl 1:11–44, Jan 2014. doi: 10.1111/ajt.12579.
- [24] W Fadili, M Habib Allah, and I Laouad. Chronic renal allograft dysfunction: risk factors, immunology and prevention. *Arab J Nephrol Transplant*, 6(1):45–50, Jan 2013.
- [25] H U Meier-Kriesche, J D Schold, and B Kaplan. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant*, 4(8):1289–1295, Aug 2004. doi: 10.1111/j.1600-6143.2004.00515.x.
- [26] B J Nankivell and D R Kuypers. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*, 378(9800):1428–1437, Oct 2011. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60699-5.
- [27] F M Steegh, M A Gelens, F H Nieman, J P van Hooff, J P Cleutjens, R J van Suylen, M J Daemen, E L van Heurn, M H Christiaans, and C J Peutz-Kootstra. Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 22(6):1024–1029, Jun 2011. doi: 10.1681/ASN.2010050531.
- [28] K Solez, R B Colvin, L C Racusen, B Sis, P F Halloran, P E Birk, P M Campbell, M Cascalho, A B Collins, A J Demetris, C B Drachenberg, I W Gibson, P C Grimm, M Haas, E Lerut, H Liapis, R B Mannon, P B Marcus, M Mengel, M J Mihatsch, B J Nankivell, V Nিকেleit, J C Papadimitriou, J L Platt, P Randhawa, I Roberts, L Salinas-Madruga, D R Salomon, D Seron, M Sheaff, and J J Weening. Banff '05 meeting report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of

- chronic allograft nephropathy ('can'). *Am J Transplant*, 7(3):518–526, Mar 2007. doi: 10.1111/j.1600-6143.2006.01688.x.
- [29] X Zhang and E F Reed. Effect of antibodies on endothelium. *Am J Transplant*, 9(11): 2459–2465, Nov 2009. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02819.x.
- [30] J E Deanfield, J P Halcox, and T J Rabelink. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation*, 115(10):1285–1295, Mar 2007. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.652859.
- [31] B Ivanyi. Transplant capillaropathy and transplant glomerulopathy: ultrastructural markers of chronic renal allograft rejection. *Nephrol Dial Transplant*, 18(4):655–660, Apr 2003.
- [32] F H Epstein, Y Agmon, and M Brezis. Physiology of renal hypoxia. *Ann N Y Acad Sci*, 718:72–81, Apr 1994.
- [33] D Guerrot, J C Dussaule, P Kavvadas, J J Boffa, C E Chadjichristos, and C Chatziantoniou. Progression of renal fibrosis: the underestimated role of endothelial alterations. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5 Suppl 1, Jun 2012. doi: 10.1186/1755-1536-5-S1-S15.
- [34] N Ferrara, K Carver-Moore, H Chen, M Dowd, L Lu, K S O’Shea, L Powell-Braxton, K J Hillan, and M W Moore. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the vegf gene. *Nature*, 380(6573):439–442, Apr 1996. doi: 10.1038/380439a0.
- [35] N Ferrara, H P Gerber, and J LeCouter. The biology of vegf and its receptors. *Nat Med*, 9(6):669–676, Jun 2003. doi: 10.1038/nm0603-669.
- [36] E Dupuy, A Habib, M Leuret, R Yang, S Levy-Toledano, and G Tobelem. Thrombin induces angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in human endothelial cells: possible relevance to hif-1alpha. *J Thromb Haemost*, 1(5):1096–1102, May 2003.
- [37] V Eremina, J A Jefferson, J Kowalewska, H Hochster, M Haas, J Weisstuch, C Richardson, J B Kopp, M G Kabir, P H Backx, H P Gerber, N Ferrara, L Barisoni, C E Alpers, and S E Quaggin. Vegf inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*, 358(11):1129–1136, Mar 2008. doi: 10.1056/NEJMoa0707330.
- [38] H P Gerber, K J Hillan, A M Ryan, J Kowalski, G A Keller, L Rangell, B D Wright, F Radtke, M Aguet, and N Ferrara. Vegf is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126(6):1149–1159, Mar 1999.

- [39] T Kamba, B Y Tam, H Hashizume, A Haskell, B Sennino, M R Mancuso, S M Norberg, S M O'Brien, R B Davis, L C Gowen, K D Anderson, G Thurston, S Joho, M L Springer, C J Kuo, and D M McDonald. Vegf-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290(2):560–576, Feb 2006. doi: 10.1152/ajpheart.00133.2005.
- [40] S Koch, S Tugues, X Li, L Gualandi, and L Claesson-Welsh. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*, 437(2):169–183, Jul 2011. doi: 10.1042/BJ20110301.
- [41] F Shalaby, J Rossant, T P Yamaguchi, M Gertsenstein, X F Wu, M L Breitman, and A C Schuh. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535):62–66, Jul 1995. doi: 10.1038/376062a0.
- [42] G H Fong, J Rossant, M Gertsenstein, and M L Breitman. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 376(6535):66–70, Jul 1995. doi: 10.1038/376066a0.
- [43] S Hiratsuka, O Minowa, J Kuno, T Noda, and M Shibuya. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16):9349–9354, Aug 1998.
- [44] L Miquerol, B L Langille, and A Nagy. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*, 127(18):3941–3946, Sep 2000.
- [45] G Pagès and J Pouyssegur. Transcriptional regulation of the vascular endothelial growth factor gene—a concert of activating factors. *Cardiovasc Res*, 65(3):564–573, Feb 2005. doi: 10.1016/j.cardiores.2004.09.032.
- [46] A P Levy, N S Levy, S Wegner, and M A Goldberg. Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J Biol Chem*, 270(22):13333–13340, Jun 1995.
- [47] R Catar, J Witowski, P Wagner, I A Schramm, E Kawka, A Philippe, D Dragun, and A Jörres. The proto-oncogene c-fos transcriptionally regulates vegf production during peritoneal inflammation. *Kidney Int*, Jun 2013. doi: 10.1038/ki.2013.217.
- [48] H Shimoyamada, T Yazawa, H Sato, K Okudela, J Ishii, M Sakaeda, K Kashiwagi, T Suzuki, H Mitsui, T Woo, M Tajiri, T Ohmori, T Ogura, M Masuda, H Oshiro, and H Kitamura. Early growth response-1 induces and enhances vascular endothelial growth factor- $\alpha$  expression in lung cancer cells. *Am J Pathol*, 177(1):70–83, Jul 2010. doi: 10.2353/ajpath.2010.091164.

- [49] S Loeffler, B Fayard, J Weis, and J Weissenberger. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (vegf) in astrocytes in vivo and regulates vegf promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between stat3 and sp1. *Int J Cancer*, 115(2):202–213, Jun 2005. doi: 10.1002/ijc.20871.
- [50] H A Kim, K H Seo, Y R Kang, H M Ko, K J Kim, H K Back, H K Lee, and S Y Im. Mechanisms of platelet-activating factor-induced enhancement of vegf expression. *Cell Physiol Biochem*, 27(1):55–62, 2011. doi: 10.1159/000325205.
- [51] C J Robinson and S E Stringer. The splice variants of vascular endothelial growth factor (vegf) and their receptors. *J Cell Sci*, 114(Pt 5):853–865, Mar 2001.
- [52] P Pan, H Fu, L Zhang, H Huang, F Luo, W Wu, Y Guo, and X Liu. Angiotensin ii upregulates the expression of placental growth factor in human vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*, 11:36–36, 2010. doi: 10.1186/1471-2121-11-36.
- [53] L Ma and A Dorling. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol*, 34(1):63–72, Jan 2012. doi: 10.1007/s00281-011-0281-9.
- [54] M E Maragoudakis, N E Tsopanoglou, and P Andriopoulou. Mechanism of thrombin-induced angiogenesis. *Biochemical Society Transactions*, 30(part 2):173–177, 2002.
- [55] E. W. Ades, F. J. Candal, R. A. Swerlick, V. G. George, S. Summers, D. C. Bosse, and T. J. Lawley. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.*, 99(6):683–690, Dec 1992.
- [56] B. Holzapfel and L. Wickert. Methoden und Anwendungsgebiete: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol. Unserer Zeit*, 37(2):120–126, 2007.
- [57] G Finkenzeller, A Sparacio, A Technau, D Marmé, and G Siemeister. Sp1 recognition sites in the proximal promoter of the human vascular endothelial growth factor gene are essential for platelet-derived growth factor-induced gene expression. *Oncogene*, 15(6):669–676, Aug 1997. doi: 10.1038/sj.onc.1201219.
- [58] M. Fried and D. M. Crothers. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.*, 9(23):6505–6525, Dec 1981.
- [59] L. M. Hellman and M. G. Fried. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat Protoc*, 2(8):1849–1861, 2007.
- [60] J. Kang, M. S. Lee, and D. G. Gorenstein. Quantitative analysis of chemiluminescence signals using a cooled charge-coupled device camera. *Anal. Biochem.*, 345(1):66–71, Oct 2005.

- [61] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(1):265–275, Nov 1951.
- [62] E. Hilario. End labeling procedures: an overview. *Mol. Biotechnol.*, 28(1):77–80, Sep 2004.
- [63] S M Elbashir, J Harborth, W Lendeckel, A Yalcin, K Weber, and T Tuschl. Duplexes of 21-nucleotide rnas mediate rna interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411(6836):494–498, May 2001. doi: 10.1038/35078107.
- [64] L G Modelli de Andrade, R M Viero, and M F Carvalho. Role of peritubular capillaries and vascular endothelial growth factor in chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc*, 41(9):3720–3725, Nov 2009. doi: 10.1016/j.transproceed.2009.06.181.
- [65] M S Bernatowicz, C E Klimas, K S Hartl, M Peluso, N J Allegretto, and S M Seiler. Development of potent thrombin receptor antagonist peptides. *Journal of Medical Chemistry*, (39):4879 – 4887, 1996.
- [66] S Bassus, O Herkert, N Kronemann, A Görlach, D Bremerich, C M Kirchmaier, R Busse, and V B Schini-Kerth. Thrombin causes vascular endothelial growth factor expression in vascular smooth muscle cells: role of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21(9):1550–1555, Sep 2001.
- [67] Y Q Huang, J J Li, L Hu, M Lee, and S Karpatkin. Thrombin induces increased expression and secretion of vegf from human fs4 fibroblasts, du145 prostate cells and chrf megakaryocytes. *Thromb Haemost*, 86(4):1094–1098, Oct 2001.
- [68] L Ma, R Perini, W McKnight, M Dicay, A Klein, M D Hollenberg, and J L Wallace. Proteinase-activated receptors 1 and 4 counter-regulate endostatin and vegf release from human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(1):216–220, Jan 2005. doi: 10.1073/pnas.0406682102.
- [69] K P Sarker, K K Biswas, K Yamaji, M Yamakuchi, T Hashiguchi, K Y Lee, and I Maruyama. Inhibition of thrombin-induced vascular endothelial growth factor production in human neuroblastoma (nb-1) cells by argatroban. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 34(1):41–47, 2005. doi: 10.1159/000088547.
- [70] J Liu, P Schuff-Werner, and M Steiner. Thrombin/thrombin receptor (par-1)-mediated induction of il-8 and vegf expression in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 343(1):183–189, Apr 2006. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.02.136.
- [71] Y Xu, Y Gu, R F Keep, J Heth, K M Muraszko, G Xi, and Y Hua. Thrombin up-regulates vascular endothelial growth factor in experimental gliomas. *Neurol Res*, 31(7):759–765, Sep 2009. doi: 10.1179/174313209X385699.

- [72] Y Furukawa, Y Kawano, J Fukuda, H Matsumoto, and H Narahara. The production of vascular endothelial growth factor and metalloproteinase via protease-activated receptor in human endometrial stromal cells. *Fertil Steril*, 91(2):535–541, Feb 2009. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.080.
- [73] P Angel and M Karin. The role of jun, fos and the ap-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072(2-3):129–157, Dec 1991.
- [74] J Joško and M Mazurek. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (vegf) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit*, 10(4):89–98, Apr 2004.
- [75] Y Murakami, K Watari, T Shibata, M Uba, H Ureshino, A Kawahara, H Abe, H Izumi, N Mukaida, M Kuwano, and M Ono. N-myc downstream-regulated gene 1 promotes tumor inflammatory angiogenesis through jnk activation and autocrine loop of interleukin-1 $\beta$  by human gastric cancer cells. *J Biol Chem*, 288(35):25025–25037, Aug 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.472068.
- [76] H T Cook, R Tarzi, Z D’Souza, G Laurent, W C Lin, T J Aitman, F Mechta-Grigoriou, and J Behmoaras. Ap-1 transcription factor jund confers protection from accelerated nephrotoxic nephritis and control podocyte-specific vegfa expression. *Am J Pathol*, 179(1):134–140, Jul 2011. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.006.
- [77] G S Di Marco, S Reuter, U Hillebrand, S Amler, M König, E Larger, H Oberleithner, E Brand, H Pavenstädt, and M Brand. The soluble vegf receptor sflt1 contributes to endothelial dysfunction in ckd. *J Am Soc Nephrol*, 20(10):2235–2245, Oct 2009. doi: 10.1681/ASN.2009010061.
- [78] C J Lockwood, P Toti, F Arcuri, E Norwitz, E F Funai, S T Huang, L F Buchwalder, G Krikun, and F Schatz. Thrombin regulates soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sflt-1) expression in first trimester decidua: implications for preeclampsia. *Am J Pathol*, 170(4):1398–1405, Apr 2007. doi: 10.2353/ajpath.2007.060465.
- [79] S Jesmin, T Wada, S Gando, S S Sultana, and S Zaedi. The dynamics of angiogenic factors and their soluble receptors in relation to organ dysfunction in disseminated intravascular coagulation associated with sepsis. *Inflammation*, 36(1):186–196, Feb 2013. doi: 10.1007/s10753-012-9534-6.
- [80] Y Zhao, K Koga, Y Osuga, M Nagai, G Izumi, M Takamura, M Harada, Y Hirota, O Yoshino, and Y Taketani. Thrombin enhances soluble fms-like tyrosine kinase 1 expression in trophoblasts; possible involvement in the pathogenesis of preeclampsia. *Fertil Steril*, 98(4):917–921, Oct 2012. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.038.

- [81] J Bayliss, M Bailey, A Leet, A N Stein, N M Thomson, and C A McLean. Late onset antibody-mediated rejection and endothelial localization of vascular endothelial growth factor are associated with development of cardiac allograft vasculopathy. *Transplantation*, 86(7):991–997, Oct 2008. doi: 10.1097/TP.0b013e318186d734.
- [82] M Bieri, M Oroszlan, A Farkas, N Ligeti, J Bieri, and P Mohacsi. Anti-hla i antibodies induce vegf production by endothelial cells, which increases proliferation and paracellular permeability. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(12):2422–2430, Dec 2009. doi: 10.1016/j.biocel.2009.06.009.
- [83] C H Hong, C H Lee, L W Chang, M H Chiou, M C Hsieh, Y H Kao, and H S Yu. Anti-endothelial cell igg from patients with chronic arsenic poisoning induces endothelial proliferation and vegf-dependent angiogenesis. *Microvasc Res*, 76(3):194–201, Nov 2008. doi: 10.1016/j.mvr.2008.07.001.
- [84] Y D Jung, K Nakano, W Liu, G E Gallick, and L M Ellis. Extracellular signal-regulated kinase activation is required for up-regulation of vascular endothelial growth factor by serum starvation in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 59:4804–4807, 1999.
- [85] A M Latham, A F Odell, N A Mughal, T Issitt, C Ulyatt, J H Walker, S Homer-Vanniasinkam, and S Ponnambalam. A biphasic endothelial stress-survival mechanism regulates the cellular response to vascular endothelial growth factor a. *Exp Cell Res*, 318(18):2297–2311, Nov 2012. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.06.023.
- [86] B Akerström and L Björck. A physicochemical study of protein g, a molecule with unique immunoglobulin g-binding properties. *J Biol Chem*, 261(22):10240–10247, Aug 1986.
- [87] H W Schroeder and L Cavacini. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2):41–52, Feb 2010. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.
- [88] M Giral, Y Foucher, A Dufay, J P Van Huyen, K Renaudin, A Moreau, A Philippe, B Hegner, R Dechend, H Heidecke, S Brouard, A Cesbron, S Castagnet, A Devys, J P Souillou, and D Dragun. Pretransplant sensitization against angiotensin ii type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *Am J Transplant*, 13(10):2567–2576, Oct 2013. doi: 10.1111/ajt.12397.
- [89] R Anandanadesan, Q Gong, G Chipitsyna, A Witkiewicz, C J Yeo, and H A Arafat. Angiotensin ii induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin ii type 1 receptor and erk1/2 signaling. *J Gastrointest Surg*, 12(1):57–66, Jan 2008. doi: 10.1007/s11605-007-0403-9.

- [90] S Soliman, A El-Remessy, T Ishrat, A Pillai, P Somanath, A Ergul, and S Fagan. Can-desartan induces a prolonged proangiogenic effect and augments endothelium-mediated neuroprotection after oxygen and glucose deprivation: Role of vegf-a and b. *J Pharmacol Exp Ther*, Mar 2014. doi: 10.1124/jpet.113.212613.
- [91] C Ma, X C Lu, Y Luo, J Cao, B Yang, Y Gao, X F Liu, and L Fan. Angiogenesis related gene expression profiles of ea.hy926 cells induced by irbesartan: a possible novel therapeutic approach. *Chin Med J (Engl)*, 125(8):1369–1375, Apr 2012.
- [92] H Tsukahara, H Ende, H I Magazine, W F Bahou, and M S Goligorsky. Molecular and functional characterization of the non-isopeptide-selective etb receptor in endothelial cells. receptor coupling to nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 269(34):21778–21785, Aug 1994.
- [93] M H Wu, C Y Huang, J A Lin, S W Wang, C Y Peng, H C Cheng, and C H Tang. Endothelin-1 promotes vascular endothelial growth factor-dependent angiogenesis in human chondrosarcoma cells. *Oncogene*, 33(13):1725–1735, Mar 2014. doi: 10.1038/onc.2013.109.
- [94] A Matsuura, W Yamochi, K Hirata, S Kawashima, and M Yokoyama. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. *Hypertension*, 32(1):89–95, Jul 1998.
- [95] E Garrafa, V Caprara, V Di Castro, L Rosanò, A Bagnato, and F Spinella. Endothelin-1 cooperates with hypoxia to induce vascular-like structures through vascular endothelial growth factor-c, -d and -a in lymphatic endothelial cells. *Life Sci*, 91(13-14):638–643, Oct 2012. doi: 10.1016/j.lfs.2012.03.033.
- [96] F Spinella, V Caprara, R Cianfrocca, L Rosanò, V Di Castro, E Garrafa, P G Natali, and A Bagnato. The interplay between hypoxia, endothelial and melanoma cells regulates vascularization and cell motility through endothelin-1 and vascular endothelial growth factor. *Carcinogenesis*, Feb 2014. doi: 10.1093/carcin/bgu018.
- [97] N E Tsopanoglou, E Pipili-Synetos, and M E Maragoudakis. Thrombin promotes angiogenesis by a mechanism independent of fibrin formation. *Am J Physiol*, 264(5 Pt 1):1302–1307, May 1993.
- [98] J S Blackburn and C E Brinckerhoff. Matrix metalloproteinase-1 and thrombin differentially activate gene expression in endothelial cells via par-1 and promote angiogenesis. *Am J Pathol*, 173(6):1736–1746, Dec 2008. doi: 10.2353/ajpath.2008.080512.
- [99] S F Steinberg. The cardiovascular actions of protease-activated receptors. *Mol Pharmacol*, 67(1):2–11, Jan 2005. doi: 10.1124/mol.104.003103.

- [100] C Zhang, Y Srinivasan, D H Arlow, J J Fung, D Palmer, Y Zheng, H F Green, A Pandey, R O Dror, D E Shaw, W I Weis, S R Coughlin, and B K Kobilka. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature*, 492(7429):387–392, Dec 2012. doi: 10.1038/nature11701.
- [101] K Yanaba, Y Asano, S Noda, K Akamata, N Aozasa, T Taniguchi, T Takahashi, Y Ichimura, T Toyama, H Sumida, Y Kuwano, Y Tada, M Sugaya, T Kadono, and S Sato. Increased circulating fibrinogen-like protein 2 in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*, 32(1):43–47, Jan 2013. doi: 10.1007/s10067-012-2089-y.
- [102] K Wagner, M Peters, A Scholz, C Benckert, H S Ruderisch, B Wiedenmann, and S Rowsewicz. Activin a stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*, 126(7):1828–1843, Jun 2004.
- [103] B Salimath, D Marmé, and G Finkenzeller. Expression of the vascular endothelial growth factor gene is inhibited by p73. *Oncogene*, 19(31):3470–3476, Jul 2000. doi: 10.1038/sj.onc.1203672.
- [104] H Buteau-Lozano, M Ancelin, B Lardeux, J Milanini, and M Perrot-Applanat. Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: a complex interplay between estrogen receptors alpha and beta. *Cancer Res*, 62(17):4977–4984, Sep 2002.
- [105] Y Kitadai, H Yamazaki, W Yasui, E Kyo, H Yokozaki, G Kajiyama, A C Johnson, I Pastan, and E Tahara. Gc factor represses transcription of several growth factor/receptor genes and causes growth inhibition of human gastric carcinoma cell lines. *Cell Growth Differ*, 4(4):291–296, Apr 1993.
- [106] K Salnikow, T Kluz, M Costa, D Piquemal, Z N Demidenko, K Xie, and M V Blagosklonny. The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-jun/ap-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol*, 22(6):1734–1741, Mar 2002.
- [107] P Monje, M J Marinissen, and J S Gutkind. Phosphorylation of the carboxyl-terminal transactivation domain of c-fos by extracellular signal-regulated kinase mediates the transcriptional activation of ap-1 and cellular transformation induced by platelet-derived growth factor. *Mol Cell Biol*, 23(19):7030–7043, Oct 2003.
- [108] P Monje, J Hernández-Losa, R J Lyons, M D Castellone, and J S Gutkind. Regulation of the transcriptional activity of c-fos by erk. a novel role for the prolyl isomerase pin1. *J Biol Chem*, 280(42):35081–35084, Oct 2005. doi: 10.1074/jbc.C500353200.

- [109] M Chapal, M Néel, F Le Borgne, E Meffray, O Carceles, M Hourmant, M Giral, Y Foucher, A Moreau, and F Fakhouri. Increased soluble flt-1 correlates with delayed graft function and early loss of peritubular capillaries in the kidney graft. *Transplantation*, 96(8):739–744, Oct 2013. doi: 10.1097/TP.0b013e31829f4772.
- [110] K Yano, P C Liaw, J M Mullington, S C Shih, H Okada, N Bodyak, P M Kang, L Toltl, B Belikoff, J Buras, B T Simms, J P Mizgerd, P Carmeliet, S A Karumanchi, and W C Aird. Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med*, 203(6):1447–1458, Jun 2006. doi: 10.1084/jem.20060375.
- [111] P N Tsao, F T Chan, S C Wei, W S Hsieh, H C Chou, Y N Su, C Y Chen, W M Hsu, F J Hsieh, and S M Hsu. Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit Care Med*, 35(8):1955–1960, Aug 2007. doi: 10.1097/01.CCM.0000275273.56547.B8.
- [112] B Al-Ani, P W Hewett, M J Cudmore, T Fujisawa, M Saifeddine, H Williams, W Ramma, S Sissaoui, P S Jayaraman, M Ohba, S Ahmad, M D Hollenberg, and A Ahmed. Activation of proteinase-activated receptor 2 stimulates soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 release via epidermal growth factor receptor transactivation in endothelial cells. *Hypertension*, 55(3):689–697, Mar 2010. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.136333.
- [113] A R Chade and S Kelsen. Reversal of renal dysfunction by targeted administration of vegf into the stenotic kidney: a novel potential therapeutic approach. *Am J Physiol Renal Physiol*, 302:F1342–F1350, Feb 2012. doi: 10.1152/ajprenal.00674.2011.
- [114] M E Reinders, M Sho, A Izawa, P Wang, D Mukhopadhyay, K E Koss, C S Geehan, A D Luster, M H Sayegh, and D M Briscoe. Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J Clin Invest*, 112(11):1655–1665, Dec 2003. doi: 10.1172/JCI17712.
- [115] M Shahbazi, A A Fryer, V Pravica, I J Brogan, H M Ramsay, I V Hutchinson, and P N Harden. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol*, 13(1):260–264, Jan 2002.
- [116] M A Jiménez-Sousa, A Fernández-Rodríguez, M Heredia, E Tamayo, M Guzmán-Fulgencio, C Lajo, E López, J I Gómez-Herrerías, J Bustamante, J F Bermejo-Martín, and S Resino. Genetic polymorphisms located in tgfb1, agr1, and vegfa genes are associated to chronic renal allograft dysfunction. *Cytokine*, 58(3):321–326, Jun 2012. doi: 10.1016/j.cyto.2012.02.017.
- [117] F B Lemos, W M Mol, J I Roodnat, A Uitterlinden, J N Ijzermans, W Weimar, and C C Baan. The beneficial effects of recipient-derived vascular endothelial growth factor

- on graft survival after kidney transplantation. *Transplantation*, 79(9):1221–1225, May 2005.
- [118] I Baumgartner, A Pieczek, O Manor, R Blair, M Kearney, K Walsh, and J M Isner. Constitutive expression of phvegfl65 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*, 97(12): 1114–1123, Mar 1998.
- [119] Y Cao, X Zhou, H Liu, Y Zhang, X Yu, and C Liu. The nf- $\kappa$ b pathway: regulation of the instability of atherosclerotic plaques activated by fg, fb, and fdps. *Mol Cell Biochem*, 383(1-2):29–37, Nov 2013. doi: 10.1007/s11010-013-1751-2.
- [120] C Castellani, A Angelini, O J de Boer, C M van der Loos, M Fedrigo, A C Frigo, L B Meijer-Jorna, X Li, H J Ploegmakers, F Tona, G Feltrin, G Gerosa, M Valente, G Thiene, and A C van der Wal. Intraplaque hemorrhage in cardiac allograft vasculopathy. *Am J Transplant*, 14(1):184–192, Jan 2014. doi: 10.1111/ajt.12517.
- [121] K Vipattawat, C Kitiyakara, B Phakdeekitcharoen, S Kantachuvesiri, V Sumethkul, S Jirasiritham, W Stitchantrakul, and S Disthabanchong. Vascular calcification in long-term kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)*, 19(4):251–256, Apr 2014. doi: 10.1111/nep.12210.
- [122] J Yuan, Q Guo, A R Qureshi, B Anderstam, M Eriksson, O Heimbürger, P Bárány, P Stenvinkel, and B Lindholm. Circulating vascular endothelial growth factor (vegf) and its soluble receptor 1 (svegfr-1) are associated with inflammation and mortality in incident dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 28(9):2356–2363, Sep 2013. doi: 10.1093/ndt/gft256.
- [123] K Onoue, S Uemura, Y Takeda, S Somekawa, H Iwama, K Imagawa, T Nishida, Y Morikawa, Y Takemoto, O Asai, T Soeda, S Okayama, K Ishigami, K Nakatani, H Kawata, M Horii, T Nakajima, Y Akai, M Iwano, and Y Saito. Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation*, 120(24):2470–2477, Dec 2009. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.867929.
- [124] M Matsui, Y Takeda, S Uemura, T Matsumoto, A Seno, K Onoue, H Tsushima, K Morimoto, T Soeda, S Okayama, S Somekawa, K Samejima, H Kawata, R Kawakami, K Nakatani, M Iwano, and Y Saito. Suppressed soluble fms-like tyrosine kinase-1 production aggravates atherosclerosis in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 85(2): 393–403, Feb 2014. doi: 10.1038/ki.2013.339.

# Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Isa Annett Hosp, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Wirkung von Autoantikörpern gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf die Sekretion von VEGF-A in HMEC's selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

## Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Isa Annett Hosp (Geborene Schramm) hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** R. Catar, I.A. Schramm, M. Simon, O. Wischnewski, A. Philippe, A. Kusch, D. Dragun (2014): Autoimmune Targeting of Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) Dereglates VEGF and Disturbs Neoangiogenesis. Posterpräsentation auf dem World Transplant Congress (WTC). 26. - 31. Juli 2014, San Francisco, USA.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Zellkulturexperimenten, ELISA, EMSA, Promoterdeletionsanalysen und Immunoblots

**Publikation 2:** I.A. Schramm, R. Catar, M. Simon, O. Wischnewski, A. Philippe, A. Kusch, D. Dragun (2014): Autoimmune PAR-1 activation induces dysregulation of VEGF production in Endothelial cells. Posterpräsentation auf dem 5. Kongress Wissenschaftliches Arbeiten im Reformstudiengang. 11. Juli 2014, Berlin, Deutschland.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Zellkulturexperimenten, ELISA, EMSA, Promoterdeletionsanalysen, Immunoblots, Erstellung des Posters und Posterpräsentation

**Publikation 3:** R. Catar, I.A. Schramm, M. Simon, O. Wischnewski, A. Philippe, A. Kusch, D. Dragun (2013): Autoimmune Targeting of Protease Activated Receptor-1 (PAR-1) Deregulates VEGF and Disturbs Neoangiogenesis. Vortrag auf der ASN Kidney week 2013. 05.-10. November 2013, Atlanta, USA.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Zellkulturexperimenten, ELISA, EMSA, Promoterdeletionsanalysen und Immunoblots

**Publikation 4:** I.A. Schramm, R. Catar, M. Simon, O. Wischnewski, A. Philippe, A. Kusch, D. Dragun (2013): Autoimmune targeting of protease activated receptor-1 (PAR-1) deregulates VEGF and disturbs neoangiogenesis. Vortrag auf der 22. Jahrestagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft. 23. - 26. Oktober 2013, Frankfurt am Main, Deutschland.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Zellkulturexperimenten, ELISA, EMSA, Promoterdeletionsanalysen, Immunoblots, Erstellung des Posters und Posterpräsentation

**Publikation 5:** I.A. Schramm, R. Catar, M. Simon, O. Wischnewski, A. Philippe, A. Kusch, D. Dragun (2013): Autoimmune PAR-1 Aktivierung induziert die Dysregulation der Neoangiogenese. Posterpräsentation auf dem Kongress für Nephrologie. 05. - 08. Oktober 2013, Berlin, Deutschland.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Zellkulturexperimenten, ELISA, EMSA, Promoterdeletionsanalysen, Immunoblots, Erstellung des Posters und Posterpräsentation

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift der Doktorandin

## Lebenslauf

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



# Danksagung

Hiermit danke ich Frau Prof. Dr. Duska Dragun für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit machen zu können, sowie für die wertvolle fachliche Unterstützung. Meinem Betreuer Rusan Ali Catar möchte ich dafür danken, dass er mir in allen Phasen meiner Doktorarbeit unterstützt hat. Von den ersten Versuchen bis zum wiederholten Korrekturlesen war er eine zuverlässige Unterstützung und immer für meine Fragen da. Mein Dank geht auch an Angelika Kusch, für die wertvollen Ratschläge beim Fertigstellen der Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Riemekasten für die zur Verfügung gestellten Zellen, mit denen ich meine Versuche durchgeführt habe und Herrn Dr. A. Scholz für die Zurverfügungstellung des VEGF-Promoterkonstruktes.

Bei der Arbeit im Labor hilft man sich immer gegenseitig, so gilt mein Dank allen die mit mir gemeinsam dort geforscht, gelacht und geflucht haben. Eure Unterstützung und Freundschaft hat die Arbeit erst möglich gemacht.

Ich danke auch meinen Eltern, ihr habt mir das Studium ermöglicht und seid immer für mich da, wenn ich euch brauche.

Ganz besonders möchte ich den drei wichtigsten Menschen in meinem Leben danken. Meinem Mann Sven, der mich immer unterstützt und für mich da ist, sowie meinen beiden Söhnen Leon und Anton. Ein Leben ohne euch ist für mich nicht mehr vorstellbar.