

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische
Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Strukturelle und funktionelle Analyse des Angiotensin II-Typ 1-
Rezeptors**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Jason Jannis Gruner

aus Berlin

Datum der Promotion: 17.09.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis.....	6
Abstrakt	7
Abstract.....	9
1. Einleitung.....	10
1.1 Angiotensin-II-Rezeptoren.....	10
1.1.1 Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor	10
1.1.1.1 Studien zur AT ₁ R-Struktur	11
1.1.2 Angiotensin-II-Typ 2 Rezeptor	12
1.2 Angiotensin II.....	12
1.2.1 Ang II-Synthese	12
1.2.2 Ang II-Struktur und -Rezeptorbindung	13
1.2.3 Physiologische und pathophysiologische Effekte vermittelt durch Ang II.....	13
1.3 Gegen den AT₁R gerichtete Immunglobuline G	14
1.3.1 Gegen den AT ₁ R gerichtete Immunglobuline G bei obliterativen Vaskulopathien	14
1.3.1.1 Gegen den AT ₁ R gerichtete Immunglobuline G bei der systemischen Sklerose	15
1.3.1.1.1 Klinische Manifestation der systemischen Sklerose	15
1.3.1.1.2 Pathogenese der systemischen Sklerose.....	15
1.3.1.1.3 Pathophysiologie der AT ₁ R-aktivierenden IgG bei der systemischen Sklerose	16
2. Ziele dieser Arbeit.....	17
3. Material und Methoden.....	18
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Produkte	18
3.1.2 Kits und Plasmide	20
3.1.2.1 Kits	20
3.1.2.2 Plasmide	20
3.1.3 Bakterien, Hefen und Zellen	20
3.1.4 Agonisten, Antagonisten	20
3.1.5 Rezepte für Puffer und Medien	21
3.1.5.1 Rezepte für Puffer	21
3.1.5.2 Rezepte für Medien	22
3.1.6 Geräte	25
3.2 Methoden	26

3.2.1 Herstellung und Validierung der AT ₁ R-Konstrukte	26
3.2.2 Midi-Präparation	27
3.2.3 Stimulantien	28
3.2.3.1 IgG-Isolation	28
3.2.3.1.1 PatientInnenmaterial	28
3.2.3.1.2 Isolation und Dialyse	28
3.2.3.2 Eingesetzte Stimulantien	28
3.2.4 Hefezellmodell	29
3.2.4.1 Hefekultur und -transformation	29
3.2.4.2 Hefe-GPCR-Aktivierungsassay	29
3.2.5 Humanes Endothelzellmodell	30
3.2.5.1 Zellkultur- und Transfektion	30
3.2.5.2 Luciferase-Reporterassay	30
3.2.5.3 EdU-Proliferationsassay	31
3.2.6 Statistische Analyse	31
4. Ergebnisse	32
4.1 Durch die AT₁R⁺-IgG vermittelte AT₁R-Aktivierung wird das G-Protein G_{q/11} rekrutiert ...	32
4.1.1 AT ₁ R-IgG vermitteln die Aktivierung des AT ₁ R in HMEC-1 und induzieren die intrazelluläre Signaltransduktion via G _{q/11} -Protein.....	32
4.2 Die Integrität des ECL 1 des AT₁R ist essentiell für die AT₁R⁺-IgG vermittelte Aktivierung des AT₁R.....	33
4.2.1 Untersuchung eines spezifischeren Epitops für AT ₁ R-IgG innerhalb des ECL 1 des AT ₁ R	34
4.3 AT₁R⁺-IgG induzieren Proliferation von Endothelzellen nur bei intaktem ECL 1 des AT₁R	37
5. Diskussion	41
Referenzen	47
Eidesstattliche Erklärung.....	55
Curriculum vitae	56
Danksagung	57

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	1,2,4-Triazol-3-amin
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
<i>AGTR1</i>	Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor-Gen
AGT	Angiotensinogen
Ala	Alanin
Ang II	Angiotensin II
AS	Aminosäure
AT ₁ R	Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor
AT ₁ R-IgG	Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor-Immunglobulin G
AT ₁ R ⁺ -IgG	Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor-Immunglobulin G positives Plasmaisolat
AT ₂ R	Angiotensin-II-Typ 2 Rezeptor
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Donor spezifische anti-HLA-Antikörper
ECL	Extrazellulärer Loop
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
ERK	Extrazellulär signalregulierte Kinase
FKS	Fetales Kälberserum
FDGlu	Fluorescein Di-β-D-glucopyranosid
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
hEGF	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor
HMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie-1
ICL	Intrazellulärer Loop
IgG	Immunglobulin G
LB	Lysogeny Broth

LiAc	Lithiumacetat
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
MVEC	Mikrovaskuläre Endothelzellen
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PLB	Passiver Lysepuffer
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
PTx	Pertussistoxin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSc	Systemische Sklerose
TE	TRIS-EDTA
TMD	Transmembranäre Domänen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	Glatte Gefäßmuskelzellen
WT	Wildtyp
YNB	Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne Aminosäuren
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glucose
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des AT ₁ R	S. 11
Abbildung 2	Die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade	S. 12
Abbildung 3	Das Oktapeptid Ang II	S. 13
Abbildung 4	Schematischer Ausschnitt des AT ₁ R mit Markierung mutierter Bereiche im ECL 1	S. 26
Abbildung 5	Relatives Wachstum von mit dem AT ₁ R WT transformierten Hefen ohne oder mit Valsartan-Präinkubation nach Stimulation mit Ang II (A) bzw. AT ₁ R ⁺ -IgG (B)	S. 27
Abbildung 6	Relative NFAT-Aktivität nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in mit dem AT ₁ R WT transfizierten HMEC-1 mit und ohne PTx-Präinkubation	S. 33
Abbildung 7	Relative NFAT-Aktivität nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in mit dem AT ₁ R WT oder dem AT ₁ R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten HMEC-1	S. 34
Abbildung 8	Hefewachstum für die AT ₁ R-Konstrukte ECL 1 92-97 Ala, ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in dem Hefe-GPCR-Aktivierungsassay	S. 35
Abbildung 9	Relative NFAT-Aktivität nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in mit dem AT ₁ R WT oder den AT ₁ R-Konstrukten ECL 1 92-94 Ala oder ECL 1 95-97 Ala transfizierten HMEC-1	S. 36
Abbildung 10	Relative NFAT-Aktivität nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in mit den AT ₁ R-Konstrukten ECL 1 92-97 Ala, ECL 1 92-94 Ala oder ECL 1 95-97 Ala transfizierten HMEC-1	S. 37
Abbildung 11	Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit EdU inkubierten, AT ₁ R WT transfizierten HMEC-1	S. 38
Abbildung 12	Relative Proliferation nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in mit dem AT ₁ R WT transfizierten HMEC-1 mit und ohne PTx-Präinkubation	S. 39
Abbildung 13	Relative Proliferation nach AT ₁ R ⁺ -IgG-Stimulation in mit dem AT ₁ R WT oder dem AT ₁ R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten HMEC-1	S. 40

Abstrakt

Der Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptor (AT₁R) ist von zentraler Bedeutung für die Homöostase einer Vielzahl kardiovaskulärer Prozesse. Er gehört zur Gruppe der Klasse A-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und wird durch den natürlichen Liganden Angiotensin II (Ang II) aktiviert. Nach seiner Stimulation werden multiple intrazelluläre Signalwege initiiert, wobei die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion vorwiegend durch G_{q/11} erfolgt. Neben Ang II wird der AT₁R auch durch Bindung funktionell agonistischer Immunglobuline G (AT₁R-IgG) an extrazelluläre Epitope aktiviert. Beschrieben wurden AT₁R-IgG im Kontext verschiedener obliterativer Pathologien wie der Systemischen Sklerose (SSc), wo sie auch von prognostischer Bedeutung sind. Nach Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dragun, die auf eine besondere Bedeutung des ersten extrazellulären Loops (ECL 1) für die immunvermittelte AT₁R-Aktivierung hindeuteten, wurde in der vorliegenden Arbeit die AT₁R-IgG vermittelte Rezeptoraktivierung durch spezifische Modifikationen des ECL 1 untersucht. Hierfür wurden drei verschiedene Assays angewandt. Verwendet wurde ein Hefe-GPCR-Aktivierungsassay, in dem die Aktivierung eines einzelnen, humanen GPCR mit dem Hefewachstum korreliert. Zudem wurde mittels eines Luciferase-Reporterassays die G-Proteinaktivität in humanen Endothelzellen untersucht. Schließlich wurde durch ein 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Proliferationsassay die EdU-Inkorporation während der DNA-Synthese humaner Endothelzellen bestimmt. In Hefe-GPCR-Aktivierungsassays war bereits gezeigt worden, dass Ang II und IgG-Isolate von PatientInnen mit SSc und hohen AT₁R-IgG-Leveln (AT₁R⁺-IgG) zu einer dosisabhängigen Aktivierung des AT₁R führen. Diese Aktivierung wurde in beiden Fällen durch den AT₁R-Inhibitor Valsartan inhibiert. Luciferase-Reporterassays bestätigten, dass AT₁R⁺-IgG eine Erhöhung der G_{q/11}-Proteinaktivität in Endothelzellen induzieren. Das G_i-Protein scheint dagegen nicht an der AT₁R⁺-IgG vermittelten Signaltransduktion beteiligt zu sein. Die immunvermittelte Zunahme der G_{q/11}-Proteinaktivität konnte durch Substitution der Aminosäuren (AS) 92-97 des ECL 1 gegen Alanin aufgehoben werden. Ein spezifischeres Epitop innerhalb einer der Hälften des ersten ECL des AT₁R konnte weder mithilfe des Hefe-GPCR-Aktivierungsassays noch des Luciferase-Reporterassays identifiziert werden. Funktionell zeigte sich in EdU-Proliferationsassays, dass die AT₁R⁺-IgG vermittelte AT₁R-Aktivierung eine signifikante Erhöhung der Proliferation von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) induziert. Die immunvermittelte Endothelzellproliferation schien durch Substitution der AS 92-97 des ECL 1 beeinflussbar. Diese Ergebnisse streichen die besondere Rolle des ersten ECL für die AT₁R-Aktivierung durch AT₁R-

IgG heraus und bieten einen interessanten Ansatzpunkt für dessen Etablierung als therapeutisches Target.

Abstract

The Angiotensin II type 1 receptor (AT₁R) is of crucial importance for the homeostasis of a variety of cardiovascular processes. It belongs to the group of class A G protein-coupled receptors (GPCR) and is activated by the natural ligand Angiotensin II (Ang II). After its stimulation, multiple intracellular signaling pathways are initiated with G-protein mediated signal transduction occurring predominantly through G_{q/11}. Besides Ang II, AT₁R is activated by binding of functional agonistic immunoglobulins G (AT₁R-IgG) to extracellular epitopes. AT₁R-IgG have been described in the context of various obliterative pathologies such as systemic sclerosis (SSc), in which they are also of prognostic importance. Following preliminary work of the group of Prof. Dragun, which pointed to a special importance of the first extracellular loop (ECL 1) for the immune mediated AT₁R activation, the present study investigated AT₁R-IgG mediated receptor activation by specific modifications of ECL 1. Three different assays were used for this purpose. A yeast GPCR activation assay was performed in which the activation of a single human GPCR correlates with yeast growth. In addition, G-protein activity in human endothelial cells was investigated via a luciferase reporter assay. Finally, a 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) proliferation assay measured EdU incorporation during DNA synthesis in human endothelial cells. In yeast GPCR activation assays it has already been shown that Ang II and IgG isolated from patients with SSc and high AT₁R-IgG levels (AT₁R⁺-IgG) lead to a dose-dependent activation of AT₁R. In both cases this activation was inhibited by the AT₁R inhibitor valsartan. As shown by the luciferase reporter assays, AT₁R⁺-IgG induced an increase in G_{q/11} protein activity in endothelial cells. In contrast, the G_i protein does not appear to be involved in AT₁R⁺-IgG mediated signal transduction. By substituting the amino acids 92-97 of ECL 1 against Alanine, the immune-mediated increase in G_{q/11} protein activity was abolished. However, neither the yeast GPCR activation assay nor the luciferase reporter assay was able to identify a more specific epitope within one of the halves of the first ECL of AT₁R. Functionally, an EdU proliferation assay showed that AT₁R⁺-IgG-mediated AT₁R activation induces a significant increase in the proliferation of human microvascular endothelial cells (HMEC-1). This immune mediated endothelial cell proliferation seems to be influenced by substitution of amino acids 92-97 of ECL 1 against alanine. These results emphasize the importance of the first ECL for AT₁R activation by AT₁R-IgG and offer an interesting starting point for its establishment as a therapeutic target.

1. Einleitung

1.1 Angiotensin-II-Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) repräsentieren mit über 800 bekannten Vertretern die größte Membranrezeptorfamilie und zeichnen sich durch sieben transmembranäre Domänen (TMD) aus (1). GPCRs werden durch spezifische Liganden in ihrer Aktivität moduliert und transduzieren über eine Vielzahl möglicher Signalwege ein sehr breites Signalspektrum (2). Aufgrund dieser Vielfältigkeit stellen sie eines der pharmakologisch wichtigsten und mit 34 % das insgesamt häufigste Ziel aller zugelassenen Medikamente dar (3). Anhand phylogenetischer Unterschiede werden GPCRs in verschiedene Klassen eingeteilt (1). Zu den Klasse A- bzw. den Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren zählen der Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptor (AT₁R) und der Angiotensin-II-Typ 2-Rezeptor (AT₂R), die eine 34-prozentige Aminosäuresequenzhomologie aufweisen (4). AT₁R und AT₂R werden beide durch ihren natürlichen Liganden, den Peptidagonisten Angiotensin II (Ang II) aktiviert. Der AT₁R nimmt in der Regulation der Gefäß-, Herz- und Nierenphysiologie eine herausgehobene Stellung ein (5).

1.1.1 Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor

Das Gen, das für den AT₁R kodiert (*AGTR1*), besteht aus fünf Exons und befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (3q21-3q25) (6). Der Rezeptor besteht aus 359 Aminosäuren (AS) mit einer Masse von 41 kDa (7). Er wird in den Nieren und Nebennieren, dem Herz, dem Gefäß- sowie dem zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert (8). Die Rezeptoraktivierung resultiert in der Initiierung multipler Signalwege durch die Interaktion mit heterotrimeren sowie kleinen G-Proteinen (4). Eine herausgehobene Bedeutung besitzt das G_{q/11}-Protein, durch das die Phospholipase C aktiviert wird (4). In der Folge werden Signalkaskaden mit Beteiligung von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat initiiert, die via Proteinkinase C bzw. einer intrazellulär erhöhten Calcium-Konzentration intrazelluläre Signale weitervermitteln (4). Zudem werden nach Rezeptoraktivierung G-Protein unabhängige Proteine wie β -Arrestin-2 rekrutiert, die unter anderem den Signalweg der extrazellulär signalregulierten Kinase (ERK) 1/2 modulieren (9). Die große Variabilität in der Signalverarbeitung erlaubt dem AT₁R pleiotrope Effekte in verschiedenen Geweben zu mediieren. So reguliert er infolge der Aktivierung durch Ang II den Blutdruck einerseits durch Vasokonstriktion und andererseits durch die Modulation des Wasser- sowie des Elektrolythaushaltes (10-12). Daneben beeinflusst der AT₁R maladaptive, kardiovaskuläre

Prozesse (13). AT₁R-Inhibitoren wie Losartan zeigen somit als effektive Antihypertensiva auch verschiedene vaso- und kardioprotektive Effekte (14).

1.1.1.1 Studien zur AT₁R-Struktur

Die Kristallstruktur des AT₁R wurde im Komplex mit verschiedenen Liganden einschließlich Ang II beschrieben (15-17). Der Rezeptor besitzt sieben transmembranäre α -Helices, 3 intrazelluläre Loops (ICL 1-3) sowie 3 extrazelluläre Loops (ECL 1-3). Die Disulfidbrücken zwischen Cystein (Cys) 18 und Cys 274 sowie zwischen Cys 101 und Cys 180 verbinden den extrazellulären N-Terminus mit ECL 3 bzw. die TMD 3 mit dem ECL 2 (18) (Abbildung 1).

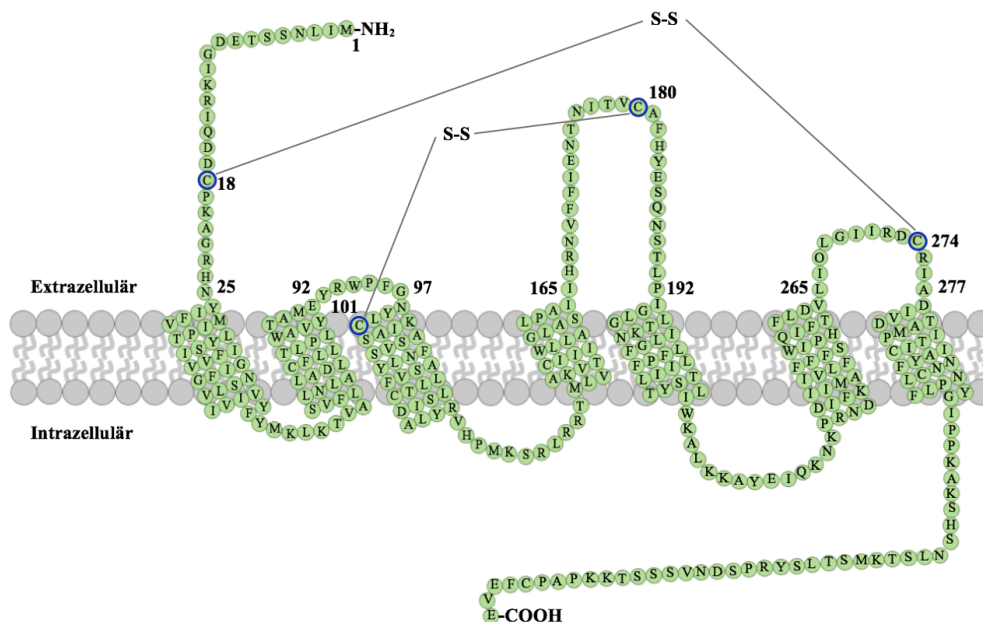


Abbildung 1. **Schematische Darstellung des AT₁R**. AS im Einbuchstaben-Code gemäß der Nomenklatur der IUPAC-IUB-Kommission (19). Nummerierung von Beginn und Ende extrazellulärer Domänen sowie Disulfidbrücken bildender Cys mit blauer Umkreisung.

Der AT₁R ist an drei Asparaginresiduen N-glykosyliert (20). Dabei ist insbesondere die Integrität des ersten der beiden Oligosaccharide im ECL 2 essentiell für die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche (20). Bei inaktiver Rezeptorkonformation bildet der ECL 2 eine β -Haarnadel und nimmt eine offene Konformation ein (21). Während Antagonisten oder inverse Agonisten inaktive Rezeptorkonformationen konsolidieren, nimmt der AT₁R infolge einer Agonistenbindung eine aktive Konformation ein (22, 23). Dabei wechselt der ECL 2 in eine geschlossene Lid-Konformation und verlangsamt so die Dissoziation von Liganden aus der Rezeptor-Bindungstasche (21).

1.1.2 Angiotensin-II-Typ 2 Rezeptor

Die physiologische Bedeutung des AT₂R wird kontrovers diskutiert (4). Tierexperimente geben jedoch Hinweise, dass er sich gegenüber dem AT₁R funktionell antagonistisch verhält (24-26). So zeigen Mäuse nach Disruption des AT₂R-Gens basal erhöhte Blutdruckwerte und eine erhöhte Sensitivität für die vasopressorische Wirkung von Ang II (24). Korrelativ führt die Verschiebung des Angiotensin-Rezeptor-Äquilibrium durch Überexpression des AT₂R zu vermehrter Vasodilatation (25). Ferner lässt sich durch intrarenal oder systemisch applizierte spezifische AT₂R-Agonisten eine verstärkte Natriurese induzieren (27). Neben der Blutdruckregulation wird durch Ang II die Angiogenese mikrovaskulärer Endothelzellen moduliert, wobei diese durch den AT₁R stimuliert und den AT₂R oppositär inhibiert wird (26).

1.2 Angiotensin II

1.2.1 Ang II-Synthese

Das Peptidhormon Ang II wird durch zweifache, enzymatische Hydrolyse gebildet (Abbildung 2) (28).

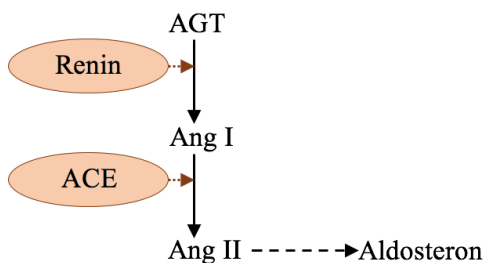


Abbildung 2. **Die Renin-Angiotensin-Aldosteron-Kaskade.** Angiotensinogen (AGT) und Angiotensin I werden durch Renin bzw. das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) hydrolytisch gespalten. Ang II induziert zudem durch die AT₁R-Aktivierung in der Zona glomerulosa die Freisetzung von Aldosteron (10).

Der Präkursor Angiotensinogen (AGT) wird primär in der Leber gebildet (4). Renin, das infolge glomerulärer Hypoperfusion oder bei erhöhtem Sympathikotonus sezerniert wird, katalysiert dessen enzymatische Hydrolyse zu Angiotensin I. Das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) wird insbesondere von Endothelzellen der Lunge exprimiert und katalysiert die enzymatische Spaltung zu Ang II. Neben endokrinen Effekten, die durch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) vermittelt werden, ist Ang II in verschiedenen unterschiedlichen Geweben an der Regulation lokaler Prozesse durch para- und autokrine Sekretion beteiligt (4).

1.2.2 Ang II-Struktur und -Rezeptorbindung

Ang II ist ein Oktapeptid (Abbildung 3) (28). Ang II und seine Analoga dringen im Rahmen der AT₁R-Bindung in die orthosterische Liganden-Bindungstasche zwischen den TMD ein und nehmen eine extendierte Konformation ein (16). Dabei interagieren die N-terminalen Peptidligand-Residuen mit Teilen der extrazellulären AT₁R-Domäne, während sich die C-terminalen Residuen am Boden der Ligandenbindungstasche befinden (16).

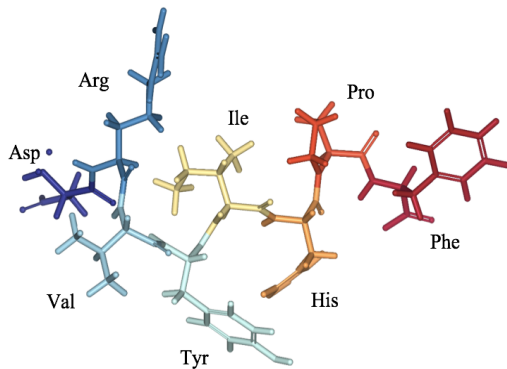


Abbildung 3. **Das Oktapeptid Ang II.** Vom N-Terminus beginnende Aminosäuresequenz Asparaginsäure (Asp), Arginin (Arg), Valin (Val), Tyrosin (Tyr), Isoleucin (Ile), Histidin (His), Prolin (Pro), Phenylalanin (Phe). Darstellung mit dem NGL-Viewer auf Datengrundlage von Spyroulias et al. (29) (Urheberrechtserlaubnis zur Darstellung in der Promotionsschrift erhalten).

Während die Ang II-Residuen 1-7 vornehmlich die Rezeptoraffinität beeinflussen, stellt das C-terminale Residuum den primären, agonistischen Schalter für den vollständigen Rezeptoragonismus dar (30). So verliert Ang II durch die Deletion von Phenylalanin seine agonistischen Eigenschaften am AT₁R, wobei Ang 1-7 zu einem nicht-kompetitiven, AT₁R-spezifischen Antagonisten wird (31).

1.2.3 Physiologische und pathophysiologische Effekte vermittelt durch Ang II

Als Effektor des RAAS reguliert Ang II in vielfältiger Weise den Blutdruck (32). Ang II wurde zuerst als Vasokonstriktor beschrieben (12). Es bewirkt die Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen und erhöht so den peripheren Widerstand (32). Zur Blutdruckkontrolle trägt Ang II daneben durch die Regulation des Volumenhaushalts bei. So kontrolliert es im proximalen Tubulus die Natriumresorption und induziert die Sekretion von Aldosteron in der Zona glomerulosa, die ebenfalls in verstärkter Natrium- und Wasserresorption in den Sammelrohren resultiert (10, 33). Schließlich bewirkt Ang II im ZNS die Sekretion von antidiuretischem Hormon (11). Das RAAS

ermöglicht so die physiologische Kreislaufaufrechterhaltung bei Hypovolämie, -natriämie oder -tension.

Pathophysiologisch ist Ang II in die Entwicklung chronisch hypertensiver Erkrankungen und ihrer Komplikationen involviert (5). So führen geringe Dosen von Ang II zu einem langsamen, aber kontinuierlichen Blutdruckanstieg (32). Es induziert kardiale Hypertrophie- und Remodeling-Prozesse, die sich unabhängig von hämodynamischen Veränderungen entwickeln (34). Dies gilt ebenfalls für die Förderung proinflammatorischer Gewebebindungen, die über entzündliche Gefäßveränderungen zur Entwicklung von Atherosklerose und einem akuten Koronarsyndrom beitragen können (13). Ang II ist außerdem an der Schädigung des glomerulären Epithels etwa im Rahmen der fokal segmentalen Sklerose beteiligt und trägt so maßgeblich zur Entstehung einer Proteinurie bei (35).

1.3 Gegen den AT₁R gerichtete Immunglobuline G

1.3.1 Gegen den AT₁R gerichtete Immunglobuline G bei obliterativen Vaskulopathien

1999 wurden erstmals bei PatientInnen mit Präeklampsie funktionell agonistische Immunglobuline gegen den AT₁R (AT₁R-IgG) beschrieben (36). PatientInnen mit Präeklampsie weisen eine hohe Prävalenz von AT₁R-IgG auf, wobei die IgG-Level mit der Ausprägung der Blutdruckentgleisung und der Proteinurie korrelieren (37). Dragun et al. beschrieben AT₁R-IgG bei PatientInnen mit therapierefraktärer, vaskulärer Nierentransplantatabstoßung und maligner Hypertonie ohne Donor spezifische anti-HLA-Antikörper (DSA) (38). Sie wiesen IgG der Subklassen 1 und 3 nach, die gegen zwei Epitope im ECL 2 des Rezeptors gerichtet sind. Zudem führte der Transfer von IgG-Isolaten aus PatientInnenplasma im Gegensatz zu Kontroll-IgG in nierentransplantierte Ratten zu entzündlichen Gefäßveränderungen mit intravaskulären, AT₁R-IgG-positiven Infiltraten und arterieller Hypertonie (38). In einer weiteren großen, prospektiven Studie konnte gezeigt werden, dass vor Transplantation erhöhte AT₁R-IgG-Level einen unabhängigen Risikofaktor für den Verlust des Transplantats darstellen (39). Die Relevanz dieser DSA-unabhängigen IgG für das Transplantat-Überleben wurde im Kontext weiterer Organe in verschiedenen Studien untermauert (40-43).

Maßgeblich für die hier beschriebenen Krankheitsbilder ist das Auftreten einer schweren, obliterativen Vaskulopathie. Diese ist ebenfalls ein wesentlicher, pathologischer Aspekt der

systemischen Sklerose (SSc) (44). Der Nachweis der Beteiligung von AT₁R-IgG an der Pathogenese der SSc wurde 2011 erbracht (45).

1.3.1.1 Gegen den AT₁R gerichtete Immunglobuline G bei der systemischen Sklerose

1.3.1.1.1 Klinische Manifestation der systemischen Sklerose

Die SSc ist eine chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung unklarer Genese (46). In Abhängigkeit von Lokalisation und Ausmaß der Hautinduration werden die limitierte und die diffuse SSc abgegrenzt (47). Die Prognose wird maßgeblich durch das Auftreten pulmonaler, kardialer oder renaler Komplikationen bestimmt (48). Die schwerwiegendste renale Manifestation stellt das akute Nierenversagen im Rahmen einer renalen Krise dar, die durch eine obliterative Vaskulopathie der Interlobar- und Bogenarterien verursacht wird (49). Trotz dem Einsatz von ACE-Hemmern ist die Mortalität dieser PatientInnen deutlich erhöht (50). Zudem werden 54 % der PatientInnen temporär dialysepflichtig, 40 % sogar dauerhaft (50).

1.3.1.1.2 Pathogenese der systemischen Sklerose

Die SSc wird charakterisiert durch eine komplexe Interaktion von Autoimmunität, Vaskulopathie sowie vaskulärer und parenchymatöser Fibrose (44). Der extensiven Fibrosierung, die insbesondere fortgeschrittene Krankheitsstadien prägt, geht eine inflammatorische Gefäßschädigung mit endothelialer Aktivierung voraus (51). Endothelzellen exprimieren vermehrt Adhäsionsmoleküle und begünstigen durch eine erhöhte Kapillarpermeabilität die Entstehung perivaskulärer Infiltrate. Mit dem Raynaud-Phänomen als frühem klinischen Korrelat ist die Vaskulopathie initial vasospastisch geprägt (44). Dies wird etwa durch die maladaptiv verschobene Homöostase zugunsten von Vasokonstriktoren gegenüber -dilatoren begünstigt (52). Im Verlauf der Krankheitsprogression tritt eine zunehmend obliterative Komponente mit progredienter Intimaproliferation, Mediahypertrophie und Adventitiafibrose auf (44). Dies wird aggraviert durch in situ-Thrombosen, eine gestörte Fibrinolyse und Ischämie-Reperfusionsschäden (53). Die obliterative Vaskulopathie von Arterien und Arteriolen mit progressiver Lumenreduktion führt zu einer progredienten Kapillarrarefizierung und einer zunehmenden Gewebehypoxie, die paradoxerweise aufgrund einer gleichzeitig defekten Revaskularisierung im „Verlust der Angiogenese“ resultiert (44).

Die grundlegende Ursache der obliterativen Vaskulopathie ist unbekannt. Die Exposition gegenüber Umwelteinflüssen wie Viren oder Medikamenten scheint jedoch bei genetisch Prädisponierten Autoimmunität zu initiieren (54).

1.3.1.1.3 Pathophysiologie der AT₁R-aktivierenden IgG bei der systemischen Sklerose

Riemekasten et al. beobachteten, dass PatientInnen mit SSc eine hohe Prävalenz von AT₁R-IgG aufweisen (45). Diese hatten höhere AT₁R-IgG-Level als standardisierte Kontrollen oder PatientInnen mit anderen rheumatischen Erkrankungen. Hohe Level dieser IgG sind mit der Entwicklung schwerer, vaskulärer Komplikationen und einer gesteigerten SSc-spezifischen Mortalität assoziiert (45, 55).

Pathophysiologisch fördern AT₁R-IgG die Ausprägung von Vaskulopathie, Autoimmunität und Fibrosierung (45, 55-57). So wurde eine AT₁R-abhängige Endothelzellaktivierung mit erhöhten Calcium-Konzentrationen durch IgG von SSc-PatientInnen gezeigt (55). Ferner induzierten diese IgG eine vermehrte Vasokonstriktion *in vitro* und führten in einem Mausmodell zur Ausbildung einer pulmonal obliterativen Vaskulopathie (55). Zudem wurde durch die Endothelzellaktivierung dieser IgG in Abhängigkeit vom AT₁R eine erhöhte IL-8-Expression sowie eine erhöhte Migration von neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten beobachtet (56, 57). Schließlich wurde die Induktion der profibrotischen Zytokine transformierender Wachstumsfaktor- β in Endothelzellen sowie CC-Chemokin Ligand 18 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes durch IgG von SSc-PatientInnen in AT₁R abhängiger Weise gezeigt (45, 57).

2. Ziele dieser Arbeit

Bei PatientInnen mit obliterativen Vaskulopathien treten häufig gegen den Angiotensin-II-Typ 1 Rezeptor (AT₁R) gerichtete Immunglobuline G (IgG) auf. Modellhaft dafür steht die Systemische Sklerose (SSc), bei der AT₁R-IgG in pathophysiologischer und prognostischer Hinsicht von besonderer Bedeutung zu sein scheinen. AT₁R-IgG induzieren die Aktivierung des AT₁R und initiieren so intrazelluläre Signalvermittlung. Die Arbeit des Labors von Prof. Dragun deutet darauf hin, dass die Integrität des ECL 1 des AT₁R essentiell für die AT₁R-IgG vermittelte Rezeptor-Aktivierung ist, nicht jedoch für die durch Ang II vermittelte AT₁R-Aktivierung.

Unter dieser Prämisse war das Ziel der vorliegenden Arbeit, die AT₁R-IgG vermittelte Rezeptoraktivierung sowie nachfolgende Signalwege gezielt durch ausgewählte Modifikationen des ECL 1 zu untersuchen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Wird nach AT₁R-IgG vermittelter Aktivierung des AT₁R eine G_{q/11}-Proteinbindung induziert?
2. Lässt sich die Bedeutung des ECL 1 für die AT₁R-IgG induzierte Rezeptoraktivierung in einem komplexen System bestätigen und ggf. eine kleinere funktionelle Einheit im Sinne eines Epitops innerhalb des ECL 1 identifizieren?
3. Können funktionelle Effekte von AT₁R-IgG auf Endothelzellen durch Modifikation des ECL 1 beeinflusst werden?

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Produkte

Chemikalien und molekularbiologische Produkte	Hersteller
2-Propanol, $\geq 99,8$ %	Carl Roth
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen
Agarose	Serva
Ampicillin	Alkom
Bacto Agar	BD
Bacto Hefeextrakt	BD
Bacto Pepton	BD
Bacto Trypton	BD
Borsäure	Thermo Fisher Scientific
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
D-Glucose	AppliChem
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth
Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat	Sigma-Aldrich
Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Leiter, 1 kb	Thermo Fisher Scientific
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (1 g/L) ohne L-Glutamin mit Natriumpyruvat	Biowest
Ethanol vergällt, ≥ 96 %	Carl Roth
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
Fetales Kälberserum (FKS)	Gibco
Fluorescein Di- β -D-glucopyranosid (FDGlu)	Thermo Fisher Scientific
Formaldehyd, 37 %	Sigma-Aldrich
Gelatine	Sigma-Aldrich
Glycin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Glycerol	Carl Roth
Hefe-Stickstoff-Basismedium ohne AS (YNB)	Sigma-Aldrich

Chemikalien und molekularbiologische Produkte	Hersteller
Humaner epidermaler Wachstumsfaktor (hEGF)	Sigma-Aldrich
Hydrocortison	Sigma Aldrich
Kaliumchlorid	Carl Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth
L-Arginin-Hydrochlorid	AppliChem
L-Asparaginsäure	AppliChem
L-Glutamin	AppliChem
L-Histidin	AppliChem
L-Lysin	AppliChem
L-Methionin	AppliChem
L-Natriumglutamat	AppliChem
L-Phenylalanin	AppliChem
L-Serin	Carl Roth
L-Threonin	AppliChem
L-Tyrosin	AppliChem
L-Valin	AppliChem
Lachssperma-DNA	Carl Roth
Lithiumacetat	AppliChem
MCDB-131	c.c. pro GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich
Passiver Lysepuffer (PLB)	Promega
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Penicillin/Streptomycin	PAA
Polyethylenglycol 3350 (PEG)	Sigma-Aldrich
TRIS-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (TE)	PAA
Xylencyanol	Sigma-Aldrich

3.1.2 Kits und Plasmide

3.1.2.1 Kits

Kits	Hersteller
iClick EdU Andy Fluor 488 Imaging kit	Thermo Fisher Scientific
HiTrap Protein G HP, 5 mL	GE Healthcare
Luciferase Assay System	Promega
Microbank	Pro-Lab Diagnostics
NucleoBond Xtra Midi EF	Clontech
Xfect Transfection Reagent	Clontech

3.1.2.2 Plasmide

Plasmide	Hersteller
p426 GPD	GlaxoSmithKline
pcDNA3	Thermo Fisher Scientific
pGL4.30	Promega

3.1.3 Bakterien, Hefen und Zellen

Bakterien	Hersteller
NEB 5- α Competent <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	New England Biolabs

Hefenzellen	Hersteller
MMY14	GlaxoSmithKline

Endothelzellen	Hersteller
Humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie-1 (HMEC-1)	freundlich bereitgestellt von Dr. H. D. Orzechowski

3.1.4 Agonisten, Antagonisten

Stimulantien, Inhibitoren	Hersteller
1,2,4-Triazol-3-amin (3-AT)	Sigma-Aldrich
Angiotensin II (Ang II)	Sigma-Aldrich
Pertussis-Toxin (PTx)	Tocris

3.1.5 Rezepte für Puffer und Medien

3.1.5.1 Rezepte für Puffer

Puffer	Chemikalien	Finale Konz.
Bindungspuffer, pH 7,0	Dinatriumhydrogenphosphat in doppelt destilliertem Wasser (ddH ₂ O) steril filtriert	20,0 mM
BU-Salz, 10X, pH 7,0	Dinatriumhydrogenphosphat Heptahydrat Natriumdihydrogenphosphat in ddH ₂ O autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	70,0 g/L 30,0 g/L
DNA-Ladepuffer, 6X	Glycerol Xylencyanol Bromphenolblau in ddH ₂ O steril filtriert	30,0 % v/v 0,25 % v/v 0,25 % m/v
Elutionspuffer, pH 2,7	Glycin-Hydrochlorid in ddH ₂ O steril filtriert	0,1 M
LiAc	Lithiumacetat in ddH ₂ O steril filtriert	1,0 M
LiAc-PEG-TE	LiAc PEG, 50 % TE, 10x in ddH ₂ O	10,0 % v/v 80,0 % v/v 10,0 % v/v
LiAc-TE	LiAc TE, 10X in ddH ₂ O	10,0 % v/v 10,0 % v/v

Puffer	Chemikalien	Finale Konz.
Neutralisationspuffer, pH 9,0	TRIS-Hydrochlorid in ddH ₂ O steril filtriert	1,0 M
PBS, pH 7,3	PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ in ddH ₂ O autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	9,55 g/L
PEG, 50 %	PEG 3350 in ddH ₂ O filtriert	0,5 g/mL
TBE, 10X, pH 8,0	TRIS Borsäure EDTA in ddH ₂ O	0,9 M 0,9 M 20 mM
TE, 10X, pH 7,5	TRIS-Hydrochlorid EDTA in ddH ₂ O steril filtriert	0,1 M 10,0 mM

3.1.5.2 Rezepte für Medien

Bakterien-Medien	Chemikalien	Finale Konz.
Lysogeny Broth (LB) -Medium	Bacto Hefeextrakt Bacto Trypton Natriumchlorid in ddH ₂ O autoklaviert bei 121 °C, 15 Min Ampicillin	5,0 g/L 10,0 g/L 10,0 g/L 100 µg/mL

Bakterien-Medien	Chemikalien	Finale Konz.
LB-Agarmedium	Bacto Agar	15,0 g/L
	Bacto Hefeextrakt	5,0 g/L
	Bacto Trypton	10,0 g/L
	Natriumchlorid	10,0 g/L
	in ddH ₂ O	
	autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	
	Ampicillin	100 µg/mL
Hefe-Medien		
FDGlu-Assaymedium, pH 7,0	Chemikalien	Finale Konz.
FDGlu-Assaymedium, pH 7,0	3-AT	2,0 mM
	BU-Salz, 10X	10,0 % v/v
	FDGlu	10,0 µM
	in WHAUL-Medium	
L-Histidin, 100X	L-Histidin	2,0 mg/mL
	in ddH ₂ O	
	steril filtriert	
WHAUL-Agarmedium, pH 7,0	Bacto Agar	20,0 g/L
	WHAUL-Puder	1,1 g/L
	in ddH ₂ O	
	autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	
	D-Glucose-Lsg., 40% (steril filtriert)	5,0 % v/v
	YNB, 10X	10,0 % v/v
WHAUL-His-Medium, pH 7,0	WHAUL-Puder	1,1 g/L
	In ddH ₂ O	
	autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	
	D-Glucose-Lsg., 40% (steril filtriert)	5,0 % v/v
	YNB, 10X	10,0 % v/v
	L-Histidin, 100X	1,0 % v/v

Hefe-Medien	Chemikalien	Finale Konz.
WHAUL-Medium, pH 7,0	WHAUL-Pulver	1,1 g/L
	in ddH ₂ O	
	autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	
	D-Glucose-Lsg., 40% (steril filtriert)	5,0 % v/v
	YNB, 10X	10,0 % v/v
WHAUL-Puder	L-Arginin-Hydrochlorid	1,2 g
	L-Asparaginsäure	6,0 g
	L-Lysin	1,8 g
	L-Methionin	1,2 g
	L-Natriumglutamat	6,0 g
	L-Phenylalanin	3,0 g
	L-Serin	22,5 g
	L-Threonin	12,0 g
	L-Tyrosin	1,8 g
	L-Valin	9,0 g
YNB, 10X	YNB	67,0 g/L
	in ddH ₂ O	
	steril filtriert	
Hefeextrakt-Pepton-Glucose (YPD)-Agarmedium	Bacto Agar	20,0 g/L
	Bacto Hefeextrakt	10,0 g/L
	Bacto Pepton	20,0 g/L
	D-Glucose	20,0 g/L
	in ddH ₂ O	
	autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	
YPD-Medium	Bacto Hefeextrakt	10,0 g/L
	Bacto Pepton	20,0 g/L
	D-Glucose	20,0 g/L
	in ddH ₂ O	
	autoklaviert bei 121 °C, 15 Min	

Zellkultur-Medien	Chemikalien	Finale Konz.
Minimalmedium	FKS	0,5 % v/v
	hEGF	10,0 ng/mL
	Hydrocortison	10,0 nM
	L-Glutamin	10,0 mM
	Penicillin	100,0 U/mL
	Streptomycin	100,0 µg/mL
	in MCDB-131	
Vollmedium	FKS	5,0 % v/v
	hEGF	10,0 ng/mL
	Hydrocortison	10,0 nM
	L-Glutamin	10,0 mM
	Penicillin	100,0 U/mL
	Streptomycin	100,0 µg/mL
	in MCDB-131	

3.1.6 Geräte

Geräte	Hersteller
Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss
Bunsenbrenner LABOGAZ 206	Carl Roth
FLUOstar Optima Microplate Reader	BMG LABTECH
Heraeus BB 6220 CU O ₂	Thermo Fisher Scientific
Incubating orbital shaker, Professional 3500	VWR
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	NanoDrop
Perfusor segura FT	Braun
SB70P pH-Tischmessgerät	VWR
UV-Transilluminator GeneFlash	SYNGENE

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung und Validierung der AT₁R-Konstrukte

Die von MitarbeiterInnen der AG Dragun durch gezielte Mutagenese hergestellten Mutanten des humanen AT₁R enthielten verschiedene Substitutionen von AS gegen Alanin (Ala) im ECL 1 (Abbildung 4). Nach deren Sequenzierung erfolgte die Klonierung in p426 GPD- für das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay bzw. pcDNA3-Plasmide für das Luciferase-Reporterassay und das 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU)-Proliferationsassay.

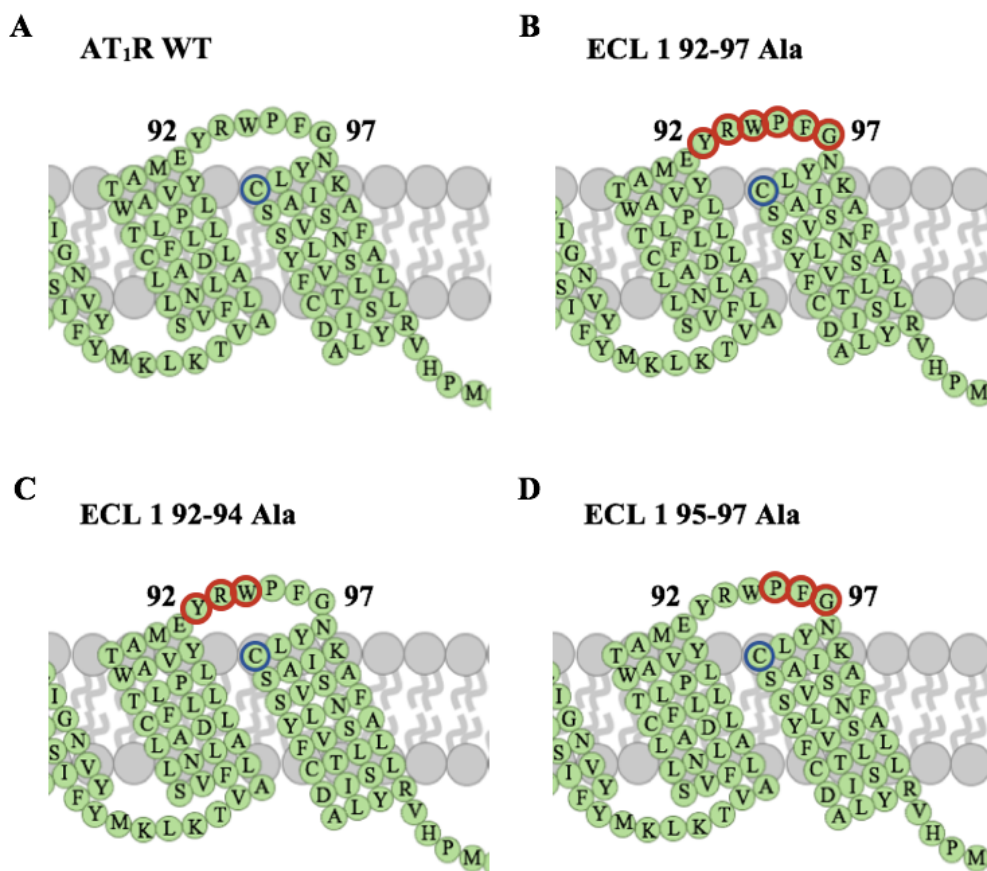


Abbildung 4. Schematischer Ausschnitt des AT₁R mit Markierung mutierter Bereiche im ECL 1. Rote Kreise markieren gegen Ala mutierte AS. (A) Intakter AT₁R ohne Mutationen. (B) Mutation der AS 92-97 gegen Ala im ECL 1 des AT₁R. (C) Mutation der AS 92-94 gegen Ala im ECL 1 des AT₁R. (D) Mutation der AS 95-97 gegen Ala im ECL 1 des AT₁R.

Durch die AG Dragun wurden unveröffentlichte Validierungsexperimente der AT₁R-Konstrukte mit einem Hefe-GPCR-Aktivierungsassays durchgeführt (Erlaubnis zur Darstellung in der Promotionsschrift durch Frau Prof. Dragun) (Abbildung 5). Der natürliche Ligand Ang II

induzierte signifikantes Wachstum von mit dem AT₁R Wildtyp (WT) transformierten Hefen in dosisabhängiger Weise (Abbildung 5A). Durch den AT₁R-Inhibitor Valsartan wurde das Hefewachstum nach Stimulation spezifisch reduziert. Dennoch induzierte Ang II in maximaler Dosis trotz Valsartan signifikantes Hefewachstum. AT₁R⁺-IgG induzierten ebenso ein signifikantes, konzentrationsabhängiges Wachstum der mit dem AT₁R WT transformierten Hefen (Abbildung 5B). Das durch AT₁R⁺-IgG vermittelte Hefewachstum wurde durch die Präinkubation mit Valsartan ebenfalls spezifisch reduziert, aber auch hier zeigte sich bei maximaler AT₁R⁺-IgG-Konzentration ein signifikantes Hefewachstum.

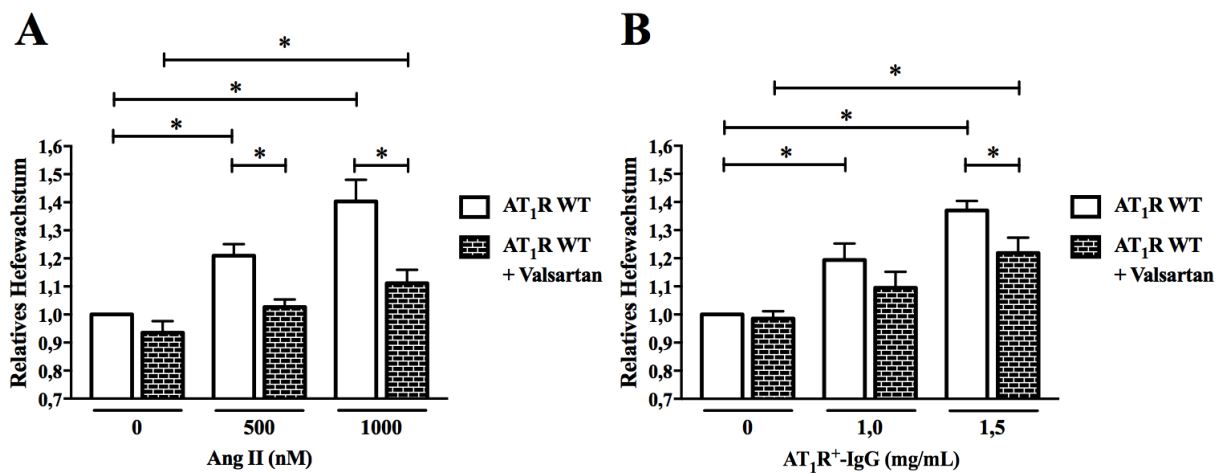


Abbildung 5. **Relatives Wachstum von mit dem AT₁R WT transformierten Hefen ohne oder mit Valsartan-Präinkubation nach Stimulation mit Ang II (A) bzw. AT₁R⁺-IgG (B).** Das Hefewachstum wird relativ zu dem Wachstum der mit dem AT₁R WT transformierten, unstimulierten Hefen dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von jeweils sieben (Ang II) bzw. sechs (AT₁R⁺-IgG) unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

3.2.2 Midi-Präparation

Um größere Mengen im Labor generierter Plasmide herzustellen, wurden Midi-Präparationen durchgeführt. Hierzu wurden transformierte NEB 5- α Competent *E. coli* auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde eine Prä-Kultur mit einer Kolonie in 3 mL LB-Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin bei 37 °C für 8 Stunden inkubiert. Im Verhältnis 1:1000 wurde die Präkultur in 100 mL LB-Medium mit 100 μ g/mL Ampicillin verdünnt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Das NucleoBond Xtra Midi EF Kit wurde gemäß dem Herstellerprotokoll für *high-copy* Plasmide angewandt. Die Plasmid-DNA wurde in

TE-Puffer eluiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer gemessen. Die Lagerung der Plasmide erfolgte bei -20 °C.

3.2.3 Stimulantien

3.2.3.1 IgG-Isolation

3.2.3.1.1 PatientInnenmaterial

An unserer Klinik wurde Plasma von drei PatientInnen mit ACE-Inhibitor refraktärer, renaler Krise im Rahmen einer SSc zwischen 2006 und 2010 gewonnen. Durch Nierenbiopsien wurden obliterative Vaskulopathien der Arteriolen gesichert. Alle PatientInnen wiesen in einer kommerziellen Sandwich ELISA (CellTrend, GmbH) AT₁R-IgG-Level größer als 17 U/mL auf (entsprechend dem Cutoff der Herstellerangaben für AT₁R-IgG-Positivität im Plasma). Das Plasma wurde bei -80 °C gelagert. Ethikantrag (EA2/068/07) sowie Einverständniserklärungen der PatientInnen zur Nutzung der Proben für die Forschung lagen vor.

3.2.3.1.2 Isolation und Dialyse

Die Isolation der IgG aus dem PatientInnenplasma erfolgte per Affinitätschromatographie über HiTrap Protein G HP Säulen. Bei diesem Verfahren enthält die stationäre Phase rekombinantes Protein G, das eine hohe Affinität zum F_C-Abschnitt der IgG-Isotypen (1-4) besitzt. Initial wurde die Säule mit 25 mL Bindungspuffer äquilibriert. Das Plasma wurde zentrifugiert, der Überstand filtriert und mit Bindungspuffer im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Beladung der Säule erfolgte mit dem Gemisch und wurde mit dem Durchfluss wiederholt. Es folgte ein Waschschrift mit Bindungspuffer. Anschließend wurde mit Elutionspuffer eluiert. Dem Eluat wurde schließlich Neutralisationspuffer zugesetzt. Das IgG-Isolat aus PatientInnenplasma (AT₁R⁺-IgG) wurde in Dialysierschläuchen für das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay gegen WHAUL-Medium oder für das Luciferase-Reporterassay und das EdU-Proliferationsassay gegen DMEM (1 g/L Glucose) über Nacht dialysiert. Die IgG-Konzentration wurde im Zentrallabor des Charité Campus Virchow Klinikums gemessen.

3.2.3.2 Eingesetzte Stimulantien

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurde AT₁R⁺-IgG in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Für das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay wurde AT₁R⁺-IgG in den

Konzentrationen 0 mg/mL, 1,0 mg/mL und 1,5 mg/mL eingesetzt. Im Rahmen des Luciferase-Reporterassays und des EdU-Proliferationsassays wurde mit 1,0 mg/mL AT₁R⁺-IgG stimuliert.

3.2.4 Hefezellmodell

Ein bewährtes Modell zur Untersuchung der GPCR-Pharmakologie ist das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay (58). Dieses kontrolliert den Pheromonsignalweg von *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), der die Vermehrung der Hefen reguliert. Durch gezielten GPCR-Austausch kann so ein funktionelles Assay in einem eukaryoten System etabliert werden. Chimäre G-Proteine erlauben dabei die Interaktion verschiedener humaner GPCR mit dem Signaltransduktionsapparat der Hefe (58).

3.2.4.1 Hefekultur und -transformation

Kultur und Transformation der Hefen wurden von Nan Zhu im Rahmen ihrer Dissertation beschrieben und werden im Folgenden nur kurz ausgeführt (59). Die Hefen wurden bei -80 °C gelagert. Initial wurden Hefen auf einer YPD-Agarmediumplatte ausgestrichen und für 2 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Präkultur mit einer Hefekolonie in YPD-Medium angesetzt und bei 180 min⁻¹ für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert. Mit 1,5 mL der Präkultur wurden 100 mL YPD-Medium beimpft und für 2 Stunden bei 30 °C inkubiert. Die Hefen wurden gemäß der Lithiumacetat-ssDNA-PEG-Methode mit 0,5 µg p426 GPD-Plasmid transformiert. Final wurden die transformierten Hefen auf WHAUL-Agarplatten ausgestrichen und für 3 Tage bei 30 °C inkubiert.

3.2.4.2 Hefe-GPCR-Aktivierungsassay

Für jedes transformierte Plasmid wurden 4 Kolonien auf einer neuen WHAUL-Agarplatte ausgestrichen und für 24 Stunden inkubiert. Die Kolonien wurden in 96-Well-Platten mit je 200 µL WHAUL-His-Medium überführt und bei 100 min⁻¹ für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde je 1 µL der gelösten Hefen in eine mit 100 µL FDGlu-Assaymedium präparierte 96-Well-Platte pipettiert. Das Assaymedium enthielt verschiedene Konzentrationen von AT₁R⁺-IgG. Die 96-Well-Platten wurden in Aluminiumfolie eingeschlagen und für 20 Stunden inkubiert. Die Fluoreszenz-Messung erfolgte in Fünffachbestimmung bei 485 nm Exzitation und 520 nm Emission mit dem FLUOstar Optima Microplate Reader.

3.2.5 Humanes Endothelzellmodell

3.2.5.1 Zellkultur- und Transfektion

Die humane mikrovaskuläre Endothelzelllinie-1 (HMEC-1) wurde auf mit 0,2 % gelatinebeschichteten Zellkulturflaschen bei 5 % CO₂ und 37 °C in Vollmedium kultiviert. Die Zellpassage erfolgte bei 90 % Konfluenz. Zunächst wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA im Brutschrank inkubiert. Den abgelösten Zellen wurde zur Enzym-Inaktivierung Vollmedium zugegeben. Anschließend wurde pelletiert und in Vollmedium resuspendiert. Die Zählung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. HMEC-1 wurden zur weiteren Kultivierung zu je 1,5 Millionen in 75 cm² Zellkulturflaschen oder für die Experimente zu je 50.000 Zellen pro Well in gelatinebeschichtete 24-Well-Platten gegeben. Die HMEC-1 wuchsen in Vollmedium bis sie 70 % Konfluenz erreichten. Die anschließende transiente Transfektion für das Luciferase-Reporterassay und das EdU-Proliferationsassay wurde in Minimalmedium mit 250 ng eines pcDNA3-Plasmids für den AT₁R WT oder für eine AT₁R-Mutante mit Xfect Transfection Reagent gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für das Luciferase-Reporterassay wurden zusätzlich 250 ng des Plasmids pGL4.30 mit einem Responseelement für den Transkriptionsfaktor Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) transfiziert. Nach 16 Stunden wurde das Medium zu Vollmedium gewechselt und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert.

3.2.5.2 Luciferase-Reporterassay

Die GPCR-Stimulation führt zur Aktivierung von G-Proteinen, die spezifische Transkriptionsfaktoren rekrutieren. Durch Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an die Promotersequenz eines Luciferase-Reportergens erlaubt das Luciferase-Reporterassay die G-Protein-Aktivitätsmessung. Gemessen wurde die Aktivität des G_{q/11}-abhängigen Transkriptionsfaktors NFAT.

Am Tag des Assays wurde erneut zu Minimalmedium mit oder ohne 5 ng/μL Pertussis-Toxin (PTx) gewechselt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit AT₁R⁺-IgG stimuliert und für sechs Stunden inkubiert. DMEM (1 g/L Glucose) wurde als Kontrolle verwendet. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1X passivem Lysepuffer (PLB) auf dem Plattformschüttler für 15 Minuten lysiert. Die Luciferase-Aktivität wurde in 20 μL des Lysats mit dem Luciferase Assay System gemäß dem Herstellerprotokoll bestimmt. Die Lumineszenz-

Messung erfolgte mit dem FLUOstar Optima Microplate Reader mit der Lumineszenz-Optik in zweifacher Bestimmung.

3.2.5.3 EdU-Proliferationsassay

Zur Untersuchung der HMEC-1-Proliferation nach AT₁R-Aktivierung wurde ein EdU-Proliferationsassay verwendet. EdU wird als Thymidin-Analogon im Rahmen der DNA-Synthese in diese inkorporiert. Das inkorporierte EdU wird durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert und kann anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden.

Am Tag der Stimulation wurde zu Minimalmedium mit oder ohne 5 ng/μL PTx gewechselt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der HMEC-1 mit AT₁R⁺-IgG oder DMEM (1 g/L Glucose) als Kontrolle für 24 Stunden. Zwei Stunden vor Stimulationsende wurde die Hälfte des Mediums durch Minimalmedium ersetzt, das 20 μM EdU-Lösung enthielt. Entsprechend dem Herstellerprotokoll erfolgte die Zell-Fixierung, -Permeabilisierung und EdU-Detektion. Anschließend wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (5 μg/mL in PBS) gegengefärbt. Nach Fluoreszenzmikroskopie entsprechend dem Herstellerprotokoll erfolgte die Zählung markierter Zellkerne mit der Software ImageJ (Version 1.48). Der Quotient aus EdU-inkorporierenden Kernen und der Gesamtzahl der Kerne, markiert durch DAPI, ermöglichte eine Quantifikation der Proliferation.

3.2.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Der Vergleich der unstimulierten Kontrolle mit den Bedingungen unter Stimulation erfolgte mit dem zweiseitigen Wilcoxon-Test, sonst wurde der zweiseitige Mann-Whitney-Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde als $p < 0,05$ definiert. Für die Berechnungen wurde die Software Graphpad Prism 7.0a (GraphPad Software, Inc., USA) eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Durch die AT₁R⁺-IgG vermittelte AT₁R-Aktivierung wird das G-Protein G_{q/11} rekrutiert

Wie gezeigt werden konnte, induzierten Angiotensin II (Ang II) und IgG-Isolate mit hohen AT₁R-IgG-Leveln (AT₁R⁺-IgG) von PatientInnen mit systemischer Sklerose (SSc) via AT₁R-Aktivierung Wachstum in Hefen des *S. cerevisiae* -Stamms MMY14 durch Rekrutierung eines chimären G_{q/11}-Proteins (Abbildung 5). Durch Valsartan wurde die AT₁R-Aktivierung jeweils spezifisch inhibiert, allerdings scheint der inhibitorische Effekt von Valsartan bei der AT₁R⁺-IgG vermittelten Rezeptoraktivierung geringer zu sein als bei der durch Ang II.

Der Fokus der Untersuchungen wurde im Folgenden auf die AT₁R⁺-IgG vermittelte Rezeptoraktivierung und konsekutive Signalwege gerichtet.

4.1.1 AT₁R⁺-IgG vermitteln die Aktivierung des AT₁R in HMEC-1 und induzieren die intrazelluläre Signaltransduktion via G_{q/11}-Protein

Das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay stellt ein einfaches und effektives, gleichzeitig jedoch auch eng reguliertes Modell dar. Zur Prüfung der Ergebnisse in einem komplexeren System, wurde die G-Protein-Aktivität nach AT₁R⁺-IgG vermittelter AT₁R-Aktivierung in der humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie-1 (HMEC-1) untersucht. Die G_{q/11}-Protein-Aktivität wurde dabei mit dem Luciferase-Reporterassay durch die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) gemessen. Allerdings wird durch die NFAT-Aktivität neben der G_{q/11}-Proteinaktivität ebenfalls die Aktivität des G_i-Proteins abgebildet (60). Daher wurde der G_{i0}-Proteininhibitor Pertussis-Toxin (PTx) zur unabhängigen Untersuchung der G-Proteinbeteiligung verwendet (61).

Mit dem AT₁R WT transfizierte HMEC-1 wurden mit oder ohne PTx präinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit AT₁R⁺-IgG. In HMEC-1 ohne PTx-Präinkubation zeigte sich eine signifikant erhöhte NFAT-Aktivität im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (Abbildung 6). Mit PTx präinkubierte HMEC-1 zeigten ebenfalls eine signifikante Erhöhung der NFAT-Aktivität nach Stimulation. Die basale NFAT-Aktivität der mit PTx präinkubierten HMEC-1 war gegenüber den HMEC-1 ohne PTx-Präinkubation signifikant erniedrigt. Dagegen zeigte sich nach Stimulation kein signifikanter Unterschied der NFAT-Aktivität der HMEC-1 mit und der ohne PTx-Präinkubation. Die Differenz zwischen basaler und stimulierter NFAT-Aktivität war seitens

der mit PTx präinkubierten HMEC-1 nur unwesentlich geringer gegenüber den HMEC-1 ohne PTx-Präinkubation.

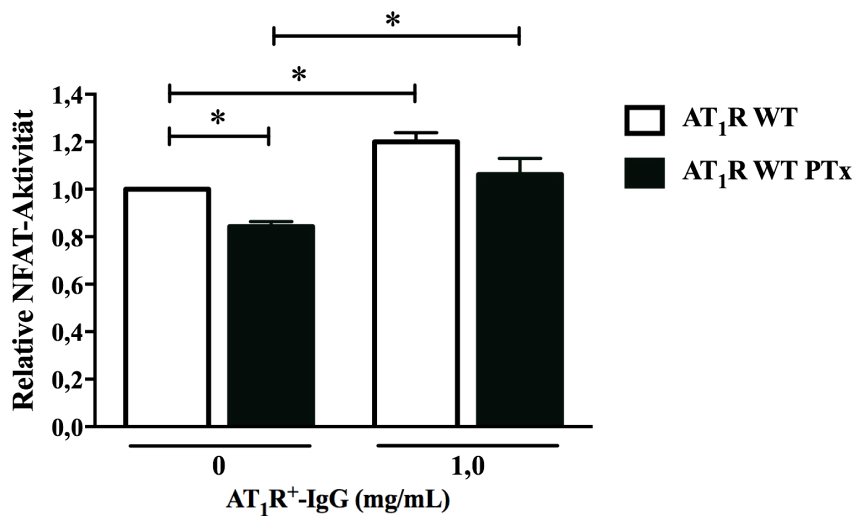


Abbildung 6. **Relative NFAT-Aktivität nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in mit dem AT₁R WT transfizierten HMEC-1 mit und ohne PTx-Präinkubation.** Die NFAT-Aktivität wird relativ zur NFAT-Aktivität der mit dem AT₁R WT transfizierten, unstimulierten HMEC-1 dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von sechs unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

In HMEC-1 wurde der AT₁R durch AT₁R⁺-IgG aktiviert mit in der Folge erhöhter NFAT-Aktivität. Wie durch den G_i-Proteininhibitor PTx gezeigt werden konnte, scheint die NFAT-Aktivität unabhängig vom G_i-Protein zu sein und somit ausschließlich durch das G_{q/11}-Protein vermittelt zu werden.

4.2 Die Integrität des ECL 1 des AT₁R ist essentiell für die AT₁R⁺-IgG vermittelte Aktivierung des AT₁R

Vorarbeiten unseres Labors ließen vermuten, dass die AT₁R-Aktivierung durch AT₁R⁺-IgG abhängig von der Integrität des ECL 1 sei (unpubliziert). Diese mit dem Hefe-GPCR-Aktivierungsassay gewonnenen Daten sollten mit dem Luciferase-Reporterassay validiert werden. Zunächst wurden HMEC-1 mit dem AT₁R WT oder dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfiziert, im Anschluss erfolgte die Stimulation mit AT₁R⁺-IgG. Der AT₁R WT zeigte nach Stimulation eine signifikant erhöhte NFAT-Aktivität verglichen mit seiner Basalaktivität (Abbildung 7). Das AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala wies nach Stimulation hingegen keine

erhöhte NFAT-Aktivität im Vergleich zu seinem Basalwert auf. Hinsichtlich ihrer Basalaktivität wiesen der AT₁R WT und das AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala keine signifikanten Unterschiede der NFAT-Aktivität auf. Dagegen zeigte sich die NFAT-Aktivität des stimulierten AT₁R WT gegenüber dem stimulierten AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala signifikant erhöht.

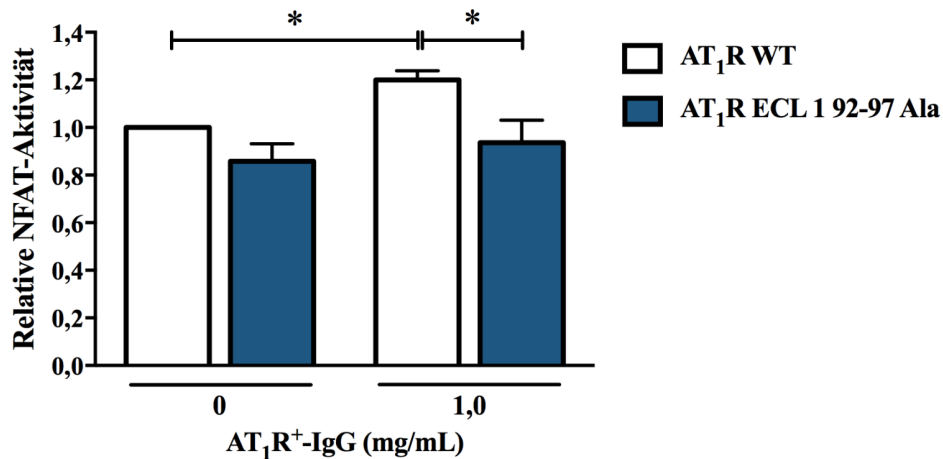


Abbildung 7. **Relative NFAT-Aktivität nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in mit dem AT₁R WT oder dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten HMEC-1.** Die NFAT-Aktivität wird relativ zur NFAT-Aktivität der mit dem AT₁R WT transfizierten, unstimulierten HMEC-1 dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von sechs unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

Die Mutation der AS 92-97 des ECL 1 des AT₁R gegen Alanin (Ala) führte zu einer deutlichen Reduktion der AT₁R-Aktivierung und der konsekutiven G_{q/11}-Protein-Bindung durch AT₁R⁺-IgG.

4.2.1 Untersuchung eines spezifischeren Epitops für AT₁R-IgG innerhalb des ECL 1 des AT₁R

Zur Identifikation eines spezifischeren Epitops innerhalb des ECL 1 des AT₁R für AT₁R⁺-IgG wurden neben dem AT₁R WT und dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala die AT₁R-Konstrukte ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala in dem Hefe-GPCR-Aktivierungsassay und dem Luciferase-Reporterassay genutzt.

Für das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay wurden Hefen des Stamms MMY14 mit den AT₁R-Konstrukten ECL 1 92-97 Ala, ECL 1 92-94 Ala oder ECL 1 95-97 Ala transformiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit AT₁R⁺-IgG. Das AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala zeigte nach Stimulation nur eine geringfügige Aktivierung, die gegenüber der basalen

Rezeptoraktivität nicht signifikant erhöht war (Abbildung 8). Die AT₁R-Konstrukte ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala wiesen ebenfalls eine eingeschränkte Aktivierbarkeit auf. Diese war im Vergleich zu ihrer jeweiligen Basalaktivität gleichermaßen nicht signifikant erhöht. Der Vergleich der AT₁R-Konstrukte ECL 1 92-97 Ala, ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala zeigte weder für die basale noch die stimulierte Rezeptoraktivität signifikante Unterschiede.

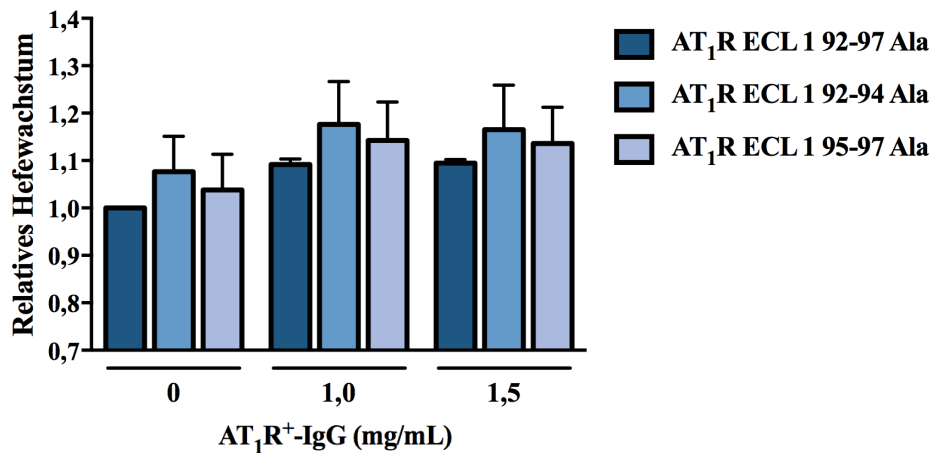


Abbildung 8. Hefewachstum für die AT₁R-Konstrukte ECL 1 92-97 Ala, ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in dem Hefe-GPCR-Aktivierungsassay. Das Hefewachstum wird relativ zu dem Wachstum der mit dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transformierten, unstimulierten Hefen dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von fünf unabhängigen Experimenten präsentiert.

Zur Ergänzung dieser Ergebnisse wurden HMEC-1 mit dem AT₁R WT oder den AT₁R-Konstrukten ECL 1 92-94 Ala oder ECL 1 95-97 Ala transfiziert und mit AT₁R⁺-IgG stimuliert. Im Vergleich zu seiner Basalaktivität zeigte der AT₁R WT eine signifikant erhöhte Rezeptoraktivität nach Stimulation (Abbildung 9). Die beiden AT₁R-Konstrukte ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala wiesen nach Stimulation keine signifikant erhöhte Aktivität im Vergleich zu ihrer jeweiligen basalen Aktivität auf. Sowohl der Vergleich der jeweiligen basalen als auch der stimulierten Rezeptoraktivitäten zeigte keine signifikanten Unterschiede.

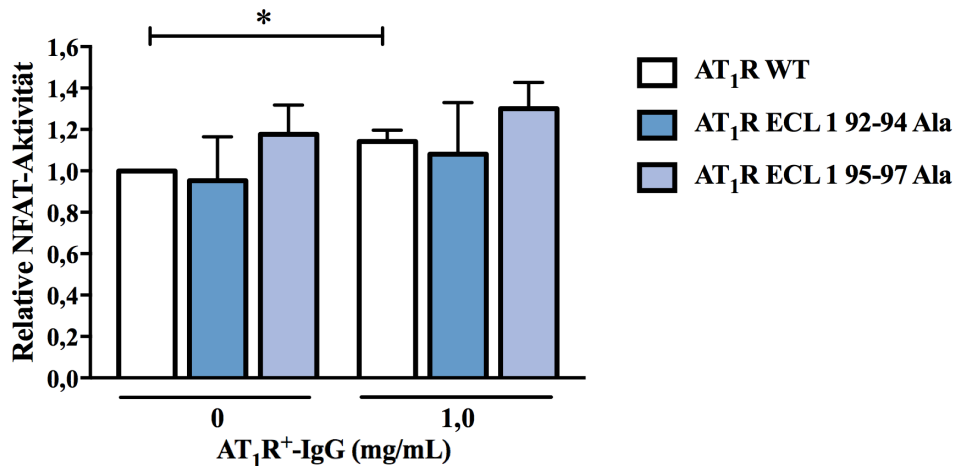


Abbildung 9. Relative NFAT-Aktivität nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in mit dem AT₁R WT oder den AT₁R-Konstrukten ECL 1 92-94 Ala oder ECL 1 95-97 Ala transfizierten HMEC-1. Die NFAT-Aktivität wird relativ zur NFAT-Aktivität der mit dem AT₁R WT transfizierten, unstimulierten HMEC-1 dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von elf (AT₁R WT) bzw. sechs (AT₁R ECL 1 92-94 Ala; AT₁R ECL 1 95-97 Ala) unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

Der Vergleich des AT₁R-Konstrukts ECL 1 92-97 Ala mit den beiden AT₁R-Konstrukten ECL 1 92-94 Ala und ECL 1 95-97 Ala zeigte im Luciferase-Reporterassay hinsichtlich der basalen Rezeptoraktivität keinen signifikanten Unterschied, wobei sich hier bereits ein Unterschied zwischen dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala und dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-94 Ala abzeichnete (P = 0,0649) (Abbildung 10). Bei Stimulation mit AT₁R⁺-IgG zeigte sich eine signifikant erhöhte Rezeptoraktivität seitens des AT₁R-Konstrukts ECL 1 95-97 Ala gegenüber dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala. Die Rezeptoraktivität des AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-94 Ala wies dagegen gegenüber keinem der anderen beiden Konstrukte einen signifikanten Unterschied auf.

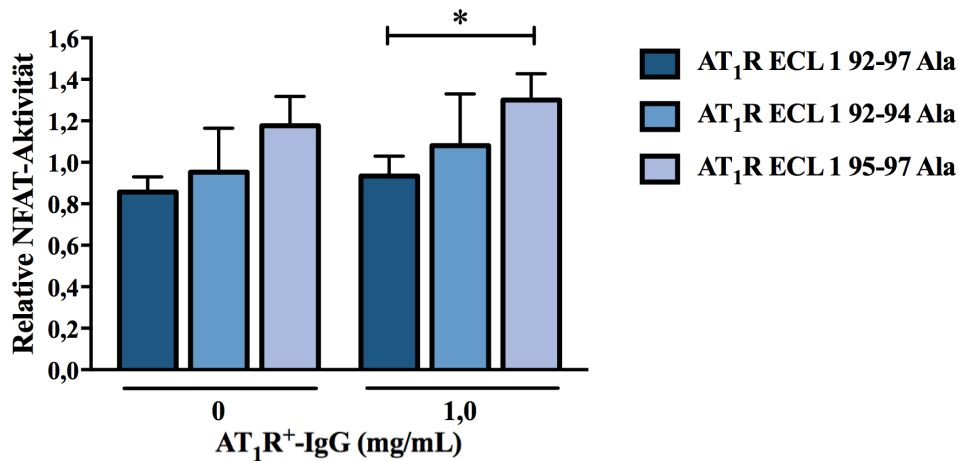


Abbildung 10. Relative NFAT-Aktivität nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in mit den AT₁R-Konstrukten ECL 1 92-97 Ala, ECL 1 92-94 Ala oder ECL 1 95-97 Ala transfizierten HMEC-1. Die NFAT-Aktivität wird relativ zur NFAT-Aktivität der mit dem AT₁R WT transfizierten, unstimulierten HMEC-1 (hier nicht abgebildet) dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von sechs unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

Während das Hefe-GPCR-Aktivierungsassay keine Unterschiede der Rezeptoraktivität der unterschiedlichen AT₁R-Konstrukte aufwies, zeichneten sich im komplexeren Luciferase-Reporterassay durchaus Unterschiede ab. In der Gesamtschau scheint nur durch das AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala die AT₁R⁺-IgG-vermittelte Rezeptoraktivierung in suffizienter Weise eingeschränkt zu werden. Dagegen konnte dies für die anderen beiden Konstrukte nicht gezeigt werden, sodass hier weitere Untersuchungen nötig sein werden, um spezifischere Epitope innerhalb des ersten ECL zu identifizieren.

4.3 AT₁R⁺-IgG induzieren Proliferation von Endothelzellen nur bei intaktem ECL 1 des AT₁R

Zur Untersuchung des funktionellen Einflusses von AT₁R⁺-IgG auf Endothelzellen wurde die Proliferation von HMEC-1 durch das 5-Ethynyl-2'-desoxyuridin (EdU) -Proliferationsassay untersucht. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte dabei durch Detektion des in die DNA proliferierender HMEC-1 eingebauten EdU (Abbildung 11).

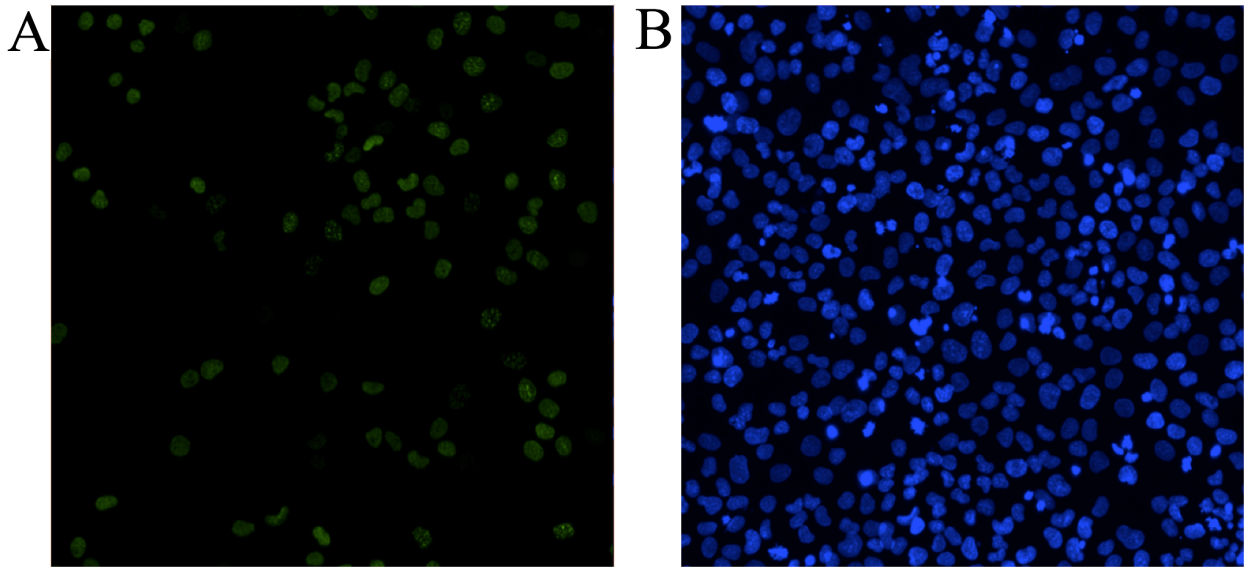


Abbildung 11. **Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von mit EdU inkubierten, AT₁R WT transfizierten HMEC-1.** (A) zeigt die mit EdU markierte DNA proliferierender Zellen, (B) Kerngefärbung mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) des gleichen mikroskopischen Ausschnitts.

HMEC-1 wurden mit dem AT₁R WT transfiziert und mit oder ohne PTx präinkubiert. Im Anschluss erfolgte die Stimulation mit AT₁R⁺-IgG. HMEC-1, die nicht mit PTx präinkubiert wurden, zeigten nach Stimulation eine signifikant erhöhte Proliferation verglichen mit der basalen Proliferation (Abbildung 12). Die mit PTx präinkubierten HMEC-1 wiesen nach Stimulation ebenfalls eine signifikant erhöhte Proliferation gegenüber der basalen Proliferation auf. Die basale Proliferation der mit PTx präinkubierten HMEC-1 zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der HMEC-1 ohne PTx-Präinkubation. Die Proliferation der stimulierten HMEC-1 mit PTx-Präinkubation zeigte sich im Vergleich zur Proliferation derer ohne PTx-Präinkubation signifikant erhöht.

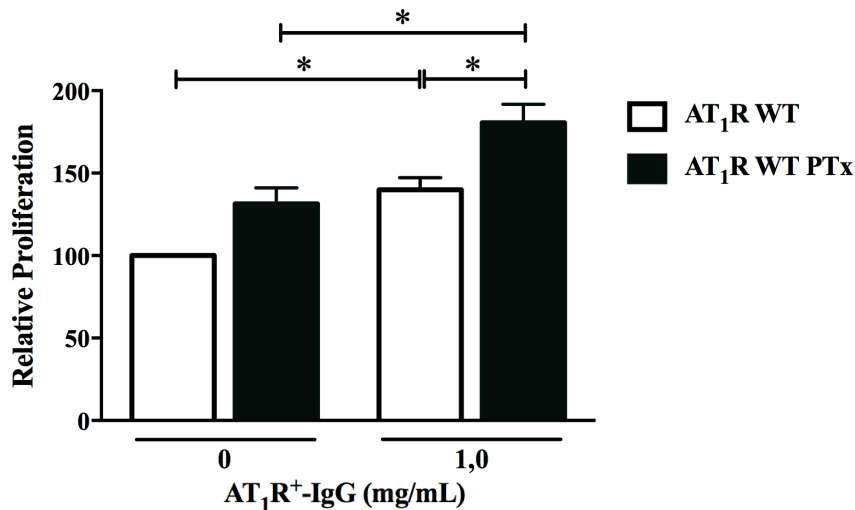


Abbildung 12. **Relative Proliferation nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in mit dem AT₁R WT transfizierten HMEC-1 mit und ohne PTx-Präinkubation.** Die Proliferation wird relativ zur Proliferation der mit dem AT₁R WT transfizierten, unstimulierten HMEC-1 ohne PTx-Präinkubation dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von sieben (AT₁R WT) bzw. fünf (AT₁R WT PTx) unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

AT₁R⁺-IgG induzierten in mit dem AT₁R WT transfizierten HMEC-1 eine deutliche Erhöhung der Proliferation. Die Endothelzellproliferation wurde durch den G_i-Inhibitor PTx nicht beeinträchtigt.

Um den Einfluss des ECL 1 auf die durch AT₁R⁺-IgG induzierte Endothelzellproliferation zu untersuchen, wurden HMEC-1 mit dem AT₁R WT oder dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfiziert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit AT₁R⁺-IgG. Im Gegensatz zu dem mit dem AT₁R WT transfizierten HMEC-1 zeigten die mit dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten HMEC-1 nach Stimulation keine signifikant erhöhte Proliferation (Abbildung 13). Die basale Proliferation der mit dem AT₁R WT und dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten HMEC-1 unterschied sich nicht signifikant. Die mit dem AT₁R WT transfizierten HMEC-1 wiesen gegenüber den mit dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten eine erhöhte Proliferation auf, der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (P = 0,095).

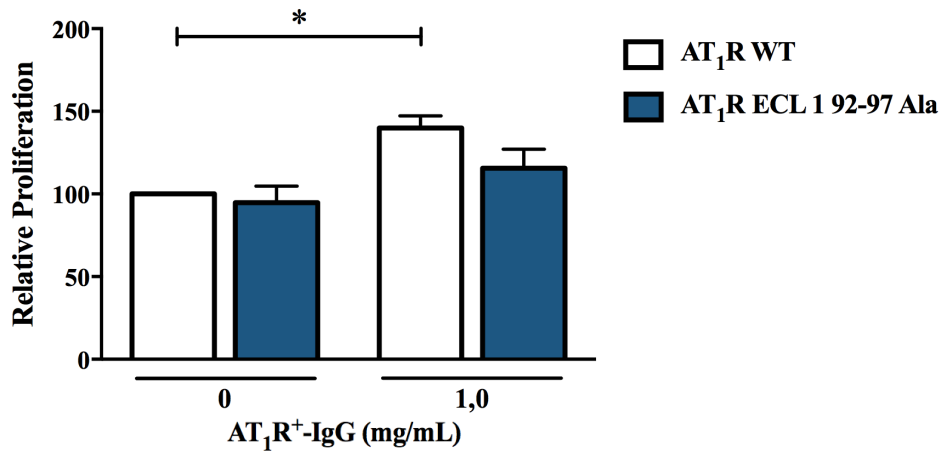


Abbildung 13. **Relative Proliferation nach AT₁R⁺-IgG-Stimulation in mit dem AT₁R WT oder dem AT₁R-Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfizierten HMEC-1.** Die Proliferation wird relativ zur Proliferation der mit dem AT₁R WT transfizierten, unstimulierten HMEC-1 dargestellt. Die Daten werden als Mittelwerte mit SEM von sieben (AT₁R WT) bzw. fünf (AT₁R ECL 1 92-97 Ala) unabhängigen Experimenten präsentiert. P-Werte < 0,05 werden als * angezeigt.

Schlussfolgernd scheint die durch AT₁R⁺-IgG induzierte Proliferation in Endothelzellen einen intakten 1. ECL zu benötigen.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung des Angiotensin-II-Typ 1-Rezeptor (AT₁R) hinsichtlich intrazellulärer Signaltransduktion sowie funktioneller Effekte und der Bedeutung seines ersten extrazellulären Loops (ECL 1) mithilfe verschiedener Zellkulturmodelle untersucht. Aus Vorarbeiten der AG Dragun war bereits bekannt, dass Angiotensin II (Ang II) und IgG von PatientInnen mit systemischer Sklerose (SSc) und hohen AT₁R-IgG-Leveln (AT₁R⁺-IgG) gleichermaßen zu einer dosisabhängigen AT₁R-Aktivierung in Hefezellen führen. Diese konnte jeweils durch den AT₁R-Inhibitor Valsartan spezifisch inhibiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Signalvermittlung weiter charakterisiert und funktionell untersucht. In Endothelzellen konnte eine durch AT₁R⁺-IgG induzierte, signifikante Erhöhung der G_{q/11}-Proteinaktivität gezeigt werden. Eine Beteiligung des G_i-Proteins an der AT₁R⁺-IgG vermittelten Signaltransduktion scheint dagegen nicht zu bestehen. Durch die Mutation der Aminosäuren (AS) 92-97 ECL 1 des AT₁R gegen Alanin (Ala) wurde die AT₁R⁺-IgG vermittelte Aktivierung des AT₁R mit ihrer konsekutiven G_{q/11}-Proteinaktivität signifikant reduziert. Die Identifikation eines spezifischeren Epitops innerhalb einer der Hälften des ersten ECL des AT₁R gelang nicht, sodass hier weitere Untersuchungen nötig sein werden. Schließlich konnte gezeigt werden, dass AT₁R⁺-IgG via AT₁R-Aktivierung eine signifikante Erhöhung der Proliferation der humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie-1 (HMEC-1) induzieren. Diese durch AT₁R⁺-IgG vermittelte Endothelzellproliferation scheint sich durch Modulation des ECL 1 beeinflussen zu lassen. Diese Ergebnisse heben die besondere Bedeutung des ersten ECL für die AT₁R-Aktivierung durch AT₁R⁺-IgG hervor und bilden den Grundstein, ihn als mögliches therapeutisches Target zu etablieren.

Modulation der AT₁R-Aktivierbarkeit durch Rezeptorstrukturveränderung

Zur Analyse der Beziehung zwischen Struktur und Aktivität des AT₁R wurden in dieser Arbeit Zellkulturmodelle mit Hefezellen und humanen Endothelzellen angewandt. Dabei konnte modellübergreifend nach Stimulation mit AT₁R⁺-IgG eine reduzierte Rezeptoraktivität durch die Mutation der AS 92-97 des ECL 1 des AT₁R gegen Ala gezeigt werden. Dies untermauerte die Hypothese, dass der erste ECL an der AT₁R-IgG vermittelten AT₁R-Aktivierung beteiligt ist.

Peeters et al. konnten unter Anwendung desselben Hefe-Modells zwei Residuen im ersten ECL des humanen Adenosin-A_{2B}-Rezeptors identifizieren, deren Mutationen zu einer maßgeblichen Beeinflussung der Rezeptorfunktion führten (62). So zeigten sich die konstitutive und Agonisten-

bedingte Rezeptoraktivität durch die Punktmutationen der AS Phenylalanin 71 und Asparaginsäure 74 in Abhängigkeit von den substituierten AS entweder deutlich erhöht oder reduziert. Interessanterweise entsprechen die beiden mutierten AS dabei dem ersten und dem letzten Residuum in einem hoch konservierten Strukturmotiv im ersten ECL von ca. 80 % der untersuchten Klasse A-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (62, 63). Dieses WPFM-Motiv wird ebenfalls im AT₁R exprimiert und ist hier im ersten ECL an AS-Position 92-95 lokalisiert (63). Klco et al. nutzten zur funktionellen Untersuchung dieses Motivs im Anaphylatoxin C5a-Rezeptor ebenfalls ein Hefe-GPCR-Aktivierungsassay (63). Auch hier führte die Mutation seines ersten Residuums sowie zu einem geringeren Grad auch die der Residuen an Position drei und vier zu einer deutlichen Einschränkung der Rezeptorfunktion. Das WPFM-Motiv bildet eine Typ II β -Schleife, die dem ersten ECL eine hohe Rigidität verleiht (64). Es wurde daher postuliert, dass das WPFM-Motiv nach erfolgter Ligandenbindung an der direkten Signalfortleitung durch Induktion von Bewegungen innerhalb der transmembranären Helices beteiligt sei (63).

Diese Arbeit liefert die ersten Erkenntnisse hinsichtlich der Modulation der AT₁R-Aktivierbarkeit durch Mutationen im ersten ECL im Kontext agonistischer Autoantikörper. Die Bedeutung des zweiten ECL wurde dagegen bereits wesentlich umfangreicher untersucht. So wurden funktionell agonistische IgG mit spezifischen Epitopen innerhalb des zweiten ECL für ein breites Spektrum verschiedener GPCR, einschließlich des AT₁R beschrieben (38, 65). In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass AT₁R-Inhibitoren wie Losartan zu einer funktionellen Maskierung der AT₁R-IgG-Epitope im ECL 2 bei Präeklampsie und akuter Transplantatabstoßung führen (36, 38, 66). Dies entspricht zudem der klinischen Erfahrung, wonach PatientInnen mit funktionell agonistischen AT₁R-IgG von AT₁R-Inhibitoren profitieren können (38). Allerdings weisen Arbeiten der AG Dragun in einem Hefemodell darauf hin, dass trotz Applikation von Valsartan bei maximaler Agonisten-Konzentration eine signifikante AT₁R-Aktivierung beobachtet werden kann (unveröffentlicht). Insofern scheint die AT₁R⁺-IgG-induzierte Rezeptoraktivierung nicht allein durch den zweiten ECL determiniert zu sein, sondern zusätzlich durch weitere Strukturen. Dabei sind der erste und der zweite ECL tertiärstrukturell eng miteinander verbunden. Einerseits inseriert der erste ECL C-terminal direkt in die dritte transmembranäre Domäne (TMD), während der zweite ECL durch seine rigide Disulfidbrücke eng an diese gekoppelt ist (15). Andererseits sind beide Teil eines Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes zwischen extrazellulärer und der transmembranärer Domäne, das im Zuge der Rezeptoraktivierung reorganisiert wird und dessen Interaktionen ligandenabhängig zunehmen (21). Im Gegensatz dazu ist der zweite ECL zwar auch am Prozess der Ang II vermittelten AT₁R-Aktivierung beteiligt, Bindungs- und

Aktivierungsmechanismus unterscheiden sich hier jedoch erheblich (16, 21). So ist der ECL 2 Teil der Peptidligandenbindungstasche und bildet bei aktiver Rezeptorkonformation ein halbes β -Fass mit den ersten drei N-terminalen Residuen seines agonistischen Peptidliganden sowie dem Rezeptor-N-Terminus (16). Dies, ebenso wie die von ihm eingenommene Lidkonformation bei aktiver Rezeptorkonformation könnte die Peptidligandenbindung stabilisieren (21). Wesentlich für die Rezeptoraktivierung durch einen Peptidliganden ist jedoch insbesondere das Residuum an Position 8, durch das am Boden der orthosterischen Bindungstasche tief in der TMD verschiedene Konformationsänderungen induziert werden, die über den Rezeptorkern in intrazelluläre Rezeptorregionen fortgeleitet werden (16).

Durch die Mutation des gesamten ECL 1 könnte das oben beschriebene Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk empfindlich beeinflusst und die strukturellen Bedingungen für eine AT_1R -IgG induzierte aktive Rezeptorkonformation kritisch destabilisiert werden, wohingegen die Ang II vermittelte Rezeptoraktivierung weiterhin möglich sein könnte.

AT_1R^+ -IgG induzierte G-Proteinaktivität

Die durch Ang II induzierte, G-Protein-vermittelte Signaltransduktion des AT_1R erfolgt vorwiegend durch $G_{q/11}$ (4). Die Signalvermittlung durch $G_{q/11}$ nach AT_1R -Aktivierung durch AT_1R^+ -IgG wurde erstmalig 2019 von Bian et al. beschrieben (67). Dabei wurde gezeigt, dass AT_1R^+ -IgG von PatientInnen mit Präeklampsie eine funktionelle Selektivität für $G_{q/11}$ besitzen und keine β -Arrestin 1/2-Rekrutierung induzieren können. Funktionell resultierte dies im Vergleich zu Ang II in einer reduzierten AT_1R -Internalisierung mit prolongierter Aktivierung von $G_{q/11}$ -abhängigen intrazellulären Signalen in glatten Gefäßmuskelzellen sowie einer prolongierten Vasokonstriktion in thorakalen Arterien von Ratten durch AT_1R^+ -IgG (67). Diese Ergebnisse sind konsistent mit der in dieser Arbeit gezeigten Aktivierung des AT_1R und der konsekutiv erhöhten $G_{q/11}$ -Protein-Aktivität in HMEC-1 durch AT_1R^+ -IgG von PatientInnen mit systemischer Sklerose und ACE-Inhibitor refraktärer, renaler Krise.

Darüber hinaus gibt es Hinweise in der Literatur für die Beteiligung des G_i -Proteins an der Ang II induzierten Signalvermittlung des AT_1R . So wurde in Glomerulosa-Zellen von Rindern die Involvierung eines $G_{i/0}$ -Proteins an der Inhibierung von L-Typ Calcium-Kanälen induziert durch Ang II via AT_1R -Aktivierung gezeigt (68). Ferner wurde in Hepatozyten von Ratten eine AT_1R -vermittelte Inhibierung der Adenylatzyklase durch das G_{i3} -Protein gezeigt (69).

Für die Beteiligung eines G_i -Proteins an der AT_1R -IgG induzierten AT_1R -Aktivität wurden in der Literatur keine Hinweise gefunden. In der vorliegenden Arbeit wurde als G_i -Inhibitor das Exotoxin

Pertussis-Toxin (PTx) verwendet, das die Aktivierung des $G_{i/o}$ -Proteins durch Katalyse der ADP-Ribosylierung hemmt (61). In den Experimenten mit HMEC-1 konnte keine direkte Signaltransduktion der AT_1R^+ -IgG über das G_i -Protein nachgewiesen werden. So zeigte sich zwar die basale Aktivität des Transkriptionsfaktors Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) der HMEC-1 nach PTx-Präinkubation signifikant reduziert im Vergleich zu den HMEC-1, die nicht mit PTx präinkubiert worden waren. Dagegen führte die Stimulation mit AT_1R^+ -IgG unabhängig von der PTx-Präinkubation zu einer signifikanten Zunahme der NFAT-Aktivität der HMEC-1. Ferner zeigte sich kein signifikanter Unterschied der NFAT-Aktivitäten der stimulierten HMEC-1 bei erfolgter oder nicht erfolgter Präinkubation mit PTx. Insofern scheint das G_i -Protein nicht an der AT_1R^+ -IgG vermittelten AT_1R -Aktivierung in HMEC-1 beteiligt zu sein.

AT_1R^+ -IgG induzierte funktionelle Effekte in Endothelzellen

Die Untersuchung des funktionellen Einflusses von AT_1R^+ -IgG auf HMEC-1 und zusätzlich der Bedeutung des ECL 1 des AT_1R bei diesen Effekten erfolgte in dieser Arbeit durch ein Proliferations-Assay. Dabei konnte gezeigt werden, dass AT_1R^+ -IgG von PatientInnen mit SSc in HMEC-1, die mit dem AT_1R WT transfiziert wurden, eine signifikante Erhöhung der Proliferation induzieren. Die Proliferation AT_1R^+ -IgG-stimulierter Endothelzellen, die mit der AT_1R -Konstrukt ECL 1 92-97 Ala transfiziert wurden, zeigte sich hingegen tendenziell reduziert, ohne dass der Effekt in den durchgeführten Experimenten das statistische Signifikanzniveau erreichte.

Wachstum und Proliferation infolge AT_1R -Aktivierung durch Ang II wurden für verschiedene kardiovaskuläre Zellen beschrieben: glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC), kardiale Myozyten und Fibroblasten sowie Mesangialzellen (4). Herr et al. beschrieben zudem die AT_1R -abhängige Proliferation von humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (70). In diesen wurde durch Ang II der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) induziert und die Proliferation durch Applikation des AT_1R -Inhibitors Candesartan oder eines VEGF-Inhibitors inhibiert. Zudem liegen Hinweise auf eine AT_1R^+ -IgG-induzierte Proliferation von mikrovaskulären Endothelzellen (MVEC) bei SSc vor (45). So wurde von Riemekasten et al. gezeigt, dass IgG von PatientInnen mit SSc in AT_1R -abhängiger Weise die mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK) extrazelluläre Signal-regulierte Kinase-1 (ERK1) und ERK2 in HMEC-1 aktivieren (45). ERK ist in essentieller Weise an der Regulation der Endothelzellproliferation durch VEGF beteiligt (71).

Eine AT_1R^+ -IgG-induzierte Endothelzell-Proliferation bei PatientInnen mit SSc erscheint zunächst kontraintuitiv, da die Perzeption der SSc durch den Verlust der Angiogenese geprägt ist (44). Spannenderweise ist das initiale Krankheitsgeschehen jedoch durch eine zunächst überschießende, aberrante Angiogenese bedingt, die erst mit zunehmendem Krankheitsprogress in

eine eklatant gehemmte Angiogenese übergeht (72). Welchen Anteil AT₁R-IgG an der initial exzessiven Angiogenese haben, wird durch weitere Arbeiten zu untersuchen sein.

In dieser Arbeit wurde außerdem der Einfluss von PTx auf die Endothelzellproliferation im Kontext der AT₁R⁺-IgG-Stimulation untersucht. Interessanterweise zeigte sich dabei eine signifikant erhöhte Proliferation AT₁R⁺-IgG-stimulierter HMEC-1 mit PTx-Präinkubation gegenüber HMEC-1 ohne PTx-Präinkubation. In der Literatur finden sich verschiedene Hinweise für eine durch PTx verstärkte Proliferation von Endothelzellen, wobei zwischen G_i-Protein-abhängigen, durch das A-Protomer vermittelten und G_i-unabhängigen, durch das B-Oligomer induzierten Effekten differenziert werden muss (61). So konnte für PTx eine G_i-Protein-unabhängige Hochregulation des AT₁R via Toll-like-Rezeptor 4 in kardialen Fibroblasten gezeigt werden, die zu einer konsekutiven Verstärkung der AT₁R-vermittelten Zellantwort führte (73). Darüber hinaus konnte eine ebenfalls G_i-Protein-unabhängige Induktion von ERK durch PTx in Endothelzellen nachgewiesen werden (74).

Zudem könnte auch durch PTx eine G_i-Protein-vermittelte Hemmung des AT₂R zu einer funktionellen Disinhibierung des AT₁R und in der Folge gesteigerten Proliferation beitragen. Zwar ist die intrazelluläre Signalvermittlung des AT₂R aktuell noch Gegenstand kontroverser Diskussionen, verschiedene Arbeiten beschreiben jedoch die Beteiligung eines G_i-Proteins (75, 76). Zhang et al. zeigten, dass der AT₂R in fetalen Ratten, die über besonders hohe AT₂R-Expressionslevel verfügen, an G_{i2} und G_{i3} gekoppelt ist (75). Darüber hinaus zeigten Hayashida et al. die AT₂R induzierte, G_i-Protein vermittelte Induktion einer Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) mit konsekutiver Inhibition von MAPK-Aktivität und Zellwachstum (76). So wurden VSMC mit einem synthetischen AS-Peptid entsprechend der Sequenz des dritten ICL des AT₂R transfiziert. Nach Stimulation mit Kälberserum zeigten sie u.a. eine deutliche Reduktion der 3H-Thymidin-Aufnahme und der MAPK-Aktivität, was durch PTx oder den PTP-Inhibitor Natriumorthovanadat verhindert wurde (76). Anders als VSMC exprimieren Endothelzellen neben dem AT₁R auch den AT₂R endogen, wobei in MVEC spontan hypertensiver Ratten ein AT₁R-AT₂R-Verhältnis von ca. 80 % zu 20 % gezeigt wurde (77). Stoll et al. untersuchten die Proliferation von MVEC nach Stimulation mit Ang II, wobei sich die 3H-Thymidin-Aufnahme bei zusätzlicher Applikation des AT₁R-Inhibitors Losartan oder des AT₂R-Inhibitors PD 123177 jeweils signifikant reduziert bzw. erhöht zeigte (77). Zwar wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des AT₂R in den für das Proliferationsassay genutzten HMEC-1 nicht quantifiziert, jedoch könnte der AT₂R auch hier in G_i-Protein-abhängiger Weise zur beobachteten Proliferationssteigerung durch PTx mitbeigetragen haben.

Limitationen und Perspektiven

Eine Limitation dieser Arbeit stellt die Spezifität der AT₁R-IgG dar. Es wurden IgG-Isolate aus PatientInnenplasmen verwendet, die hohe AT₁R-IgG-Level hatten. Allerdings lagen diese durch das Verfahren der Isolierung der IgG-Fraktion mittels einer hochspezifischen Säule für die Verwendung in den Experimenten nicht rein, sondern in einem Gemisch mit anderen IgG vor. Eine mögliche Alternative bestünde daher in der spezifischen AT₁R-IgG-Isolation aus PatientInnenplasma, wofür es jedoch wesentlich größerer Plasmamengen bedurft hätte. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von kommerziell erwerblichen AT₁R-Antikörper dar. Es wurde jedoch gezeigt, dass diese AT₁R-Antikörper unspezifische Bindungseigenschaften aufweisen und somit keine adäquate Alternative darstellen (78). Um dennoch die Spezifität der AT₁R-Aktivierung durch die verwendeten AT₁R⁺-IgG zu zeigen, wurden in dieser Arbeit die in unserem Labor durchgeführten Validierungsexperimente des Hefe-GPCR-Aktivierungsassay mit Valsartan angeführt. Zudem wurden fokussiert Phänomene untersucht, die bekanntermaßen durch den AT₁R via Ang II vermittelt werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit stellen fehlende Membranexpressionsmessungen des AT₁R WT und der verschiedenen AT₁R-Konstrukte in den unterschiedlichen Modellorganismen dar. Daher ist nicht sicher auszuschließen, dass die gezeigten Unterschiede zwischen dem AT₁R WT und den AT₁R-Mutanten durch eine differenzielle Expression der Rezeptoren in den HMEC-1 bedingt sind. Zwar lassen sich diese Ergebnisse nicht ohne Weiteres auf den AT₁R übertragen, in den von Peeters et al. und Klco et al. untersuchten Rezeptoren mit Mutationen innerhalb des ersten ECL konnte jedoch eine differenzielle Expression der verschiedenen Rezeptorkonstrukte ausgeschlossen werden (62, 63).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die spezifische Aktivierung des AT₁R und seiner konsekutiven intrazellulären Signaltransduktion sowie funktioneller Effekte durch AT₁R-IgG in Abhängigkeit von der Integrität des ersten ECL. Künftige Untersuchungen der Rezeptor-Membranexpression werden unerlässlich sein, die hier dargelegten Ergebnisse stellen jedoch einen ersten Schritt zur Untersuchung der AT₁R-Aktivierung durch AT₁R-IgG im Kontext struktureller Modulation des ersten ECL dar und zeigen zugleich die mögliche Nutzung als therapeutisches Target auf.

Referenzen

1. Fredriksson R, Lagerstrom MC, Lundin LG, Schioth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology*. 2003;63(6):1256-72.
2. Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nature reviews Drug discovery*. 2008;7(4):339-57.
3. Hauser AS, Attwood MM, Rask-Andersen M, Schioth HB, Gloriam DE. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature reviews Drug discovery*. 2017;16(12):829-42.
4. Karnik SS, Unal H, Kemp JR, Tirupula KC, Eguchi S, Vanderheyden PML, Thomas WG. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIX. Angiotensin Receptors: Interpreters of Pathophysiological Angiotensinergic Stimuli. *Pharmacological Reviews*. 2015;67(4):754-819.
5. Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *The New England journal of medicine*. 1996;334(25):1649-54.
6. Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;200(1):313-9.
7. Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature*. 1991;351(6323):233-6.
8. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 1999;10 Suppl 11:S23-9.
9. Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(19):10782-7.
10. Laragh JH, Angers M, Kelly WG, Lieberman S. Hypotensive agents and pressor substances. The effect of epinephrine, norepinephrine, angiotensin II, and others on the secretory rate of aldosterone in man. *Jama*. 1960;174:234-40.
11. Mouw D, Bonjour JP, Malvin RL, Vander A. Central action of angiotensin in stimulating ADH release. *The American journal of physiology*. 1971;220(1):239-42.

12. Page IH, Helmer OM. A CRYSTALLINE PRESSOR SUBSTANCE (ANGIOTONIN) RESULTING FROM THE REACTION BETWEEN RENIN AND RENIN-ACTIVATOR. *The Journal of experimental medicine*. 1940;71(1):29-42.
13. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. 2000;101(12):1372-8.
14. Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S. Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *The New England journal of medicine*. 2001;345(12):861-9.
15. Zhang H, Unal H, Gati C, Han GW, Liu W, Zatsopin NA, James D, Wang D, Nelson G, Weierstall U, Sawaya MR, Xu Q, Messerschmidt M, Williams GJ, Boutet S, Yefanov OM, White TA, Wang C, Ishchenko A, Tirupula KC, Desnoyer R, Coe J, Conrad CE, Fromme P, Stevens RC, Katritch V, Karnik SS, Cherezov V. Structure of the Angiotensin receptor revealed by serial femtosecond crystallography. *Cell*. 2015;161(4):833-44.
16. Wingler LM, McMahon C, Staus DP, Lefkowitz RJ, Kruse AC. Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody. *Cell*. 2019;176(3):479-90.e12.
17. Wingler LM, Skiba MA, McMahon C, Staus DP, Kleinhenz ALW, Suomivuori CM, Latorraca NR, Dror RO, Lefkowitz RJ, Kruse AC. Angiotensin and biased analogs induce structurally distinct active conformations within a GPCR. *Science (New York, NY)*. 2020;367(6480):888-92.
18. Ohyama K, Yamano Y, Sano T, Nakagomi Y, Hamakubo T, Morishima I, Inagami T. Disulfide bridges in extracellular domains of angiotensin II receptor type IA. *Regulatory peptides*. 1995;57(2):141-7.
19. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides. Recommendations 1983. *European journal of biochemistry*. 1984;138(1):9-37.
20. Lanctot PM, Leclerc PC, Escher E, Leduc R, Guillemette G. Role of N-glycosylation in the expression and functional properties of human AT1 receptor. *Biochemistry*. 1999;38(27):8621-7.

21. Unal H, Jagannathan R, Bhat MB, Karnik SS. Ligand-specific conformation of extracellular loop-2 in the angiotensin II type 1 receptor. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(21):16341-50.
22. Miura S, Kiya Y, Hanzawa H, Nakao N, Fujino M, Imaizumi S, Matsuo Y, Yanagisawa H, Koike H, Komuro I, Karnik SS, Saku K. Small molecules with similar structures exhibit agonist, neutral antagonist or inverse agonist activity toward angiotensin II type 1 receptor. *PloS one*. 2012;7(6):e37974.
23. Wingler LM, Elgeti M, Hilger D, Latorraca NR, Lerch MT, Staus DP, Dror RO, Kobilka BK, Hubbell WL, Lefkowitz RJ. Angiotensin Analogs with Divergent Bias Stabilize Distinct Receptor Conformations. *Cell*. 2019;176(3):468-78.e11.
24. Ichiki T, Labosky PA, Shiota C, Okuyama S, Imagawa Y, Fogo A, Niimura F, Ichikawa I, Hogan BL, Inagami T. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. *Nature*. 1995;377(6551):748-50.
25. Tsutsumi Y, Matsubara H, Masaki H, Kurihara H, Murasawa S, Takai S, Miyazaki M, Nozawa Y, Ozono R, Nakagawa K, Miwa T, Kawada N, Mori Y, Shibasaki Y, Tanaka Y, Fujiyama S, Koyama Y, Fujiyama A, Takahashi H, Iwasaka T. Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(7):925-35.
26. Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 1996;27(3 Pt 2):760-5.
27. Kemp BA, Howell NL, Gildea JJ, Keller SR, Padia SH, Carey RM. AT(2) receptor activation induces natriuresis and lowers blood pressure. *Circulation research*. 2014;115(3):388-99.
28. Skeggs LT, Jr., Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin. II. *The Journal of experimental medicine*. 1956;104(2):193-7.
29. Spyroulias GA, Nikolakopoulou P, Tzakos A, Gerothanassis IP, Magafa V, Manessi-Zoupa E, Cordopatis P. Comparison of the solution structures of angiotensin I & II. Implication for structure-function relationship. *European journal of biochemistry*. 2003;270(10):2163-73.
30. Balakumar P, Jagadeesh G. Structural determinants for binding, activation, and functional selectivity of the angiotensin AT1 receptor. *Journal of molecular endocrinology*. 2014;53(2):R71-92.
31. Mahon JM, Carr RD, Nicol AK, Henderson IW. Angiotensin(1-7) is an antagonist at the type 1 angiotensin II receptor. *Journal of hypertension*. 1994;12(12):1377-81.

32. Peach MJ. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiological reviews*. 1977;57(2):313-70.
33. Liu FY, Cogan MG. Angiotensin II: a potent regulator of acidification in the rat early proximal convoluted tubule. *The Journal of clinical investigation*. 1987;80(1):272-5.
34. Paradis P, Dali-Youcef N, Paradis FW, Thibault G, Nemer M. Overexpression of angiotensin II type I receptor in cardiomyocytes induces cardiac hypertrophy and remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(2):931-6.
35. Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JG, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJ, de Boer RA, Moller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JF, Berden JH, Reiser J, Faul C, van der Vlag J. Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *The American journal of pathology*. 2011;179(4):1719-32.
36. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, Lindschau C, Horstkamp B, Jupner A, Baur E, Nissen E, Vetter K, Neichel D, Dudenhausen JW, Haller H, Luft FC. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103(7):945-52.
37. Siddiqui AH, Irani RA, Blackwell SC, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibody is highly prevalent in preeclampsia: correlation with disease severity. *Hypertension (Dallas, Tex : 1979)*. 2010;55(2):386-93.
38. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, Fritsche L, Nieminen-Kelha M, Dechend R, Kintscher U, Rudolph B, Hoebeke J, Eckert D, Mazak I, Plehm R, Schonemann C, Unger T, Budde K, Neumayer HH, Luft FC, Wallukat G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *The New England journal of medicine*. 2005;352(6):558-69.
39. Giral M, Foucher Y, Dufay A, Van Huyen JP, Renaudin K, Moreau A, Philippe A, Hegner B, Dechend R, Heidecke H, Brouard S, Cesbron A, Castagnet S, Devys A, Soulillou JP, Dragun D. Pretransplant sensitization against angiotensin II type 1 receptor is a risk factor for acute rejection and graft loss. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(10):2567-76.
40. Dragun D, Catar R, Philippe A. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney international*. 2016;90(2):280-8.
41. O'Leary JG, Demetris AJ, Philippe A, Freeman R, Cai J, Heidecke H, Smith C, Hart B, Jennings LW, Catar R, Everly M, Klintmalm GB, Dragun D. Non-HLA Antibodies Impact on C4d

Staining, Stellate Cell Activation and Fibrosis in Liver Allografts. *Transplantation*. 2017;101(10):2399-409.

42. Hiemann NE, Meyer R, Wellnhofer E, Schoenemann C, Heidecke H, Lachmann N, Hetzer R, Dragun D. Non-HLA antibodies targeting vascular receptors enhance alloimmune response and microvasculopathy after heart transplantation. *Transplantation*. 2012;94(9):919-24.

43. Gerlach UA, Lachmann N, Ranucci G, Sawitzki B, Schoenemann C, Pratschke J, Dragun D, Pascher A. Non-HLA Antibodies May Accelerate Immune Responses After Intestinal and Multivisceral Transplantation. *Transplantation*. 2017;101(1):141-9.

44. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(3):557-67.

45. Riemekasten G, Philippe A, Nather M, Slowinski T, Muller DN, Heidecke H, Matucci-Cerinic M, Czirjak L, Lukitsch I, Becker M, Kill A, van Laar JM, Catar R, Luft FC, Burmester GR, Hegner B, Dragun D. Involvement of functional autoantibodies against vascular receptors in systemic sclerosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2011;70(3):530-6.

46. Abraham DJ, Krieg T, Distler J, Distler O. Overview of pathogenesis of systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2009;48 Suppl 3:iii3-7.

47. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, Jr., Rowell N, Wollheim F. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *The Journal of rheumatology*. 1988;15(2):202-5.

48. Ferri C, Valentini G, Cozzi F, Sebastiani M, Michelassi C, La Montagna G, Bullo A, Cazzato M, Tirri E, Storino F, Giuggioli D, Cuomo G, Rosada M, Bombardieri S, Todesco S, Tirri G. Systemic sclerosis: demographic, clinical, and serologic features and survival in 1,012 Italian patients. *Medicine*. 2002;81(2):139-53.

49. Mouthon L, Berezne A, Bussone G, Noel LH, Villiger PM, Guillevin L. Scleroderma renal crisis: a rare but severe complication of systemic sclerosis. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011;40(2):84-91.

50. Guillevin L, Berezne A, Seror R, Teixeira L, Pourrat J, Mahr A, Hachulla E, Agard C, Cabane J, Vanhille P, Harle JR, Deleveaux I, Mouthon L. Scleroderma renal crisis: a retrospective multicentre study on 91 patients and 427 controls. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2012;51(3):460-7.

51. Campbell PM, LeRoy EC. Pathogenesis of systemic sclerosis: a vascular hypothesis. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1975;4(4):351-68.

52. Yamane K, Miyauchi T, Suzuki N, Yuhara T, Akama T, Suzuki H, Kashiwagi H. Significance of plasma endothelin-1 levels in patients with systemic sclerosis. *The Journal of rheumatology*. 1992;19(10):1566-71.
53. Prescott RJ, Freemont AJ, Jones CJ, Hoyland J, Fielding P. Sequential dermal microvascular and perivascular changes in the development of scleroderma. *The Journal of pathology*. 1992;166(3):255-63.
54. Gladman DD, Kung TN, Siannis F, Pellett F, Farewell VT, Lee P. HLA markers for susceptibility and expression in scleroderma. *The Journal of rheumatology*. 2005;32(8):1481-7.
55. Becker MO, Kill A, Kutsche M, Guenther J, Rose A, Tabeling C, Witzernath M, Kuhl AA, Heidecke H, Ghofrani HA, Tiede H, Schermuly RT, Nickel N, Hoepfer MM, Lukitsch I, Gollasch M, Kuebler WM, Bock S, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Vascular receptor autoantibodies in pulmonary arterial hypertension associated with systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;190(7):808-17.
56. Kill A, Tabeling C, Undeutsch R, Kuhl AA, Gunther J, Radic M, Becker MO, Heidecke H, Worm M, Witzernath M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):R29.
57. Gunther J, Kill A, Becker MO, Heidecke H, Rademacher J, Siegert E, Radic M, Burmester GR, Dragun D, Riemekasten G. Angiotensin receptor type 1 and endothelin receptor type A on immune cells mediate migration and the expression of IL-8 and CCL18 when stimulated by autoantibodies from systemic sclerosis patients. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R65.
58. Brown AJ, Dyos SL, Whiteway MS, White JH, Watson MA, Marzioch M, Clare JJ, Cousens DJ, Paddon C, Plumpton C, Romanos MA, Dowell SJ. Functional coupling of mammalian receptors to the yeast mating pathway using novel yeast/mammalian G protein alpha-subunit chimeras. *Yeast (Chichester, England)*. 2000;16(1):11-22.
59. Zhu N. Development of a molecular toolbox to study the cross-talk between Angiotensin II type 1 and Endothelin-1 type A receptors in the context of obliterative vasculopathy [Dissertation]: Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin; 2015.
60. Rosenkilde MM, McLean KA, Holst PJ, Schwartz TW. The CXC chemokine receptor encoded by herpesvirus saimiri, ECRF3, shows ligand-regulated signaling through Gi, Gq, and G12/13 proteins but constitutive signaling only through Gi and G12/13 proteins. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(31):32524-33.
61. Mangmool S, Kurose H. G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX). *Toxins*. 2011;3(7):884-99.

62. Peeters MC, van Westen GJ, Guo D, Wisse LE, Muller CE, Beukers MW, Ijzerman AP. GPCR structure and activation: an essential role for the first extracellular loop in activating the adenosine A_{2B} receptor. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011;25(2):632-43.
63. Klco JM, Nikiforovich GV, Baranski TJ. Genetic analysis of the first and third extracellular loops of the C5a receptor reveals an essential WXFG motif in the first loop. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(17):12010-9.
64. Nicastro G, Peri F, Franzoni L, de Chiara C, Sartor G, Spisni A. Conformational features of a synthetic model of the first extracellular loop of the angiotensin II AT_{1A} receptor. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2003;9(4):229-43.
65. Unal H, Karnik SS. Domain coupling in GPCRs: the engine for induced conformational changes. *Trends in pharmacological sciences*. 2012;33(2):79-88.
66. Zhou CC, Zhang Y, Irani RA, Zhang H, Mi T, Popek EJ, Hicks MJ, Ramin SM, Kellems RE, Xia Y. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nature medicine*. 2008;14(8):855-62.
67. Bian J, Lei J, Yin X, Wang P, Wu Y, Yang X, Wang L, Zhang S, Liu H, Fu MLX. Limited AT₁ Receptor Internalization Is a Novel Mechanism Underlying Sustained Vasoconstriction Induced by AT₁ Receptor Autoantibody From Preeclampsia. *Journal of the American Heart Association*. 2019;8(6):e011179.
68. Maturana AD, Casal AJ, Demarex N, Vallotton MB, Capponi AM, Rossier MF. Angiotensin II negatively modulates L-type calcium channels through a pertussis toxin-sensitive G protein in adrenal glomerulosa cells. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(28):19943-8.
69. Pobiner BF, Northup JK, Bauer PH, Fraser ED, Garrison JC. Inhibitory GTP-binding regulatory protein Gi₃ can couple angiotensin II receptors to inhibition of adenylyl cyclase in hepatocytes. *Molecular pharmacology*. 1991;40(2):156-67.
70. Herr D, Rodewald M, Fraser HM, Hack G, Konrad R, Kreienberg R, Wulff C. Regulation of endothelial proliferation by the renin-angiotensin system in human umbilical vein endothelial cells. *Reproduction (Cambridge, England)*. 2008;136(1):125-30.
71. Pedram A, Razandi M, Levin ER. Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273(41):26722-8.

72. Matucci-Cerinic M, Manetti M, Bruni C, Chora I, Bellando-Randone S, Lepri G, De Paulis A, Guiducci S. The "myth" of loss of angiogenesis in systemic sclerosis: a pivotal early pathogenetic process or just a late unavoidable event? *Arthritis Res Ther.* 2017;19(1):162.
73. Nishida M, Suda R, Nagamatsu Y, Tanabe S, Onohara N, Nakaya M, Kanaho Y, Shibata T, Uchida K, Sumimoto H, Sato Y, Kurose H. Pertussis toxin up-regulates angiotensin type 1 receptors through Toll-like receptor 4-mediated Rac activation. *The Journal of biological chemistry.* 2010;285(20):15268-77.
74. Garcia JG, Wang P, Liu F, Hershenson MB, Borbiev T, Verin AD. Pertussis toxin directly activates endothelial cell p42/p44 MAP kinases via a novel signaling pathway. *American journal of physiology Cell physiology.* 2001;280(5):C1233-41.
75. Zhang J, Pratt RE. The AT2 receptor selectively associates with G α 2 and G α 3 in the rat fetus. *The Journal of biological chemistry.* 1996;271(25):15026-33.
76. Hayashida W, Horiuchi M, Dzau VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *The Journal of biological chemistry.* 1996;271(36):21985-92.
77. Stoll M, Steckelings UM, Paul M, Bottari SP, Metzger R, Unger T. The angiotensin AT2-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *The Journal of clinical investigation.* 1995;95(2):651-7.
78. Benicky J, Hafko R, Sanchez-Lemus E, Aguilera G, Saavedra JM. Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific. *Cellular and molecular neurobiology.* 2012;32(8):1353-65.

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Jason Jannis Gruner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Strukturelle und funktionelle Analyse des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptors“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Curriculum vitae

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

Danksagung

Ich danke:

Duska Dragun, die mich seit unserer ersten gemeinsamen Begegnung an der Klinik für Nephrologie nachhaltig beeindruckt hat, für das in mich gesetzte Vertrauen mit der Vergabe des Themas und das wissenschaftliche wie medizinische Vorbild

Aurélie Philippe für Begeisterung, Motivation und immerwährenden Optimismus bei der Betreuung dieser Arbeit

Angelika Kusch und Rusan Catar für Einarbeitung, Begleitung und abschließende Korrekturen

Elisabeth Seidel, Johann Borrmann, Moritz Haase, Henrik Schmidt, Philip Specht und Jan-Carlo Janssen für die gemeinsam verbrachte Zeit

Meinen Eltern Anne-Christin Minetzke-Gruner und Volker Gruner sowie meinem Bruder Christopher Luis Gruner für all das, was ihr mir mitgegeben habt

Anna-Sophia Siedschlag für Kraft, Geduld und mein Zuhause