

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

DISSERTATION

Die Wirkung von Antikörpern gegen den Protease-aktivierten
Rezeptor-1 auf molekulare Pathomechanismen
bei der Abstoßung von Transplantatnieren

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michèle Simon

aus Greiz

Datum der Promotion: 4. März 2022

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	XI
ABSTRACT	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 AUTOANTIKÖRPER	1
1.2 DIE NIERENTRANSPANTATION	2
1.2.1 Überblick	2
1.2.2 Die Rejektion einer Transplantatniere	3
1.2.3 Humorale Mechanismen der Transplantatnierenrejektion im zeitlichen Verlauf	4
1.3 DIE SERINPROTEASE THROMBIN	8
1.3.1 Thrombin und die intravaskuläre Koagulation	8
1.3.2 Thrombin und die Inflammation.....	9
1.4 DER PROTEASE-AKTIVIERTE REZEPTOR-1	9
1.4.1 Die Signaltransduktion des PAR-1	10
1.4.2 Die Bedeutung von PAR-1-Antikörpern	11
1.5 INTERLEUKIN-6	11
1.5.1 Interleukin-6 und das Gerinnungssystem.....	12
1.5.2 Interleukin-6 in der Niere	12
1.6 FRAGESTELLUNG	13
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIAL	15
2.1.1 Zelllinie	15
2.1.2 Chemikalien	15
2.1.3 Reagenzien	16
2.1.4 Lösungen	16
2.1.5 Stimulantien	17
2.1.6 Antikörper	17
2.1.7 Gel-Zusammensetzung	18
2.1.8 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.9 Geräte	19
2.1.10 Software	21
2.2 METHODEN	22
2.2.1 Zellbiologische Methoden	22
2.2.2 Patientenmaterial	23

2.2.3 Stimulation der mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1	25
2.2.4 Proteinbiochemische Analyseverfahren	25
2.2.5 Western-Blot	27
2.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	31
2.2.7 Durchflusszytometrie	33
2.3 GRAPHISCHE DARSTELLUNGEN	34
2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG	34
3 ERGEBNISSE	37
3.1 DIE CHARAKTERISIERUNG MOLEKULARER MECHANISMEN INDUZIERT DURCH DEN PROTEASE-AKTIVIERTEN REZEPTOR-1-AGONISTEN THROMBIN	37
3.1.1 Die Abhängigkeit der Aktivierung der Signaltransduktion von der Thrombinkonzentration	37
3.1.2 Die Aktivierung der Signaltransduktion im zeitlichen Verlauf	42
3.1.3 Nachweis der Thrombin- sowie PAR-1-Spezifität der induzierten Phosphorylierungseffekte	45
3.1.4 Der zeitliche Verlauf der Thrombin- sowie PAR-1- spezifischen Inhibition bzw. Antagonisierung der induzierten Phosphorylierungseffekte	52
3.2 DIE CHARAKTERISIERUNG MOLEKULARER MECHANISMEN INDUZIERT DURCH ANTIKÖRPER GERICHTET GEGEN DEN PROTEASE-AKTIVIERTEN REZEPTOR-1	57
3.2.1 Nachweis von Immunglobulinen G und PAR-1-Antikörpern	57
3.2.2 Die Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptor-1 im zeitlichen Verlauf	58
3.2.3 Die Abhängigkeit der ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} -Aktivierung von der Konzentration an PAR-1-Antikörper-positiven IgG	59
3.2.4 Die Aktivierung der Signaltransduktion durch PAR-1-Antikörper im zeitlichen Verlauf	60
3.2.5 Nachweis der PAR-1-Spezifität der induzierten Signalkaskadenaktivierung ..	62
3.2.6 Der Effekt von PAR-1-IgG auf ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} in Abhängigkeit von Pertussistoxin	70
3.2.7 Die Wirkung einer Neutralisierung von PAR-1-IgG auf ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} mittels Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife	71
3.3 DIE WIRKUNG VON PAR-1-ANTI-KÖRPER-POSITIVEM IGG VON PATIENTEN MIT TRANSPLANTATNIERENREJEKTION AUF DIE ENDOTHELIALE SEKRETION VON INTERLEUKIN-6. 72	72
3.3.1 Die Expression von Interleukin-6 ist abhängig von der Konzentration an eingesetztem PAR-1-Antikörper-IgG	72
3.3.2 Die Expression von Interleukin-6 ist abhängig von der Zeitdauer der Einwirkung der PAR-1-Antikörper-IgG	73
3.3.3 Die Wirkung des Inhibitors PD184352 auf die PAR-1-IgG-stimulierte IL-6-Sekretion	74
3.3.4 Die Wirkung PAR-1-Antikörper-positiver Tx-IgG-eluate auf die Expression von Interleukin-6 wird durch die Antikörper-Neutralisierung sowie eine PAR-1-Antagonisierung reduziert	74
4. DISKUSSION	77
4.1 HMEC-1-ZELLEN ALS GRUNDLAGE FÜR DAS UNTERSUCHUNGSMODELL	77

4.2 DIE WIRKUNG DES NATÜRLICHEN PAR-1-AKTIVATORS THROMBIN AUF DIE AKTIVIERUNG DER SIGNALTRANSDUKTION IN HMEC-1-ZELLEN.....	79
4.3 DER NACHWEIS DER THROMBIN-INDUZIERTEN PAR-1-ABHÄNGIGEN AKTIVIERUNG	80
4.4 DIE AKTIVIERUNG DES PAR-1 DURCH PAR-1-ANTIKÖRPER-POSITIVES TX-IGG IM ZEITLICHEN VERLAUF	81
4.5 DIE BEDEUTUNG VON ERK 1/2 IN DER ANTIKÖRPER-INDUZIERTEN PAR-1-AKTIVIERUNG IM KONTEXT EINER TRANSPLANTATNIERENREJEKTION	82
4.5.1 Die Aktivierung des PAR-1 durch Antikörper.....	84
4.5.2 Die Antikörper-induzierte GPCR-PAR-1-Aktivierung	85
4.6 DIE BEDEUTUNG VON AKT^{SER473} IN DER ANTIKÖRPER-INDUZIERTEN PAR-1-AKTIVIERUNG IM KONTEXT EINER TRANSPLANTATNIERENREJEKTION	87
4.7 DIE BEDEUTUNG DER P70S6K IN DER ANTIKÖRPER-INDUZIERTEN PAR-1-AKTIVIERUNG IM KONTEXT EINER TRANSPLANTATNIERENREJEKTION	89
4.8 DIE WIRKUNG PAR-1-ANTIKÖRPER-POSITIVER TX-IMMUNGLOBULINELUATE AUF DIE SEKRETION VON IL-6	90
4.9 DIE WIRKUNG VON IGG GESUNDER PROBANDEN (KON-IGG) AUF PAR-1 SOWIE DIE UNTERSUCHTEN INTRAZELLULÄREN SIGNALWEGSKOMPONENTEN	92
4.10 LIMITATIONEN DER ARBEIT	94
4.11 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	95
4.12 AUSBLICK	96
LITERATURVERZEICHNIS	97
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	113
CURRICULUM VITAE.....	115
DANKSAGUNG	121

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Transplantatversagen in Abhängigkeit vom Jahr der Transplantation	3
1.2	Schematische Darstellung einer akuten antikörper-medierten Rejektion	5
1.3	Histologischer Phänotyp einer akuten antikörper-medierten Rejektion	6
1.4	Histologischer Phänotyp einer chronischen antikörper-medierten Rejektion	6
1.5	Struktur des PAR-1	9
1.6	Mechanismus der PAR1-Aktivierung	10
3.1	Schematische Darstellung des ERK-Signalweges	38
3.2	Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	38
3.3	Schematische Darstellung des PI3K-Signalweges bzgl. AKT	39
3.4	Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473}	40
3.5	Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges mit p70S6K	41
3.6	Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389}	41
3.7	Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} im zeitlichen Verlauf	43
3.8	Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473} im zeitlichen Verlauf	44
3.9	Einfluss der Thrombinkonzentration auf die Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389} im zeitlichen Verlauf	45
3.10	Einfluss einer Thrombininhibition auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	46
3.11	Einfluss einer Thrombininhibition auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473}	47
3.12	Einfluss einer Thrombininhibition auf die Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389}	48
3.13	Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	49
3.14	Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473}	50
3.15	Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf der p70S6K ^{Thr389}	51
3.16	Einfluss einer Thrombininhibition auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} im zeitlichen Verlauf	52
3.17	Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} im zeitlichen Verlauf	53
3.18	Einfluss einer Thrombininhibition auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473} im zeitlichen Verlauf	54
3.19	Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473} im zeitlichen Verlauf	55
3.20	Einfluss einer Thrombininhibition auf die Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389} im zeitlichen Verlauf	56
3.21	Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389} im zeitlichen Verlauf	57
3.22	Einfluss der IgG-Stimulation auf die PAR-1-Aktivierung im zeitlichen Verlauf	58
3.23	Einfluss der IgG-Konzentration auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	59
3.24	Einfluss der IgG auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204} im zeitlichen Verlauf	60
3.25	Einfluss der IgG auf die Phosphorylierung von AKT ^{Ser473} im zeitlichen Verlauf	61
3.26	Einfluss der IgG auf die Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389} im zeitlichen Verlauf	62

3.27 Einfluss einer Thrombininhibition auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	63
3.28 Einfluss einer Thrombininhibition auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung von AKT ^{Ser473}	64
3.29 Einfluss einer Thrombininhibition auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389}	65
3.30 Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	67
3.31 Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung von AKT ^{Ser473}	68
3.32 Einfluss einer PAR-1-Antagonisierung auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung der p70S6K ^{Thr389}	69
3.33 Einfluss einer GPCR-Inhibition auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	70
3.34 Einfluss einer PAR-1-ECL2-Peptidsequenz auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK 1/2 ^{Thr202/Tyr204}	72
3.35 Einfluss der IgG-Konzentration auf die Sekretion von IL-6.....	73
3.36 Einfluss der IgG auf die Sekretion von IL-6 im zeitlichen Verlauf.....	73
3.37 Einfluss einer ERK-Signalkaskaden-Inhibition auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Sekretion von IL-6	74
3.38 Einfluss einer PAR-1-ECL2-Peptidsequenz sowie einer PAR-1-Antagonisierung auf die IgG-Wirkung hinsichtlich der Sekretion von IL-6	75
4.1 Schematische Darstellung des untersuchten interaktiven Netzwerkes	77

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Zelllinie	15
2.2	Chemikalien	15
2.3	Reagenzien	16
2.4	Lösungen	16
2.5	Stimulantien	17
2.6	Primäre Antikörper	17
2.7	Sekundärantikörper	18
2.8	ELISA-Antikörper	18
2.9	FACS-Antikörper	18
2.10	MOPS-Bicin-Gelsystem	18
2.11	Verbrauchsmaterialien	19
2.12	Geräte	19
2.13	Software	21
2.14	Primäre Antikörper	28
2.15	Primäre Antikörper	30
2.16	Sekundärantikörper	30

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent; relative Mengen-/Größeneinheit
°C	Grad Celsius; physikalische Maßeinheit für die Temperatur
µg	Mikrogramm; physikalische Maßeinheit für die Masse
µl	Mikroliter; physikalische Maßeinheit für das Volumen
µm	Mikrometer; physikalische Maßeinheit für die Länge
µM	Mikromolar; physikalische Maßeinheit bezogen auf die Stoffmenge
AB	engl. <i>antibody</i>
AKT	Proteinkinase B (engl. <i>proteinkinase B</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
AT ₁ -R	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1
BSA	Bovines Serumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
Ca ²⁺	Calcium
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
cm ²	Quadratcentimeter; physikalische Maßeinheit für die Fläche
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COOH	Carboxygruppe
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endothelbasalmedium
ECL	extrazelluläre Schleife (engl. <i>extracellular loop</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERK 1/2	extrazellulär Signal-regulierte Kinasen 1 und 2 (engl. <i>extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i>)
ET _A -R	Endothelin-1-Rezeptor Typ A
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
Fc-Teil	kristallisierbares Fragment (engl. <i>crystallisable fragment</i>)
g	Gramm; physikalische Maßeinheit für die Masse
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G-protein-coupled receptor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde; physikalische Maßeinheit für die Zeit
hEGF	humaner epithelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>human epidermal growth factor</i>)
HCl	Salzsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen (engl. <i>human leucocyte antigen</i>)
HMEC-1	Humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (engl. <i>human microvascular endothelial cells</i>)
HRP	Meerrettischperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	humane Nabelschnurvenenendothelzellen (engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton; physikalische Maßeinheit für die atomare Masse
KDIGO	engl. <i>Kidney Disease: Improving Global Outcomes</i>
kPa	Kilopascal; physikalische Maßeinheit für den Druck

Kon	Kontrolle
Kon-IgG	Immunglobulineluat gesunder Probanden
M	Molar; physikalische Maßeinheit bezogen auf die Stoffmenge
mA	Milliampere; physikalische Maßeinheit für die Stromstärke
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	humaner Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. <i>major histocompatibility complex</i>)
mg	Milligramm; physikalische Maßeinheit für die Masse
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten; physikalische Maßeinheit für die Zeit
ml	Milliliter; physikalische Maßeinheit für das Volumen
mM	Millimolar; physikalische Maßeinheit für die Stoffmenge
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
mTOR	Ziel des Rapamycins in Säugetieren (engl. <i>mechanistic target of rapamycin</i>)
NH ₂	Aminogruppe
nM	Nanomolar; physikalische Maßeinheit für die Stoffmenge
mTORC1	engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 1</i>
mTORC2	engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
p70S6K	70 kDa ribosomale Protein-S6-Kinase-1 (engl. <i>ribosomal protein S6 kinase 1 of 70 kDa</i>)
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor (engl. <i>Protease-activated receptor</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffer solution</i>)
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
pH	Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PH	Pleckstrin-Homologiedomäne
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RAR	engl. <i>renal-allograft-rejection</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. <i>revolutions per minute</i>); Einheit für die Drehzahl
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl suylfate</i>)
Ser	Serin; Aminosäure
SFLLRN	L-Serin- L-Phenylalanin- L-Leucin- L-Leucin-L-Arginin- L-Asparagin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
TF	Gewebefaktor (engl. <i>tissue factor</i>)
Thr	Threonin; Aminosäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TST	Tyrosin; Aminosäure
Tx	Transplantatniere
Tyr	Tyrosin; Aminosäure
V	Volt; physikalische Maßeinheit für die Spannung
w/o	ohne zugesetztes Agenz (engl. <i>without</i>)

Zusammenfassung

Immunologisch-vermittelte, antikörper-medierte endotheliale Läsionen tragen wesentlich zur Genese der konstituierenden pathogenen Vaskulopathie einer Transplantatnierenrejektion bei. Zwei Kennzeichen der Phänotypie dieser sind die intravaskuläre Koagulation sowie die Inflammation. Trotz bahnbrechender Neuerungen im Bereich medikamentöser Therapeutika, stellt die Therapie der Transplantatnierenrejektion sowohl Behandler als auch Behandelte weiterhin vor große Herausforderungen.

Der Protease-aktivierte Rezeptor-1 (PAR-1) ist ein zunächst als Thrombinrezeptor identifizierter G-Protein-gekoppelter Rezeptor, welchem Beteiligungen sowohl an immunologischen als auch an inflammatorischen Prozessen zugeschrieben werden. Funktionelle, gegen den PAR-1 gerichtete Autoantikörper wurden erstmals bei Patientinnen mit primärem epitheliale ovariellem Karzinom nachgewiesen. Interessanterweise finden sich auch erhöhte PAR-1-Antikörpertiter bei Patienten mit Transplantatnierenrejektion.

Mit dieser Arbeit wurde der Einfluss funktioneller Antikörper gerichtet gegen den PAR-1 sowie deren Wirkung auf Signaltransduktionsmechanismen und die endotheliale Inflammation anhand Interleukin-6 (IL-6) an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) für die Pathologie einer Transplantatnierenrejektion untersucht.

HMEC-1-Zellen wurden mit dem natürlichen PAR-1-Aktivator Thrombin und isolierten, gegen den PAR-1 gerichteten Antikörpern von Patienten mit Transplantatnierenrejektion stimuliert. Die Aktivierung der intrazellulären Signalwegskomponenten ERK 1/2, AKT sowie p70S6K wurde mittels Westernblot, die IL-6-Sekretion mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt. Zur Bestätigung der Spezifität der nachgewiesenen Wirkungen wurden Inhibitoren bzw. Antagonisten eingesetzt. Die Wirkung isolierter PAR-1-Antikörper wurde durch Neutralisation mit einer synthetischen Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife (ECL 2) des PAR-1 demonstriert.

Der endogene PAR-1-Aktivator Thrombin induzierte eine konzentrations- und zeitabhängige Phosphorylierung von ERK 1/2. Für AKT und p70S6K deutete sich diese an. PAR-1-Antikörper-positive Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) stimulierten die Aktivierung von ERK 1/2 tendenziell unabhängig von Thrombin. Dies deutete sich ebenso für die weiteren untersuchten Signalwegskomponenten an. Eine spezifische pharmakologische Blockade bestätigte die PAR-1-Aktivierung von ERK 1/2. Zeigen ließ sich weiterhin, dass PAR-1-Antikörper eine erhöhte Sekretion von IL-6 bedingten, welche unter Beteiligung von ERK 1/2 erfolgte.

Zusammenfassend wurde mit der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt, dass gegen den PAR-1-gerichtete Antikörper an pathologischen endothelialen Prozessen der Transplantatnierenrejektion mitwirken und über IL-6 die endotheliale Inflammation unterhalten.

Abstract

Antibodies (AB) may provoke endothelial lesions in renal allograft rejections (RAR) resulting in a characteristic constituting pathogenic vasculopathy. The phenotype of rejected renal allografts is characterized by intravascular coagulation and inflammation. Despite pioneering pharmaceutical developments RAR still outlines a tremendous challenge for clinicians as well as patients to the present day.

The Protease-activated receptor 1 (PAR-1), originally titled as „thrombin receptor“, is a G-protein-coupled receptor (GPCR) contributing to immunological and inflammatory processes. Functional antibodies against PAR-1 were firstly detected in patients with primary epithelial ovarian cancer. Interestingly, increased PAR-1-AB-levels have also been proven in the serum of RAR patients.

Aim of this thesis was to investigate the influence of functional antibodies against the GPCR PAR-1 and their impact on intracellular signaling pathways as well as on the secretion of interleukin-6 (IL-6) as marker for endothelial inflammation in human dermal microvascular endothelial cells (HMEC-1) in the context of RAR.

HMEC-1-cells were treated with the endogenous PAR-1-activator thrombin and PAR-1-AB-positive immunoglobulin eluates isolated from patients with RAR. The activation of ERK 1/2, AKT as well as p70S6K were detected by western blotting, IL-6-secretion was measured by enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). The specificity of the determined effects was confirmed by experiments using specific inhibitors and PAR-1-antagonists. The impact of the isolated PAR-1-AB was demonstrated by neutralisation with a synthetical peptide of the second extracellular loop (ECL 2) of the PAR-1.

Thrombin induced the phosphorylation of ERK 1/2 in a concentration- and time-dependent manner. Equaling hints were also present for AKT and p70S6K. PAR-1-AB-positive immunoglobulin eluates indicated an activation of ERK 1/2 independent from Thrombin. These indications were also hinted for AKT and p70S6K. Specific pharmacological blockage validated the PAR-1 activation. Furthermore an increased ERK 1/2-regulated IL-6-secretion was induced by PAR-1-AB.

In conclusion, this is the first evidence that PAR-1-AB contribute to pathological endothelial processes in renal allograft rejections and may maintain endothelial inflammation by IL-6.

1 EINLEITUNG

Beim Menschen erfolgt die Abwehr externer Pathogene durch angeborene oder erworbene Mechanismen des Immunsystems.¹ Neben exogenen Antigenen findet sich eine Vielzahl an körpereigenen Antigenen.² Für eine adäquate Funktionalität des humanen Immunsystems ist aus diesem Grund neben der Unterscheidung zwischen nicht-eigen und eigen ebenso die Ausbildung einer immunologischen Toleranz gegenüber endogenen Antigenen unabdingbar.³ Ein Verlust der immunologischen Toleranz resultiert in autoimmunen Prozessen.³ In Kombination mit weiteren genetischen, hormonellen sowie Umgebungsfaktoren kann dies zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen.⁴ Eine bedeutende Funktion im Rahmen der erworbenen humoralen Immunantwort nehmen von Plasmazellen produzierte Antikörper wahr. Als Autoantikörper gegen körpereigene Strukturen gerichtet, können diese eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Erkrankungen spielen.² Der in dieser Arbeit untersuchten Pathologie, der Rejektion einer Transplantatniere, sind antikörpermedierte Prozesse in der Genese der konstituierenden pathogenen Vaskulopathie gemein.

1.1 Autoantikörper

Das Vorliegen von Autoantikörpern wird als Kennzeichen systemischer Autoimmunerkrankungen, deren Aktivität und Prognose gewertet.⁵ In verschiedenen Studien ließen sich jedoch bereits Jahre vor Ausprägung des klinischen Erscheinungsbildes erkrankungsspezifische Autoantikörper nachweisen.⁶⁻⁸ Auch wurde die Existenz, sogenannter natürlicher Autoantikörper der Immunglobulinklassen G, M und A in Gesunden, welche im späteren Lebensverlauf keine Autoimmunerkrankungen entwickelten, demonstriert.^{9,10} Als pathogen werden Autoantikörper bezeichnet, welche mit einem nachvollziehbarem Zielantigen im Bereich einer Gewebeschädigung gefunden werden, deren Kausalität experimentell reproduzierbar ist.¹¹ Beispielsweise ließen sich diese beim Auftreten von Karzinomen nachweisen.¹² Physiologische Funktionen stimulierende Autoantikörper wurden hingegen ursprünglich als funktionelle Autoantikörper bezeichnet.¹³ Später wurde der Terminus funktioneller Autoantikörper spezifiziert. Eine direkte Interaktion zwischen funktionellem Autoantikörper und Zielantigen führt demnach zu einer, auch unter experimentellen Bedingungen nachvollziehbaren, Aktivierung oder Inhibition eines molekularen Signalweges.¹⁴

1.2 Die Nierentransplantation

1.2.1 Überblick

Am 23. Dezember 1954 transplantierte Joseph E. Murray am Peter Bent Brigham Hospital der Harvard Medical School in Boston, Massachusetts die linke Niere von Ronald Herrick dessen monozygotem Zwillingenbruder Richard Herrick.¹⁵ Um eine Immunreaktion zwischen Transplantat und Empfänger auszuschließen, gingen der Transplantation Untersuchungen zum eindeutigen Beweis der immunologischen und genetischen Identität der Brüder voraus. Diese umfassten eine Kreuzprobe für alle bekannten Blutgruppen sowie eine reziproke Vollhauttransplantation, welche nach drei Wochen makro- und mikroskopisch auf Zeichen einer Rejektion untersucht wurde.¹⁶

Nach ersten erfolgreichen Transplantationen nicht-identischer Zwillinge 1959 folgten alsbald allogene Transplantationen zwischen nicht-verwandten Spendern und Empfängern.¹⁷ Grundlage für die Transplantation zwischen nicht identischen Spendern und Empfängern bildete zunächst eine Ganzkörperbestrahlung des Transplantatempfängers.¹⁸ Diese diente der Verhinderung einer Abstoßungsreaktion durch eine günstige Beeinflussung des Verhältnisses von durch das Transplantat präsentem Antigen zu immunologisch kompetenten Zellen des Empfängers.^{17,19} Zur Prophylaxe einer Nebennierenrindeninsuffizienz sowie zur Immunsuppression wurde der Transplantatempfänger mit Kortikosteroiden behandelt.^{18,20} Mit Verabreichung des antimetabolitären Purin-Analogons 6-Mercaptopurin wurde zudem die primäre Immunantwort und eine damit einhergehende, gegen das Transplantat gerichtete, Antikörperproduktion inhibiert.^{17,21}

In den folgenden Jahrzehnten führte ein besseres Verständnis immunologischer Mechanismen, sowie eine hierauf basierende Entwicklung und ausschließliche Anwendung medikamentöser Immunsuppressiva, wie insbesondere die Einführung der Calcineurininhibitoren Cyclosporin und Tacrolimus zur Verbesserung des Transplantatüberlebens.^{20,22-25} Gemäß KDIGO-Leitlinie wird gegenwärtig eine Kombination aus immunsuppressiver Induktionstherapie beginnend vor oder mit Durchführung der Nierentransplantation sowie eine Erhaltungstherapie bestehend aus einem Calcineurininhibitor und einer antiproliferativen Substanz in optionaler Kombination mit einer Kortikosteroidbehandlung empfohlen.²⁶ Das Spektrum der verfügbaren Therapieoptionen ermöglicht eine zunehmend individualisierte immunsuppressive Therapie des einzelnen Transplantatempfängers. Untersuchungen zeigen jedoch, dass die Wahl des angewendeten Therapieregimes vor allem durch die klinische Praxis des jeweiligen Transplantationszentrums, sowie dessen Präferenz bestimmt wird.²⁷ Die Mehrzahl der deutschen Transplantationszentren verabreicht eine Kombination

aus drei Wirkstoffen.²⁸ So ließ sich die Zahl akuter Rejektionen erheblich verringern und 1-Jahres-Transplantatüberlebensraten von nahezu 90% für Lebend- und postmortale Transplantate erzielen.^{29,30} Demgegenüber zeigten sich jedoch nur geringe Veränderungen hinsichtlich des Langzeit-Transplantatüberlebens.^{23,31,32} Aktuelle Untersuchungen aus den Vereinigten Staaten von Amerika bestätigen die fortbestehend vergleichsweise hohe Rate an Transplantatnierenversagen im Langzeitverlauf (siehe auch Abbildung 1.1).³³

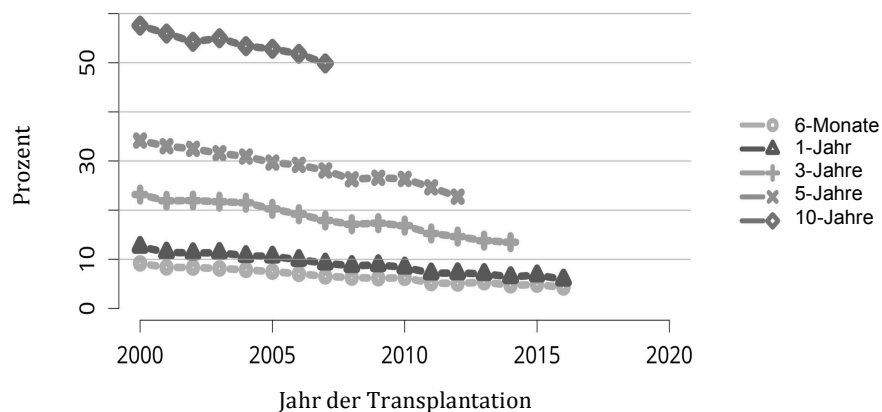


Abbildung 1.1³³ Transplantatversagen in Abhängigkeit vom Jahr der Transplantation (2000-2016): Gezeigt wird der prozentuale Anteil an Transplantatempfängern mit Auftreten eines Transplantatversagens (erneute Transplantation, Dialysepflichtigkeit oder Tod) in Abhängigkeit des Zeitpunktes post transplantationem. [Reproduktion mit Erlaubnis, Copyright John Wiley & Sons Inc.]

Trotz dieser fortbestehenden Herausforderung ist die Nierentransplantation die Therapie der Wahl für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz.^{34,35} Neben einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität reduziert sich die Mortalität erfolgreich transplanteder Patienten gegenüber in Dialyseverfahren fortbehandelter Patienten.^{36,37}

Gemäß älteren Berichten des Bundesverbandes Niere e.V. befanden sich im Jahr 2006 mehr als ein Viertel aller in chronischer Nierenersatztherapie befindlicher Patienten der Bundesrepublik in der Nachsorge nach Nierentransplantation.³⁸ Aktuelle Daten zeigen, dass im Jahr 2019 2132 Nierentransplantationen durchgeführt worden, darüber hinaus befanden sich 11827 Patienten auf der Warteliste.³⁹ Die häufigsten Indikationen, welche eine Nierentransplantation in der Bundesrepublik Deutschland im Jahr 2019 notwendig gemacht haben, waren neben der zystischen und der chronischen Nierenkrankheit das chronische nephritische Syndrom.³⁹

1.2.2 Die Rejektion einer Transplantatniere

Die Rejektion, das heißt die immunologisch-vermittelte Transplantatschädigung, ist neben dem Alter des Donors, der Organqualität, dem Hirntod des Spenders, des Vorliegens eines Ischämie-Reperfusionsschadens sowie dem sogenannten Post-Transplantationsstress

oder systemischen Einflüssen aus der Umgebung des Rezipienten als entscheidende Variable für das Transplantatversagen angeführt.⁴⁰ Insbesondere ist sie mit einem frühen Verlust des Nierentransplantates assoziiert, währenddessen sich ein späteres Transplantatversagen vornehmlich vom Spenderalter abhängig zeigt.⁴¹

Unterschieden werden neben dem zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus der Abstoßungsreaktion auch die pathophysiologische Veränderung, der Schweregrad der Abstoßung, das Ansprechen auf die erfolgte Behandlung, das Vorliegen einer renalen Dysfunktion oder auch das zeitliche Auftreten.⁴²

International gültige standardisierte Kriterien zur Diagnosestellung einer Transplantatnierenabstoßung liegen seit 1993 mit der, in regelmäßiger Überarbeitung befindlichen, Banff-Klassifikation vor.⁴³ Den einzelnen Kategorien kommt bei dieser neben der histopathologischen Vereinheitlichung ebenso eine prognostische Bedeutung zu.⁴⁴

1.2.3 Humorale Mechanismen der Transplantatnierenreaktion im zeitlichen Verlauf

Als eigene klinisch-pathologische Entität wurde die Antikörper-medierte Abstoßungsreaktion erstmalig 1997 in die standardisierten Kriterien zur Diagnosestellung einer Transplantatnierenreaktion aufgenommen.⁴⁵ Untersuchungen belegen, dass antikörper-medierte Rejektionen mit einer gegenüber T-Zell-vermittelten Rejektionen ungünstigeren Prognose⁴⁶ sowie einem höherem Risiko des Transplantatverlustes⁴⁷ einhergehen. Die Anwendung intravenöser Immunglobuline⁴⁸ sowie insbesondere der Plasmapherese^{49,50} und Immunadsorption⁵¹ in der Behandlung von Rejektionen unterstreicht den Beitrag humoraler Immunmechanismen bei Transplantatnierenreaktionen.

In Abhängigkeit des zeitlichen Auftretens der Antikörper-vermittelten Reaktion werden differenzielle Mechanismen angenommen.

Bei einer unmittelbar nach Reperfusion der Transplantatniere in sensibilisierten Empfängern auftretenden hyperakuten Rejektion führen im Empfänger zirkulierende Antikörper gegen das humane Leukozytenantigen (HLA), Blutgruppen- oder andere, im mikrovaskulären Endothel und den Glomeruli exprimierte Alloantigene innerhalb von Minuten oder Stunden zur Aktivierung der klassischen Komplementkaskade.^{42,52} Die initiierte intravaskuläre Koagulation führt zur Bildung von Fibrinthromben. Ebenso führen Plättchentromben zur Verlegung von Gefäßen in deren Folge fibrinoide Nekrosen und Infarkte auftreten können (siehe Abbildung 1.2). Bei nahezu allen Betroffenen sind die induzierten Läsionen irreversibel, so dass eine Explantation des Transplantates notwendig wird.⁴²

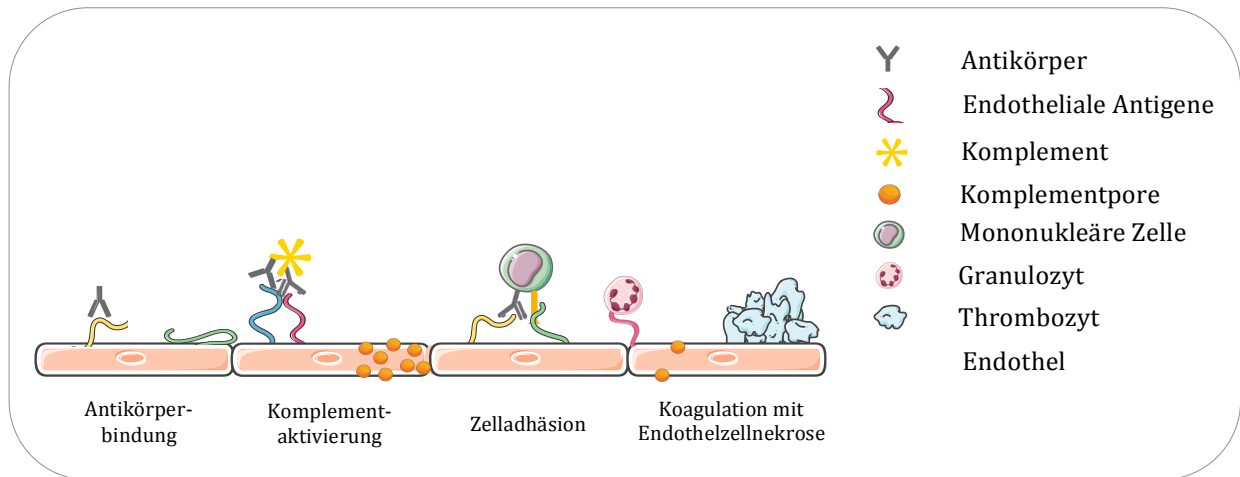


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung einer akuten antikörper-vermittelten Rejektion: Gezeigt wird die Bindung von Antikörpern gegen endothelial exprimierte Spender-Antigene des Transplantats mit nachfolgender Aktivierung des Komplementsystems sowie eine Zelladhäsion resultierend in einer Endothelzellnekrose und intravaskulärer Koagulation.

Eine innerhalb der ersten 24 Stunden bis zu wenigen Tagen nach Transplantation auftretende Abstoßungsreaktion wird als akzelerierte akute Rejektion bezeichnet. Ursächlich kann sowohl eine Antikörper-vermittelte als auch eine sekundäre Immunantwort nach Sensibilisierung des Empfängers gegen HLA-Antigene durch vorangegangene Transfusionen, Schwangerschaften oder eine vormalige Transplantation sein. Am häufigsten ist sie bei Blutgruppenantigen- oder HLA-inkompatiblen Transplantationen zu beobachten.⁵³

30-50% der durch Biopsie bestätigten akuten, das heißt innerhalb von wenigen Tagen bis Monaten auftretenden Abstoßungsreaktionen weisen Charakteristika einer Antikörper-vermittelten Rejektion auf.^{42,54-57} Diese betrifft vornehmlich die peritubulären und glomerulären Kapillaren.⁵² Morphologisch zeigt sich vor allem eine Inflammation.⁴² Diagnostische Kriterien sind das Vorliegen einer renalen parenchymatösen Schädigung in Form einer mikrovaskulären Inflammation, das heißt einer Glomerulitis und/oder peritubulären Kapillaritis; einer Arteriitis, thrombotischer Mikroangiopathie oder einer akuten tubulären Schädigung (siehe auch Abbildung 1.3). Daneben ist eine Antikörper-Wechselwirkung mit dem vaskulären Endothel, entweder verdeutlicht durch eine lineare C4d-Färbung der peritubulären Kapillaren, eine moderate mikrovaskuläre Inflammation oder eine erhöhte Expression von Gentranskripten, welche stark mit einer Antikörper-vermittelten Rejektion verbunden ist, bzw. ein entsprechend hoher Classifier-Score nachzuweisen.⁵⁸ Weiterhin sind serologische Untersuchungen zu spender-spezifischen HLA- oder non-HLA-Antikörpern durchzuführen.⁵⁸ Histopathologische Veränderungen lassen sich trotz regelrechter Transplantatfunktion auch bei sogenannten subklinischen Rejektionen nachweisen.⁴² Auch in diesem Fall verbessert

eine frühzeitige Behandlung das Transplantatüberleben⁵⁹ und reduziert das Risiko des Auftretens chronischer Transplantatdysfunktionen bis hin zum späten Transplantatverlust⁶⁰.

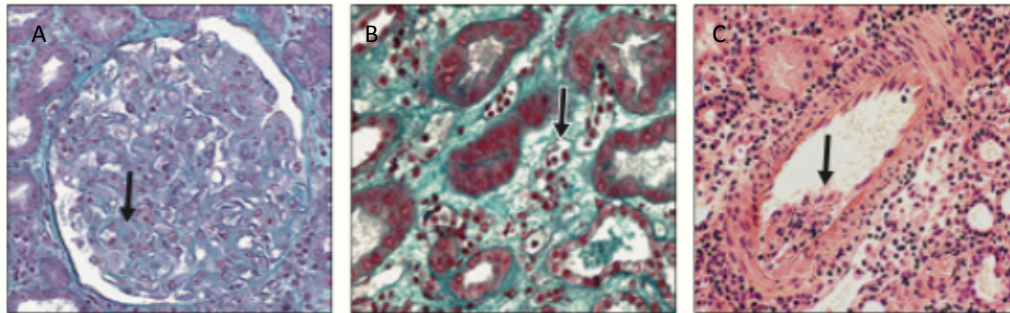


Abbildung 1.3⁴⁸ Histologischer Phänotyp einer akuten antikörper-vermittelten Rejektion: Gezeigt wird die renale parenchymatöse Schädigung durch mikrovaskuläre Inflammation der glomerulären Kapillaren (Bild A Glomerulitis, Masson-Trichom-Färbung) und der peritubulären Kapillaren (Bild B mononukleäre Zellen bei einer peritubulären Kapillaritis, Masson-Trichom-Färbung) sowie eine makrovaskuläre Inflammation (Bild C intinale Arteriitis einer interlobulären Arterie, Hämatoxylin-Eosin-Färbung). [Reproduktion mit Erlaubnis, Copyright Massachusetts Medical Society.]

Die chronische Abstoßungsreaktion ist klinisch von einer protrahierten Abnahme der Nierenfunktion, dem Vorhandensein einer Hypertonie sowie dem Auftreten einer Proteinurie gekennzeichnet.⁶¹ Eine insuffiziente Immunsuppression gegenüber gegen das Transplantat gerichteten Antikörpern kann ursächlich für chronische Abstoßungsreaktionen sein.⁴² Morphologisch zeigt sich eine sogenannte Transplantatglomerulopathie.⁵⁸ Antikörper-vermittelte Läsionen führen hierbei in glomerulären und peritubulären Kapillaren zu einer zellulären Hypertrophie mit subendothelialer Ablagerung von fibrillärem Material sowie einer in der Folge resultierenden Entstehung von Doppelkonturen oder einer Aufspaltung der glomerulären Basalmembran mit Interposition mesangialer Zellen⁴² (siehe auch Abbildung 1.3). Daneben kann sich eine Ablagerung des Komplementfaktors C4d in peritubulären Kapillaren finden.⁵⁸

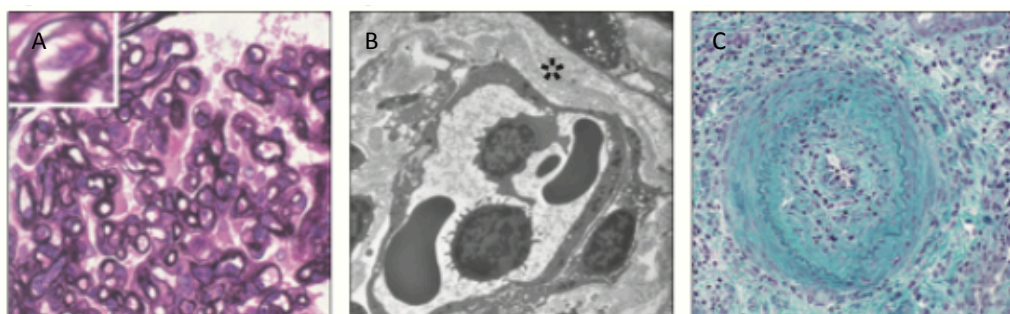


Abbildung 1.4⁴⁸ Histologischer Phänotyp einer chronischen antikörper-vermittelten Rejektion: Gezeigt wird die renale mikrozirkulatorische Schädigung durch Doppelkonturen der glomerulären Basalmembran (Bild A Transplantatglomerulopathie, Methenamin-Silber-Färbung, Lichtmikroskop) und der peritubulären Kapillaren Basalmembran (Bild B Transmissionselektronenmikroskop) sowie eine makrozirkuläre Schädigung (Bild C intinale Hypertrophie einer interlobulären Arterie, Masson-Trichom-Färbung). [Reproduktion mit Erlaubnis, Copyright Massachusetts Medical Society.]

Wie vorbenannt wird zwischen Antikörpern gerichtet gegen das HLA sowie sogenannten non-HLA-Antikörpern, gerichtet gegen nicht-HLA-assoziierte Antigene, unterschieden.⁶²

1.2.3.1 Die Bedeutung von HLA-Antikörpern

Der humane Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) ist eine für das Immunsystem essentielle, das humane Leukozytenantigen kodierende Region auf dem kurzen Arm des Chromosom 6.⁶³ Die hoch polymorphen, an Zelloberflächen exprimierten HL-Antigene nehmen eine Schlüsselrolle in der Unterscheidung körperfremd von körpereigen im Immunsystem ein.⁶⁴ Das Erkennen nicht-eigener HLA-Antigene kann als Stimulus für eine Immunantwort dienen.⁶⁴ Die Bedeutung identischer HLA-Loci in der Transplantation von Nieren ließ sich durch exzellente Ergebnisse im Transplantat- und Patientenüberleben HLA-identischer Geschwister bestätigen.⁶⁵ Demgegenüber wurde ein mit der Anzahl an nicht-identischen HLA-Loci zwischen Donor und Rezipient assoziiertes Risiko eines Transplantatverlustes aufgezeigt.⁶⁶ Bereits ein sogenanntes „mismatch“ in der Übereinstimmung der Donor- und Rezipienten-HLA-Antigene kann zur Produktion von HLA-Antikörpern gegen das betreffende Epitop führen.⁶⁷ Dies kann Auswirkungen sowohl auf das gegenwärtige Transplantatüberleben, jedoch durch die nun initiierte Sensibilisierung auch auf zukünftige erneute Transplantationen des Rezipienten haben.⁶⁸ So ließen sich in 88,5% der Patienten mit vorangegangener einmaliger Transplantation als sensibilisierendes Ereignis Antikörper gegen HLA Klasse I oder II nachweisen.⁶⁹

1.2.3.2 Die Bedeutung von non-HLA-Antikörpern

Gezeigt wurde jedoch auch, dass antikörper-medierte Läsionen bis hin zum Transplantatverlust bei HLA-identisch transplantierten Geschwistern auftreten können.^{70,71} Schwierigkeiten bereitete in diesem Zusammenhang anfänglich der Nachweis dieser, als non-HLA bezeichneter Antikörper. Vermutet wurde zunächst, dass es sich um Antikörper gegen Nebenhistokompatibilitätsantigene oder gegen Endothelzellen handelte.⁷⁰ Mit Nachweis der weitreichenden klinischen Relevanz wuchs das Interesse an der Untersuchung dieser.⁷² Letztlich ließ sich eine Vielzahl an non-HLA-Antikörpern gerichtet gegen Allo- als auch Autoantigene, in der Hauptsache exprimiert durch Endothelzellen, nachweisen.⁴⁸ Darüber hinaus gelangten jedoch ebenso Epithel-, Parenchym- oder zirkulierende Immunzellen in den Fokus, als Zielstruktur für non-HLA-Antikörper zu fungieren.⁷³ Mit der Entdeckung des Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1 (AT₁-R) als Ziel von Autoantikörpern bei Transplantatnierenrejektionen rückten schließlich G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) als Zielstruktur in den Fokus non-HLA-assoziiert Transplantatnierenrejektionen.⁷⁴ Gezeigt wurde, dass gegen den AT₁-

R gerichtete Autoantikörper eine Phosphorylierung der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK 1/2) sowie eine erhöhte DNA-Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren aktivierendes Protein-1 und nukleärer Faktor-κB induzierten. Zudem war das Vorliegen von AT₁-R-Antikörpern mit einem signifikant schlechteren Transplantatüberleben gegenüber Rezipienten mit anti-HLA-Antikörpern assoziiert. Seit dieser Entdeckung hat sich das Spektrum antigener non-HLA-Zielstrukturen stetig erweitert.⁷⁵

1.3 Die Serinprotease Thrombin

Der Serinprotease Thrombin wird neben ihrer Schlüsselrolle in der Koagulationskaskade⁷⁶ ebenso eine Funktion im Rahmen inflammatorischer Prozesse zugeschrieben.⁷⁷ Eine lokale Inflammation, initiiert durch die Hämostase, kann hierbei zum Ausgangspunkt einer Antigenpräsentation mit nachfolgender Initiierung einer erworbenen Immunantwort werden.⁷⁸ Nachgewiesen sind weiterhin Effekte assoziiert mit Tumorwachstum und Metastasierung, sowie Angiogenese.⁷⁹

Die Vielzahl differenzieller Wirkungen induziert Thrombin sowohl mittels enzymatischer Spaltung als auch direkt über die Aktivierung einer Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, sogenannter Protease-aktivierter Rezeptoren (PARs).⁷⁷

1.3.1 Thrombin und die intravaskuläre Koagulation

In der zu untersuchenden Pathologie der Transplantatnierenrejektion verdeutlicht das Vorkommen von Fibrinablagerungen, vaskulärer Thromben, sowie letztlich die Ausprägung einer thrombotischen Mikroangiopathie eine Beteiligung der Hämostase an der Pathologie. Die Matrix eines jeden Thrombus bilden polymerisierende Fibrinmonomere.⁷⁶ Diese entstehen mittels Spaltung im peripheren Blut zirkulierender, zunächst noch löslicher Fibrinmonomere durch Thrombin.⁷⁶ Die Bildung des Thrombins wird dabei durch den Gewebefaktor (auch bekannt als Faktor III oder CD 142, engl. *Tissue factor* (TF)) initiiert.⁸⁰ Durch eine Läsion des Endothels erhält dieses, im intakten Gefäß extravaskulär lokalisierte Membranprotein, Kontakt zu im Plasma zirkulierenden Koagulationsfaktoren.⁷⁶ Die hierdurch mögliche Komplexbildung zwischen TF und Faktor VIIa (FVIIa) bildet den Ausgangspunkt des extrinsischen Pfads der sekundären Hämostase in dessen Verlauf eine geringe Menge Thrombin durch die enzymatische Spaltung von Prothrombin durch den aktivierten Faktor X (FXa) entsteht.⁷⁷ Das generierte Thrombin, die Bildungsrate beträgt 1%⁸⁰ auf diesem Weg, wiederum führt durch eine Aktivierung der Faktoren VIII und V zu einer stark gesteigerten Produktion von Thrombin.⁸⁰ Thrombin konvertiert Fibrinogen in Fibrin und aktiviert weitere

Faktoren der Gerinnungskaskade (FV, FVIII, FXIII, Protein C und Thrombin-aktivierbaren Fibrinolyseinhibitor).⁷⁷ Daneben fungiert Thrombin im Rahmen der primären Hämostase als potenter Thrombozytenaktivator⁸¹ mit in der Folge resultierenden vaskulären Thromben.

1.3.2 Thrombin und die Inflammation

Eine Beteiligung Thrombins ist weiterhin an Prozessen der Inflammation beschrieben, verdeutlicht beispielsweise durch Fibrinablagerungen als integralem Bestandteil inflammatorischer Antworten nach thermischen, chemischen oder physikalischen Traumata.⁸² Neben der vaskulären Permeabilität erhöht Thrombin auch die transendotheliale Zellmigration von neutrophilen Granulozyten.⁸² An Endothelzellen kann Thrombin die Produktion proinflammatorischer Mediatoren, wie beispielsweise IL-6 initiieren.⁷⁷ Darüber hinaus wird die Expression pro-inflammatorischer Mediatoren in einer Vielzahl weiterer Zelltypen, wie z.B. in Monozyten und Makrophagen oder glatten Muskelzellen Thrombin- vermittelt reguliert.⁷⁷

1.4 Der Protease-aktivierte Rezeptor-1

Thrombin aktiviert den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR-1).⁸³ Dieser, für seine Familie der Protease- aktivierten Rezeptoren, prototypische Rezeptor wird der Gruppe A G-Protein-gekoppelter Rezeptoren zugeordnet.⁸⁴ Gemeinsames strukturelles Kennzeichen aller G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind sieben transmembranäre, α - helikale Segmente, welche alternierend durch drei extra (ECL 1 bis 3)- und drei intrazelluläre Schleifenregionen getrennt werden.⁸⁵ Extrazellulär findet sich hierbei das NH_2 -terminale Ende des Rezeptors, wohingegen intrazellulär folgend an eine amphipathische Helix der COOH -Terminus lokalisiert ist (siehe auch Abbildung 1.7).⁸⁶

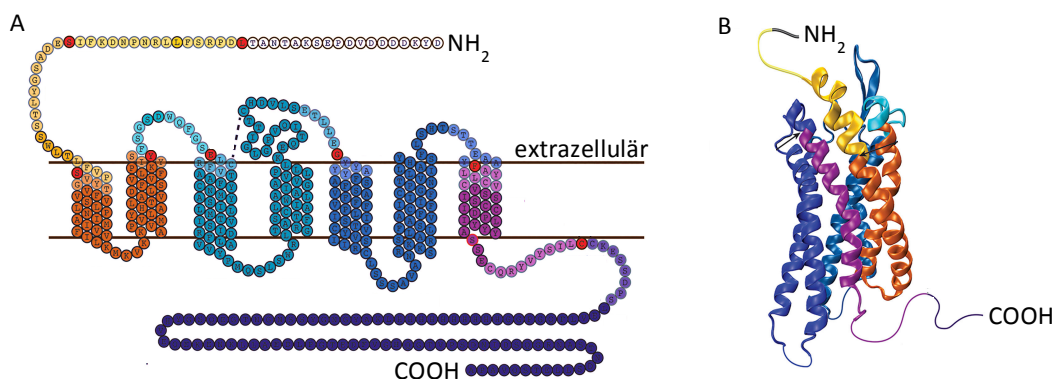


Abbildung 1.5 Struktur des PAR-1: Gezeigt wird die Sekundär- (Bild A) sowie Tertiärstruktur (Bild B) des PAR. [Reproduktion mit Erlaubnis, Copyright Elsevier.]

Die insgesamt fünf zu unterscheidenden Hauptfamilien G-Protein-gekoppelter Rezeptoren weisen strukturelle Gemeinsamkeiten und Sequenzhomologien auf.⁸⁷ Eine Besonderheit gegenüber anderen Rezeptoren der Gruppe A G-Protein-gekoppelter Rezeptoren stellt der Signaltransduktionsmechanismus des PAR-1 dar.⁸⁴ Neben PAR-1 aktiviert Thrombin die Rezeptoren PAR-3 und PAR-4 der bisher vier bekannten humanen PARs.⁸³

1.4.1 Die Signaltransduktion des PAR-1

Thrombin schneidet die amino-terminale extrazelluläre Region des PAR-1 zwischen den Aminosäuren Arginin an Position 41 und Serin an Position 42.⁸⁸ Hierdurch entsteht ein neuer NH₂-Terminus, welcher als gebundener Peptidligand beginnend mit der Sequenz ⁴²SFLLRN⁴⁷ an die zweite extrazelluläre Schleife (ECL 2) des Rezeptors bindet und die Signaltransduktion einleitet.⁷⁶ Induziert durch die Ligandenbindung ermöglichen Konformationsänderungen der transmembranären Helices an der zytoplasmatischen Rezeptoroberfläche eine Interaktion mit der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins.⁸⁹ Die inaktive GDP-gebundene α -Untereinheit wird in eine aktive GTP-gebundene α -Untereinheit transformiert, in deren Folge die Aktivität nachfolgender Effektorproteine moduliert wird.⁹⁰ Zur Auslösung einer Vielfalt an zellulären Antworten binden aktivierte PAR-1 an die Subtypen G_q, G_i und G_{12,13} der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (siehe auch Abbildung 1.8).⁹¹

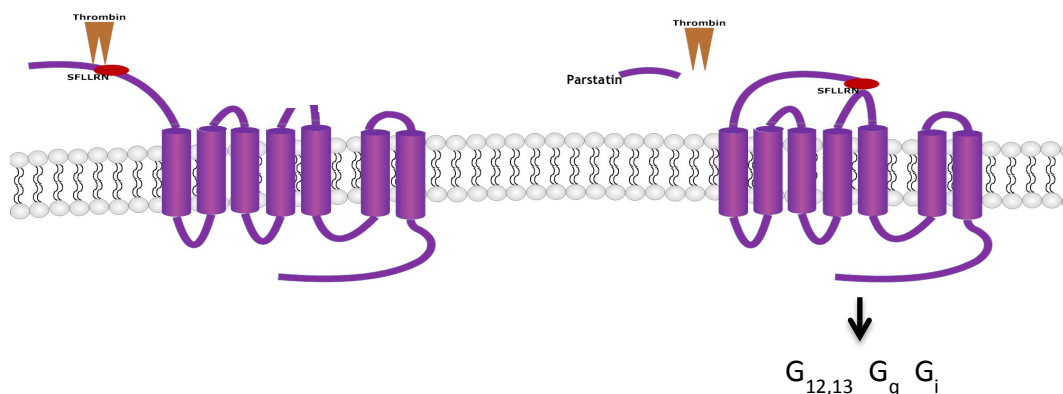


Abbildung 1.6 Mechanismus der PAR1-Aktivierung: Gezeigt wird die proteolytische Spaltung der amino-terminalen extrazellulären Region des PAR-1 durch Thrombin zwischen den Aminosäuren Arginin an Position 41 und Serin an Position 42, sodass ein neuer NH₂-Terminus mit der Sequenz ⁴²SFLLRN⁴⁷ entsteht. Dieser gebundene Peptidligand bindet an die 2.extrazelluläre Schleife (ECL 2) des Rezeptors und induziert über die G-Protein-gekoppelten Rezeptorsubtypen G_{12,13}, G_q und G_i Signaltransduktionsmechanismen.

Induziert werden nachfolgende intrazelluläre Signalkaskaden beispielsweise über den RhoGEF-medierten Rho oder Rac-Signalweg, eine Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) oder eine intrazelluläre Calciummobilisierung.⁹² Hierbei unterliegen PAR-1 einem sogenannten partiischen (engl. *biased*) Agonismus, nach welchem ver-

schiedene Liganden differierende Antworten durch die Aktivierung desselben G-Proteingekoppelten Rezeptors hervorrufen.⁸⁹ In diesem Zusammenhang löst Thrombin präferentiell eine Aktivierung von $G_{\alpha 12}$ oder $G_{\alpha 13}$ aus.⁹³ Darüber hinaus interagiert das zytoplasmatische Ende des PAR-1 auch unabhängig von einer Kopplung an heterotrimere G-Proteine mit verschiedenen Adaptorproteinen zur Signaltransduktion, so z.B. mit dem Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) und der Kreatinkinase.⁸⁹ Im Gegensatz zu einer typischen Rezeptor-Agonisten-Bindung bindet Thrombin an den PAR-1 nur transient zur Erfüllung seiner enzymatischen Funktion des Schneidens mit anschließender Dissoziation vom Rezeptor.⁸⁴ Die proteolytische Spaltung des Rezeptors ist irreversibel⁹², seine Aktivierung bedarf einer aktiven Beendigung.⁸⁴ Im Gegensatz zu anderen reversibel aktivierbaren G-Proteingekoppelten Rezeptoren werden aktivierte PAR-1 internalisiert, zu Lysosomen geleitet und degradiert⁹². Das 41-Aminosäuren-umfassende, im Aktivierungsprozess in das extrazelluläre Milieu freiwerdende Peptidfragment wird als Parstatin bezeichnet.⁸⁹

1.4.2 Die Bedeutung von PAR-1-Antikörpern

Publizierte Daten zur klinischen Relevanz von Autoantikörpern gegen den PAR-1 sind bisher spärlich. In einer Analyse der Seren von 197 Patientinnen mit primärem epitheliale ovariellem Karzinom wurde eine negative Korrelation mit dem histologischen Stadium, entsprechend geringen Blutspiegeln in hochgradigen Karzinomen, nachgewiesen.⁹⁴

1.5 Interleukin-6

Das Zytokin IL-6 ist ein pleiotropes, zwischen 21- und 26-kDa großes glykosiliertes Protein, bestehend aus 212 Aminosäuren mit einem aus 28 Aminosäuren bestehenden Signalpeptid sowie einem 20-kDa großen Kernprotein.⁹⁵ Erstmals war IL-6 als ein antigenunspezifischer B-Zell-Differenzierungsfaktor in kultivierten Überständen mitogen- oder antigenstimulierter peripherer mononukleärer Blutzellen aufgefallen.^{96,97} Die Förderung der Differenzierung aktivierter B-Zellen in Immunglobulin-produzierende Plasmazellen wurde namensgebend, BSF-2 – B-Zell-stimulierender Faktor 2.⁹⁵ Die Bindung von IL-6 erfolgt an den spezifischen Rezeptor IL-6R.⁹⁸ Dieser bildet eine IL-6-Bindungskette, welche in den beiden differierenden Formen eines 80-kDa großen transmembranären IL-6R sowie einem 50-55kDa großen löslichen IL-6R (sIL-6R)^{98,99} existiert. Der zellgebundene transmembranäre IL-6R ist beispielsweise auf Leukozyten zu finden, während der lösliche IL-6R im Blut und in fluidem Gewebe lokalisiert ist.⁹⁵ Daneben dient ein 130-kDa großes, auf einer Vielzahl differierender Zellen exprimiertes, gp130 als Signalüberleitende Kette.¹⁰⁰ Mit Bindung

an den transmembranären oder den löslichen Rezeptor wird die Homodimerisierung von gp 130 sowie eine nachfolgende Signalkaskadenaktivierung induziert.¹⁰¹ Die Mannigfaltigkeit der IL-6-induzierten Effekte beruht dabei auf der Vielzahl gp130 exprimierender Zellen¹⁰². Freigesetzt wird IL-6 von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und endothelialen sowie epithelialen Zellen.¹⁰³ Verschiedene Faktoren regulieren jedoch zunächst das Schicksal der IL-6-mRNA im transkriptionellen oder post-transkriptionellem Stadium.⁹⁵

1.5.1 Interleukin-6 und das Gerinnungssystem

IL-6 induziert beispielsweise an der Oberfläche von Monozyten TF.¹⁰⁴ Wie beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.1) führt dieser durch die Initiierung der extrinsischen Gerinnungskaskade mittelbar zur Generierung von Thrombin, sodass die Formierung eines Fibrinclots möglich wird.¹⁰⁵ In der humanen Anwendung wurde gezeigt, dass die Applikation von rekombinantem IL-6 die Koagulation durch einen Anstieg der Thrombin-Antithrombin III-Komplexe und der Prothrombin-Aktivierungsfragmente F 1+2 stimuliert.¹⁰⁶ In Wechselwirkung induzieren wiederum die Koagulationsfaktoren IL-6. So führte die Applikation von rekombinantem Faktor VIIa zu einem Anstieg von IL-6 im Blutplasma gesunder Probanden.¹⁰⁷ Daneben ist eine Erhöhung der Fibrinogenkonzentration, ein Anstieg der Thrombozytenzahl sowie eine Förderung der Koagulation im Zusammenhang mit IL-6 beschrieben.^{108,109}

1.5.2 Interleukin-6 in der Niere

Bekannt ist zudem, dass IL-6 durch mesangiale und Tubulusepithelzellen im renalen Parenchym produziert wird.¹¹⁰ Eine Inhibition ist beispielsweise mittels Glukokortikoiden¹¹¹ und Cyclosporin A¹¹² erreichbar. Ungeachtet dessen ließ sich während der Abstoßung von Transplantatnieren eine erhöhte IL-6-Expression mittels In-situ-Hybridisierung¹¹³, Immunhistochemie^{114,115} sowie einer quantitativen Bestimmung der IL-6-Konzentration in Serum^{116,117} und Urin¹¹⁵ nachweisen.

1.6 Fragestellung

Trotz bahnbrechender Neuerungen insbesondere in der medikamentösen Behandlung von Patienten mit Transplantatnieren zeigen sich nur geringe Veränderungen hinsichtlich des Langzeit-Transplantatüberlebens. Hierbei spielen häufig Autoantikörper und das Auftreten einer Transplantatvaskulopathie eine entscheidende klinische Rolle. Prozesse der intravasculären Koagulation und Inflammation könnten neben immunologisch-vermittelten endothelialen Läsionen wesentlich zur Genese der Antikörper-medierten Vaskulopathie bei Transplantatnierenrejektion beitragen. Während es schon vielfältige Untersuchungen zu mechanistischen Grundlagen dieser Vaskulopathie durch z.B. Antikörper gegen den G-Proteingekoppelten Rezeptor AT₁-R gibt, finden sich noch keine Daten zur Bedeutung und möglichen pathogenetischen Rolle von gegen den G-Protein-gekoppelten Protease-aktivierten Rezeptor-1 gerichteten Antikörpern.

Ziele dieser Arbeit waren es daher, zunächst die physiologischen Mechanismen des PAR-1 in einem Zellkulturmodell mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen zu charakterisieren und nachfolgend die pathologischen Wirkungen der gegen den Protease-aktivierten Rezeptor-1 gerichteten Antikörper mittels Immunglobulineluat von Patienten mit Nierentransplantatrejektion zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

1. Bestimmung des Einflusses des natürlichen PAR-1-Aktivators Thrombin auf die PAR-1-vermittelte Aktivierung der MAPK ERK 1/2 und AKT als Komponenten intrazellulärer Signaltransduktion, sowie des mTOR (engl. *mechanistic target of rapamycin*)-Signalweges.
2. Bestimmung des Einflusses isolierter PAR-1-Antikörper auf die G-Proteingekoppelten PAR-1-vermittelten Wirkungen hinsichtlich der MAPK ERK 1/2, AKT, sowie des mTOR- Signalweges
3. Überprüfung der Rezeptorspezifität der gezeigten Wirkungen mittels spezifischer Blocker
4. Untersuchung der Wirkung isolierter PAR-1-Antikörper auf die endotheliale Inflammation mittels Messung der IL-6-Induktion

2. MATERIAL und METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Zelllinie

Tabelle 2.1: Zelllinie. Aufgeführt ist die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie sowie deren Bezug

Zelllinie	Bezug
HMEC-1	Prof. Dr. Gabriela Riemekasten

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2.2: Chemikalien. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Chemikalien sowie deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAA
Acrylamid 37,5:1 Rotiphorese® Gel	Carl Roth
Albumin Fraktion V, BSA	Carl Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich
BICIN	Carl Roth
Bis-Tris	AppliChem
Ethanol (absolut)	Carl Roth
Ethanol (MEK, vergällt)	Herbeta Arzneimittel
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD
FACS Rinse	BD
Magermilchpulver	AppliChem
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem
Natriumazid	Sigma-Aldrich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
Natriumfluorid	Fluka
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific
Ponceau Red S	Carl Roth
Proteinmarker	AppliChem
Salzsäure (37%), rauchend	Carl Roth
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific
β-Glycerophosphat	AppliChem
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tris	Carl Roth

Trypanblau	Sigma-Aldrich
Tween 20	Applichem

2.1.3 Reagenzien

Tabelle 2.3: Reagenzien. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten, zum unmittelbaren Gebrauch anwendbare Fertigreagenzien sowie deren Hersteller

Reagenz	Hersteller
DC™ Protein Assay	Biorad
FACS Clean	BD
FACS Flow	BD
FACS Rinse	BD
IL-6 ELISA	Invitrogen
PCR Mycoplasma Test Kit	Applichem
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific

2.1.4 Lösungen

Tabelle 2.4: Lösungen. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten, selbst hergestellten Lösungen sowie deren Rezeptur

Lösung	Rezeptur
Kulturmedium	500 ml Endothelbasalmedium; 5 % FCS; 10 nM Hydrocortison; 5 ml Penicillin/Streptomycin (Penicillin 10000 Units/ml, Streptomycin 10 mg/ml); 5 ml L-Glutamin 200 mM; 10 ng/ml hEGF
reduziertes Kulturmedium	500 ml Endothelbasalmedium; 0,5 % FCS; 5 ml Penicillin/Streptomycin (Penicillin 10000 Units/ml, Streptomycin 10 mg/ml); 5 ml L-Glutamin 200 mM
1 x Elektrophoresepuffer MOPS	50 mM MOPS; 50 mM Tris; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 % SDS; pH 7,7
3,5 x Gelpuffer	1,25 M Bis-Tris; pH 6,5-6,8 mit HCl
5 x Laemmli-Puffer	250 mM Tris-HCl pH 7,5; 500 mM DTT; 10 % (w/v) SDS; 0,5 % (w/v) Bromphenolblau; 35 % (v/v) Glycerol; ad 50ml Aqua bidest
Lysepuffer mit Protease-Inhibitor	100 mM Tris pH 8,0; 0,2 % SDS; 1 % Triton X 100; ad 100 ml Aqua bidest, anschließend 1:1 mit Aqua bidest, je 10 µl 100x Complete with EDTA, 100 mM Natriumorthovanadat, 1 M β-Glycerophosphate; 500 mM Natriumfluorid; 0,1 M Natri-

	umphyrophosphate
10 x PBS	2 g KCL, 2 g KH ₂ PO ₄ , 80 g NaCl, 14,2 g Na ₂ HPO ₄ x2H ₂ O ad 1000 ml Aqua bidest, pH 7,4
Stripping-Puffer	25 mM Glycin; 3,5 mM SDS; pH 2 mit HCl
1 x TBS	50 mM Tris, 150 mM NaCl; 0,1 % Tween20; pH 7,6-8,0
1 x Transferpuffer MOPS	25 mM BICIN; 25 mM Bis-Tris; 1 mM EDTA pH 8,0; 10 % Ethanol
1 x Trypsin-EDTA-Lösung	45 ml 1x PBS ohne Mg ²⁺ /Ca ²⁺ ; 50 µl EDTA; 5ml 10xTrypsin
2 x TST Lyse-Puffer	100 mM Tris pH 8,0; 0,2 % SDS; 1 % Triton X 100; ad 100 ml Aqua bidest

2.1.5 Stimulantien

Tabelle 2.5: Stimulantien. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Stimulantien sowie deren Hersteller

Stimulanz	Hersteller
Peptid der 2. extrazelluläre Schleife (QTIQVPGLNITT-CHDVLWETILL-Amid)	Biosyntan
BMS-200261 (PAR-1-Antagonist)	Sigma-Aldrich
PD184352 (ERK 1/2-Inhibitor)	Sigma-Aldrich
Lepirudin (Refludan [®])	von der Klinik bereitgestellt
Pertussistoxin	Enzolife
Thrombin	Sigma-Aldrich

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.6: Primäre Antikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper mit Hersteller sowie deren Anwendung

Antigen	Antikörpername	Spezies	Hersteller	Anwendung
AKT	Akt Antibody	Kaninchen	CST 9272	1:1000
α-Tubulin	Monoclonal Anti-α-Tubulin antibody produced in mouse	Maus	Sigma T9026	1:25000
ERK 1/2, p44/42 MAPK	p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	Kaninchen	CST 9102	1:1000
p70S6K	p70 S6 Kinase Antibody	Kaninchen	CST 9202	1:1000
phospho-AKT ^{S473}	Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP [®] Rabbit mAb	Kaninchen	CST 4060S	1:1000
phospho-ERK1/2 ^{T202/Y204}	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)	Kaninchen	CST 4370S	1:1000

phospho- p70S6K ^{T389}	XP [®] Rabbit mAb Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) Antibody	Kanin chen	CST 9205S	1:1000
------------------------------------	--	---------------	--------------	--------

Tabelle 2.7: Sekundärantikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten Sekundärantikörper sowie deren Hersteller

Sekundärantikörper	Hersteller
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Dianova
Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	Dianova

Tabelle 2.8: ELISA-Antikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Antikörper sowie deren Hersteller

ELISA-Antikörper	Hersteller
IL-6 Cytoset Detection Streptavidin-HRP	Invitrogen Invitrogen

Tabelle 2.9: FACS-Antikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten FACS-Antikörper sowie deren Hersteller

FACS-Antikörper	Hersteller
Anti-Thrombin Receptor-PE(SPAN12) IgG1-PE	Immunotech Immunotech

2.1.7 Gel-Zusammensetzung

Tabelle 2.10: MOPS-Bicin-Gelsystem. Aufgeführt ist die Zusammensetzung in dieser Arbeit verwendeter Polyacrylamidgele

Sammelgel	5 %	Trenngel	10 %
H ₂ O	1,0 ml	H ₂ O	2,9 ml
30 %- AA- Mix	350 µl	30 %- AA- Mix	2,7 ml
3,5 x Gelpuffer	600 µl	3,5 x Gelpuffer	2,3 ml
10 % APS	30 µl	10 % APS	100 µl
TEMED	5 µl	TEMED	10 µl
Volumen	2 ml	Volumen	8 ml

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.11: Verbrauchsmaterialien. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Affinitätschromatographie-Säulen, HiTrap™ Protein G HP	GE Healthcare
Aluminiumfolie	Carl Roth
Einmalskalpell (steril)	Feather (Japan)
Gefrierreaktionsgefäße 1,0 ml	Sarstedt
Gefrierreaktionsgefäße 1,6 ml	Sarstedt
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Pasteurpipetten	Brand
Pipettenspitzen 0,5-10 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 10-200 µl	Sarstedt
Pipettenspitzen 10-200 µl	Carl Roth
Pipettenspitzen 200-1000 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml	Sarstedt
serologische Pipetten 5 ml (steril)	Becton Dickinson Labware
serologische Pipetten 10 ml (steril)	Becton Dickinson Labware
serologische Pipetten 25 ml (steril)	Becton Dickinson Labware
Sterilfilter 0,2 µm	Carl Roth
Sterilfilter 0,45 µm	Carl Roth
Transfermembran BioTrace™ NT	Pall Corporation (FL, USA)
Transfermembran (PVDF 0,45 µm)	GE Healthcare (UK)
Transfermembran (PVDF 0,45 µm)	St Cruz
Zellkulturschalen 6 cm	TPP
Zellkulturschalen 75 cm ²	Sarstedt
Zellkulturschalen 175 cm ²	Sarstedt
Zellkulturplatten 6 Loch	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen 15 ml	BectonDickson Labware
Zentrifugenröhrchen 50 ml	BectonDickson Labware

2.1.9 Geräte

Tabelle 2.12: Geräte. Aufgeführt sind alle während der Erstellung dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Geräte sowie deren Hersteller

Geräte	Hersteller	Katalogbezeichnung
Analysenwaagen		
Feinwaage	Ohaus	Discovery DV 214 CM
Laborwaage	Sartorius	Universal U 5000 D
Detektionsgeräte		
Blotdetektionseinheit	Syngene Bio Imaging	G-Box XL 1.4
Durchflusszytometer	Beckton Dickinson	FACS Calibur
Multiplatten Photometer	Multiskan Ascent 354	Thermo Scientific

Heizeinheiten

Inkubator	VWR	Orbital Shaker 2
Heizblock	Grant (UK)	QBD2
Heizmixer	Eppendorf	Thermomixer Comfort 5355
Wasserbad	Unitherm	WA12
Inkubator	Thermo Scientific	HERA cell 240

Heiz- und Magnetrührer

Heizrührer	IKA Labortechnik	RCT basic
Heizrührer	Heidolph	MR3001
Heizrührer	VWR	VMS-A
Magnetrührer	IKA Werke	Mini MR standard

Kombigeräte

Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Comfort „no frost“
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Premium Kombi
Kühl/Gefrierschrank	Liebherr	Profi line (+ 4°C/ -20°C)
Kühl/Gefrierschrank	Bosch	Comfort (+ 4°C/ -20°C)

Tiefkühlgeräte (- 20°C)

Gefrierschrank Siemens	Siemens	„no frost“
Gefrierschrank Liebherr	Liebherr	Premium no frost

Tiefkühlgeräte (- 80°C)

Gefrierschrank	New Brunswick	Ultra Low Freezer
Gefrierschrank	Heraeus	Hera freeze
Gefrierschrank	Thalheimer	Freezer -80 °C

Mischgeräte

Minishaker (Vortexer)	IKA Labortechnik	MS1
Rollmischer	VWR	VWR® Tube Rotator
Rütteltisch	Heidolph	Titramax 100
Schwenktisch	Heidolph	Polymax 1040 T
Taumelrollenmischer	Marienfeld, Karl Hecht	RM 5-40
Vortexer	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Vortexer	VWR	VV 3
Mikroskop	Axiovert CFL	Carl Zeiss

Netzgeräte

Standard	Biometra	PowerPack P25T
Power Source 250 V	VWR	Typ 250 V
Power Source 300 V	VWR	Typ 300 V
Power Supply 2.0P System	BioRad	Modell 200/2.0

Elektrophoresekammer

Proteinelektrophorese	Biometra	Tankblot EcoMaxi
Proteinelektrophorese	BioRad	Mini Protean 4Cell
Transferkammer	BioRas	Transblot Cell

pH-Messung

pH-Elektrode Ag/AgCl	4002-789	VWR
pH-Messgerät	SymbHony SB 70P	VWR

Pipettierhilfen

Einkanalpipetten 0,5-1000	Eppendorf	Research
---------------------------	-----------	----------

µl	Einkanalpipetten 0,5-1000	Brand	Transferpette® S
µl	Einkanalpipetten 0,5-1000	Gilson	pipetMan
µl	Mehrkanalpipette	613-5256	VWR
	Mehrkanalpipette	Transferpette®-8E	Brand
	Pipettierhilfe	Hirschmann	Pipetus Standard
	Pipettierhilfe	NeoMotion D6016	Neolab
	Pipettierhilfe	Roth	AccuJet
Zentrifugen			
	Tischzentrifuge	Heraeus	Thermo Fresco 21
	Primo R	Heraeus	Biofuge 15
	Kühlzentrifuge Mikro200R	Hettich	Typ 2405
	Kühlzentrifuge	Heraeus	Multifuge 1S-R
Sonstiges			
	Glasflaschen	50-2000 ml	Schott
	Messkolben	25-2000 ml	Brandt
	Wasserfilteranlage	Milli-Q UF Plus	Millipore

2.1.10 Software

Tabelle 2.13: Software. Aufgeführt sind alle während der Erstellung dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Softwareprogramme und Onlinesuchmaschinen sowie deren Anbieter bzw. die Web-Adresse

Software	Anbieter
EndNote X9	EndNote, Philadelphia, PA, USA
GraphPad Prism Version 9.0.0	GraphPad Software. Inc., San Diego, USA
GeneTools 4.02	Syngene Bio Imaging, Cambridge, UK
ImageJ 1.43u	http://imagej.net
Microsoft Office (Excel, Word, PowerPoint) 2010	Microsoft Corporation, Redmond, USA
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed ; NCBI - National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
SmartDraw	SmartDraw Software LLC, The Woodlands, Tx, USA
SPSS Statistics 27	IBM, New York, USA

2.2 METHODEN

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Die Durchführung aller im Folgenden dargestellten Versuche erfolgte an humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine mit dem großen T-Antigen des Simian-Virus 40 transfizierte mikrovaskuläre Endothelzelllinie.¹¹⁸ Die hierdurch induzierte Inhibition der Bindung von p53 an DNA¹¹⁹ sowie eine Komplexbildung mit RB1¹²⁰ führt zur Immortalität der Zellen. In einlagigen Zellkulturen erscheint die Morphologie der Zellen typischerweise gleichsam einem Kopfsteinpflastermuster (Jaffé-Monolayer).¹¹⁸ In Phänotypie und funktionellen Eigenschaften gleichen HMEC-1-Zellen physiologischen humanen mikrovaskulären Endothelzellen.¹²¹

2.2.1.1 Kultivierung der mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1

Alle beschriebenen Arbeiten mit der Endothelzelllinie HMEC-1 wurden an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S1 unter Wahrung steriler Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte während der Kultivierung unter standardisierten Bedingungen (37 °C, 5% CO₂, 101,3 kPa).

Die Kultivierung erfolgte mit Kulturmedium in sterilen Polystyrol-Zellkulturflaschen (175 cm²). Um eine Adhäsion der Zellen zu ermöglichen, wurden diese vor dem Einsetzen mit 0,2%iger Gelatine beschichtet. Täglich wurden die HMEC-1-Zellen mit dem Umkehrmikroskop hinsichtlich ihrer Morphologie und Konfluenz inspiziert. Zeigte sich ein Farbumschlag des Kulturmediums von blassrot nach gelb, deutete dies auf eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich infolge einer Anreicherung des Kulturmediums mit Stoffwechselprodukten. Das Kulturmedium wurde ohne enzymatische oder mechanische Lösung des Zellrasens gewechselt. Hatte sich das typische Kopfsteinpflastermuster ausgebildet, wurden die Zellen vereinzelt und umgesetzt. Hierzu wurde das verbrauchte Medium zunächst steril abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit im temperierbaren Wasserbad auf 37 °C erhitzter calcium- und magnesiumfreier phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) einmalig gewaschen. Schließlich wurden die adhärennten Zellen zur enzymatischen Ablösung von der Matrix mit 10 ml ebenso erwärmter Trypsin/EDTA-Lösung vollständig benetzt und für 5 Minuten im Begasungsbrutschrank bei 37 °C inkubiert. Lichtmikroskopisch wurde anschließend das Ablösen der Zellen kontrolliert. Zur Inaktivierung der Enzymwirkung wurde die nun vorhandene Zellsuspension mit 10 ml Kulturmedium versetzt und 3 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden ausschließ-

lich die pelletierten Zellen in auf 37 °C erwärmtem Kulturmedium resuspendiert. Die sich anschließende Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer Vitalitätstestung mit Trypanblau kombiniert. Hierzu wurde resuspendierte Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 versetzt und eine Neubauer-Zählkammer mit dieser befüllt. Grundannahme der Färbung ist, dass die Zellmembran toter Zellen eine erhöhte Permeabilität aufweist und daher für den sauren Farbstoff Trypanblau durchlässig ist.¹²² Das Zytoplasma toter Zellen stellt sich demnach blau dar. Lebende Zellen erscheinen in der Auflichtmikroskopie leuchtend hell. Nach Auszählung der vereinzelt Zellen wurden diese in neue, beschichtete, sterile Kulturgefäße überführt.

Für alle durchgeführten Versuche fanden HMEC-1-Zellen der Passagen 22 bis 29 Anwendung.

Der Ausschluss einer Besiedelung der kultivierten HMEC-1-Zellen mit Mykoplasmen-Spezies wurde mittels PCR unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits in regelmäßigen Abständen durchgeführt.¹²³

2.2.1.2 Subkultivierung der mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1 für Versuche

In Vorbereitung der durchzuführenden Experimente wurden die kultivierten HMEC-1-Zellen, entsprechend dem in Abschnitt 2.2.1.1 beschriebenen Vorgehen, aus einem Zellkulturgefäß mit einer Wachstumsfläche von 175 cm² in Schalen mit einer Wachstumsfläche von 21 cm² oder in 6-Well-Zellkulturplatten mit einer Wachstumsfläche von 8,9 cm² umgesetzt. Anschließend wurden sie für 48 Stunden mit Endothelzellbasalmedium mit 5%igem dialysiertem und hitzeinaktiviertem FCS inkubiert. Nachdem eine 70-80%ige Konfluenz erreicht war, erfolgte ein Mediumwechsel zu reduziertem Kulturmedium ohne enzymatische Lösung des Zellrasens in den Kulturgefäßen. Durch das Fehlen proliferationsfördernder Wachstumsfaktoren sollte ein Proliferationsstillstand der HMEC-1-Zellen erzielt werden.

2.2.2 Patientenmaterial

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten humanen Immunglobuline der Klasse G entstammten an der Charité-Universitätsmedizin Berlin aufgrund der Rejektion ihrer Transplantatnieren in Behandlung befindlicher Patienten. Das schriftliche Einverständnis eines jeden Patienten zur pseudonymisierten Verwendung seiner Daten sowie gewonnenen Plasmas lag vor. Ebenso bestand ein positives Votum der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin (AZ/Nr.:EA2/068/07).

2.2.2.1 Aufreinigung von Immunglobulin G

Das Plasma der teilnehmenden Erkrankten wurde während einer Plasmapherese gewonnen. Von freiwilligen gesunden Probanden (Kontrollgruppe) wurde Serum abgenommen. Nach der Gewinnung wurde das Plasma bzw. Serum aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen erfolgte die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie zur Immunglobulin G- und somit Antikörpergewinnung. Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht auf einer reversiblen, spezifischen Bindung des in Lösung befindlichen Antikörpers an ein Antigen, welches sich als stationärer Ligand auf einer Matrix befindet.¹²⁴

Die Aufreinigung erfolgte über eine mit Protein G beschichtete, kommerziell erhältliche Agarosesäule in vier Schritten. Vorteilhaft ist hierbei die sehr hohe Affinität und Spezifität des Protein G für humane Immunglobuline der Klasse G.¹²⁵

Im ersten Schritt wurde das aufzureinigende Plasma mittels eines Filters der Porengröße 0,45 µm von weiteren Makromolekülen separiert. Anschließend wurde das gefilterte Plasma im Verhältnis 1:1 mit Bindungspuffer eines pH-Wertes von 7,0 versetzt und mit einer kontinuierlichen Flussrate über einen Perfusor auf die mit Bindungspuffer äquilibrierte Affinitätsäule geladen. Es schloss sich ein Waschschriff mit Bindungspuffer zur Entfernung unspezifisch gebundener Komponenten an. Schließlich wurden die über ihren Fc-Teil an das Protein G gebundenen Antikörper durch einen Glycin-basierten Elutionspuffer bei einem pH-Wert von 2,7 manuell aus der Matrix eluiert. Zur Schonung der Antikörperstruktur wurde dem Eluat unverzüglich Neutralisationspuffer zugegeben. Zur Anwendung für weitere Aufreinigungen wurde die Affinitätssäule erneut mit Bindungspuffer äquilibriert.

2.2.2.2 Dialyse der aufgereinigten Immunglobuline G

Das aufgereinigte Antikörper-Eluat wurde im Anschluss an die Affinitätschromatographie in hitzeinaktivierte Dialysemembranen überführt. Zur Angleichung der Nährstoffkonzentration wurden diese in einem sterilen Gefäß mit DMEM low glucose umspült. Die frei flottierenden Dialyseschläuche wurden auf diese Weise für 2 Tage in einem Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt. Das umspülende Medium wurde alle 12 Stunden gewechselt.

2.2.2.3 Bestimmung der Immunglobulin G- und Antikörper-Titer

Die Konzentrationen der im Patienten- bzw. Probandeneluat gelösten Immunglobuline G wurden im Zentrallabor der Charité-Universitätsmedizin Berlin, die Titer der Antikörper ge-

gen den Protease-aktivierten Rezeptor-1 wurden durch die CellTrend GmbH (Luckenwalde, Deutschland) bestimmt.

2.2.3 Stimulation der mikrovaskulären Endothelzellen HMEC-1

Nach 24-stündiger Inkubation im reduzierten Kulturmedium wurden die HMEC-1-Zellen mit verschiedenen Agenzien behandelt. Diese wurden ohne Medienwechsel zugegeben und durch sanftes Schwenken verteilt. Für die Dauer des Experimentes wurden die HMEC-1-Zellen im Begasungsbrutschrank bei 37° C inkubiert.

Mit dem natürlichen PAR-1-Aktivator Thrombin wurden die HMEC-1-Zellen in den Konzentrationen 0,1 Units/ml, 0,5 Units/ml, 1 Unit/ml, 2,5 Units/ml oder 5 Units/ml für 15 Minuten bzw. auch für 5, 10, 20 und 30 Minuten stimuliert. Daneben erfolgten Experimente mit Immunglobulin G-Eluaten gesunder Patienten sowie PAR-1-Antikörper-positiver Eluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion in den Dosierungen 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml oder 2 mg/ml für 3, 5, 8, 10, 15, 20, 30 bzw. 60 Minuten sowie für 3, 6, 12 und 24 Stunden. Zur Bestätigung der Spezifität Thrombin-induzierter Wirkungen wurde HMEC-1-Zellen zwei Stunden vor der Stimulation der direkte Thrombininhibitor Lepirudin in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM zugesetzt. Versuche zur Antagonisierung des PAR-1 mittels BMS-200261 erfolgten mit den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Weiterhin sollte durch den Einsatz des ADP-ribosylierenden Pertussistoxins in den Konzentrationen 5ng/ml, 10ng/ml sowie 50ng/ml die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Transduktion inhibiert werden. Zur Bestätigung der antikörper-induzierten Aktivierung des PAR-1 erfolgten darüber hinaus Versuche mit einer synthetischen Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1, dem QTIQVPGLNITTCHDVLWETILL-Amid. Dieses wurde den HMEC-1-Zellen eine Stunde vor der durchzuführenden Stimulation mit 0,1 µM oder 1 µM zugesetzt. Weiterhin erfolgte die Anwendung von PD184352, einem selektiven MEK-Inhibitor, in den Konzentrationen 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM oder 10 µM für Untersuchungen zur Inhibition des ERK-Signalweges an HMEC-1-Zellen. Als Negativkontrolle wurden das Trägermedium der Stimulationssubstanz bzw. -komponente oder auch hochreines Wasser mitgeführt.

2.2.4 Proteinbiochemische Analyseverfahren

2.2.4.1 Proteinextraktion

Zur Beendigung der Stimulationsexperimente wurde der Mediumüberstand steril abgesaugt. Anschließend wurden die HMEC-1-Zellen in rascher Abfolge mit 1 ml kaltem PBS

umspült und in den Zellkulturgefäßen unverzüglich auf Eis gelagert. Mit einem Zellschaber wurden die HMEC-1-Zellen vom Zellkulturgefäß gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Zur nachfolgenden Separation der Zellen von der Pufferlösung wurden diese bei 4 °C für 3 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer mit Protease-Inhibitoren überführt. Diese dienen der Minimierung der Zerstörung zelleigener Phosphatgruppen sowie der Reduktion der Aktivität von Proteasen. Zur Homogenisierung wurde die Suspension gut gemischt und mehrfach resuspendiert bevor sie für weitere 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Im Anschluß wurde das Lysat erneut bei 14000 rpm und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit membrangebundenen und zytosolischen Proteinen wurde sodann abgenommen und in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.2.4.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unmittelbar nach Extraktion der Proteine unter Anwendung des kommerziell erhältlichen DCTM Protein Assay. Die Quantifizierung der in Lösung befindlichen Gesamtproteinkonzentration erfolgt bei diesem über eine kolorimetrische Messung in Anlehnung an das von Oliver Howe Lowry entwickelte Verfahren¹²⁶. Grundlage bildet zunächst die Reduktion von zweiwertigen Kupferionen (Cu^{2+}) mit den in Lösung befindlichen Proteinen in einem alkalischen Milieu. Nachfolgend kommt es zur Reduktion eines zweiten Reagenz, Folin-Ciocalteau, durch den Kupfer-Protein-Chelatkomplex. In deren Folge entstehen instabile blaue Komplexe. Der Farbumschlag ist dabei in der Hauptsache den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, in geringerem Umfang den Aminosäuren Cystin, Cystein und Histidin zuzuschreiben. Die Absorption der gebildeten Komplexe läßt sich photometrisch zwischen 405 und 750 nm bestimmen.¹²⁷ Zur Bestimmung der unbekanntes Konzentration in Lösung befindlicher Proteine ist bei dieser Methode das Mitführen von Lösungen mit einer bekannten Proteinkonzentration notwendig. Hierzu wurde bei jeder durchgeführten Bestimmung eine aus BSA erstellte Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 0 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml mitgeführt. Jeweils 5 µl der zu bestimmenden Proteinprobe bzw. der mitzuführenden Standardkonzentrationen wurden in eine Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Zur maximalen Annäherung an die tatsächlich in Lösung befindliche Proteinmenge wurde dabei jede Probe bzw. jeder Standard im Duplet aufgetragen. Anschließend wurden 25 µl der vorbereiteten AS-Lösung, bestehend aus im Verhältnis 50:1 miteinander gelösten Reagenz A (alkalische Kupfer(II)-tartrat-Lösung) und Reagenz S, sowie 200 µl Lösung B (Folin-Reagenz) zu jeder Probe bzw. jedem Standard pipettiert. Zur Inkubation wurde die 96-Well-

Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur für 15 Minuten auf einem Schüttler positioniert. Im Anschluss erfolgte die densitometrische Messung bei 690 nm. Anhand der mitgeführten Standardkonzentrationen wurde mittels linearer Regression eine Eichgerade berechnet. Nach Mittelung der Duplikate und anschließender Subtraktion des Hintergrundwertes der Lösungen (Standardkonzentration 0 mg/ml) ließen sich mit Hilfe dieser die unbekanntes Proteinkonzentrationen ermitteln.

2.2.5 Western-Blot

Zur Identifizierung und Quantifizierung spezifischer intrazellulärer Signalkaskadenproteine wurden die generierten Proteinlösungen auf eine Membran übertragen, detektiert und quantifiziert.

2.2.5.1 Probenvorbereitung

Hierzu wurden die vorliegenden Proteinproben mit TST-Puffer zunächst auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt und anschließend mit 5-fachem Laemmli-Puffer im Verhältnis 4:1 versetzt. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat – Bestandteil des TST-Puffers – dient der Auflösung hydrophober Wechselwirkungen in Peptiden, sodass eine Aufrechterhaltung der räumlichen Anordnung von Polypeptidketten in Sekundär-, Tertiär- oder Quartärstruktur nicht möglich ist.¹²⁸ Zudem bewirkt Dithiothreitol (DTT) – Inhaltsstoff des Laemmli-Puffers – eine Reduktion bestehender Disulfidbrückenbindungen in Polypeptiden. Das ergänzende Erhitzen der Proben in einem Thermomixer bei 90°C für 10 Minuten sollte die Auflösung von Wasserstoffbrückenbindungen und somit den Übergang der Peptide in die Primärstruktur sicherstellen. Die Aufbewahrung der vorbereiteten Proteinproben erfolgte bei einer geplanten kurzfristigen Anwendung bei -20 °C, bei längeren Lagerungszeiten bei -80 °C.

2.2.5.2 Auftrennung mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Eigenladung der linearisierten Proteine wird durch das stark negativ geladene Natriumdodecylsulfat überdeckt. In einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse entstehen negativ geladene Natriumdodecylsulfat-Protein-Komplexe. Diese lassen sich in einem elektrischen Feld in ausschließlicher Abhängigkeit von ihrer molekularen Masse auftrennen.¹²⁹

Bei der zur Anwendung gekommenen diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese passierten die Protein-Komplexe zunächst ein 5%iges Sammelgel, im Anschluss ein

10%iges Trenngel. Die Gesamtkonzentration an Acrylamid sowie das Verhältnis der Substanzen Acrylamid und Bisacrylamid bestimmt den Vernetzungsgrad und demnach die regelmäßige Porengröße der zu generierenden Gele. Der geringe Anteil an Acrylamid im Sammelgel bedingt eine große Porenweite. Dies ermöglicht eine schnelle Passage der Protein-Komplexe. Zusammen mit Chloridionen des Sammelgelpuffers, welche als sogenannte Leitonen für die Protein-Komplexe dienen, wird so eine Fokussierung der Proteine im Sammelgel zu einer scharfen Bande bewirkt. Mit Übertritt in das kleinporige Trenngel erfolgt die Auftrennung der Protein-Komplexe in Abhängigkeit ihres molekularen Gewichtes. Eine optimale Auftrennung der zu detektierenden Proteine wird dabei durch die Anpassung des Acrylamidgehalts der Trenngele erreicht.¹³⁰

Tabelle 2.14: Primäre Antikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit detektierten Proteine mit deren Molekulargewicht sowie dem zur Anwendung gekommenen Trenngel

Protein	Molekulargewicht	Trenngel
phospho-p70S6K ^{T389}	73 kDa	10 %
p70S6K	70 kDa	10 %
phospho-AKT ^{S473}	60 kDa	10 %
AKT	60 kDa	10 %
phospho- ERK1/2 ^{T202/Y204}	42, 44 kDa	10 %
ERK1/2, p44/42 MAPK	42-43 kDa	10 %
α -Tubulin	~50 kDa	10 %

Die Polymerisierung des entgasten monomeren Acrylamid mit dem quervernetzenden Reagenz Bisacrylamid wurde durch Zugabe des Radikalbildners Ammoniumpersulfat (APS) eingeleitet. Als Katalysator dieser Reaktion diente 10%iges Tetramethylethyldiamin (TEMED). Zügig wurde die Trenngellösung zwischen zwei eingespannte Glasplatten gegossen. Nach der Polymerisierung wurde die Sammelgellösung mit Kämmen zur Bildung von Ladetaschen aufgeschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Kämmen aus dem Sammelgel entfernt und die weiterhin eingespannten Gele in eine Elektrophoresekammer überführt. Diese wurde mit einfachem Elektrophoresepuffer befüllt. In die gespülten Ladetaschen wurden jeweils 20 μ g der vorbereiteten Proteinproben aufgetragen. Daneben wurde ein vorgefärbter Proteinmarker für einen Bereich zwischen 10 und 245 kDa auf jedem Gel mitgeführt. Unmittelbar vor Beginn der Auftrennung wurde Natriumhydrogensulfit als Antioxidans in den Elektrophoresepuffer zugegeben. Für die Passage im Sammelgel wurde zunächst eine Spannung von 100 V mit 40 mA angelegt. Nach dem Erreichen des Trenngels wurde diese auf bis zu 160 V erhöht. Beendet wurde die Elektrophorese nachdem das im

Laemmli-Puffer als Lauffrontmarker mitgeführte Bromphenolblau das untere Ende des Glases erreicht hatte.

Nicht unmittelbar zur Anwendung gelangte generierte Polyacrylamidgele wurden in feuchtem Milieu bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.5.3 Proteintransfer auf eine Membran (Wet-Blot)

Im folgenden Schritt wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF-) Membran der Porengröße 45 µm transferiert. Diese wurde zunächst in Größe des Trenngels geschnitten und in 100%igem Ethanol aktiviert. Anschließend wurde die PVDF-Membran gemeinsam mit vier vorbereiteten Whatman-Filterpapieren und zwei porösen Schaumstoffschwämmen in einfachem Transferpuffer äquilibriert. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das zwischen Glasplatten befindliche Acrylamidgel entnommen, das Trenngel vom aufgeschichteten Sammelgel separiert und in einfachen Transferpuffer überführt. Zwischen zwei Kunststoffgitter einer Transferkassette wurde der Wet-Blot sandwichartig in der Reihenfolge: Schaumstoffschwamm, zwei Whatman-Filterpapiere, Acrylamid-Gel, PVDF-Membran, zwei Whatman-Filterpapiere und schließlich ein weiterer Schaumstoffschwamm luftblasenfrei zusammengeführt und passgenau eingeklemmt. Mit Ausrichtung des Gels zur Kathode, der PVDF-Membran zur Anode wurde die Transferkassette in die Blotapparatur eingelegt.¹³¹ Der Blottank wurde anschließend bis zum vollständigen Bedecken der Kassette mit einfachem, kaltem Transferpuffer befüllt. Bei 4 °C wurde der Transfer mit 400 mA und 100 V für eine Stunde ausgeführt.

2.2.5.4 Proteindetektion

Zur Überprüfung des erfolgreichen Proteintransfers wurde die PVDF-Membran anschließend bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln mit Ponceau-S reversibel gefärbt.¹³² Nach Bestätigung der Proteinbanden wurde die Membran mehrfach mit destilliertem Aqua gewaschen bis die Proteinbanden erneut nicht mehr sichtbar waren.

Für die geplante Nachweisreaktion der identifizierten spezifischen Signalkaskadenproteine wurden störende, unspezifische Proteinbindestellen mit einer Blockierungslösung aus 1 % Rinderserumalbumin (BSA), 3 % Magermilchpulver und 0,1 % des anionischen Detergens Tween 20 (T) in einfachem TBS abgesättigt. Die Membran wurde hierzu unter kontinuierlichem Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur in die Blockierungslösung eingelegt. Im Anschluss wurde die blockierte Membran mit dem in Trägerlösung befindlichen, antigenspezifischen, unmarkierten primären Antikörper, wie in Tabelle 15 angegeben, in konischen

Zentrifugenröhrchen unter kontinuierlichem Drehen auf einem Taumelrollenmischer über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 2.15: Primäre Antikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper mit deren Anwendung sowie Trägersubstanz

Antigen	Anwendung	Trägersubstanz
phospho-AKT ^{S473}	1:1000	3 % Milchpulver
AKT	1:1000	3 % Milchpulver
phospho- ERK 1/2 ^{T202/Y204}	1:1000	1 % Milchpulver
ERK 1/2, p44/42 MAPK	1:1000	1 % Milchpulver
phospho-p70S6K ^{T389}	1:1000	3 % Milchpulver
p70S6K	1:1000	1,5 % Milchpulver
α-Tubulin	1:25000	3 % Milchpulver, 1 % BSA

Anschließend wurde die Membran zur Entfernung überschüssigen oder nicht-gebundenen primären Antikörpers dreimal bei Raumtemperatur in 0,1%igem TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung mit einem zweiten, dem speziesspezifischen Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten sekundären Antikörper, wie in Tabelle 16 angegeben, unter kontinuierlichem Schwenken für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur.

Tabelle 2.16: Sekundärantikörper. Aufgeführt sind alle in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper mit deren Anwendung sowie Trägersubstanz

Spezies	Anwendung	Trägersubstanz	Antigen
anti-rabbit	1:10000	2 % Milchpulver, 0,1 % TBS-T	phospho-AKT ^{S473}
			AKT
anti-mouse	1:25000	2 % Milchpulver, 0,1 % TBS-T	phospho- ERK 1/2 ^{T202/Y204}
			ERK 1/2, p44/42 MAPK
			phospho-p70S6K ^{T389}
			p70S6K
			α-Tubulin

Abschließend wurde die Membran zur Entfernung überschüssigen oder nicht-gebundenen sekundären Antikörpers ein weiteres Mal dreimal bei Raumtemperatur in 0,1%igem TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen.

Die Visualisierung der indirekt markierten Proteine erfolgte mittels kommerziell erworbener Chemilumineszenz-Reaktionslösungen in der Detektionsbox G-Box XL 1.4. Hierbei kataly-

sierte die mit dem Sekundärantikörper konjugierte HRP die Umsetzung des in Reaktionslösung befindlichen Luminol in Chemilumineszenz. Die Intensität der Chemilumineszenz ist dabei proportional zur Stoffmenge des Meerrettichperoxidase-Konjugates und demnach indirekt ebenso zum primären-Antikörper-Protein-Komplex, sodass eine Quantifizierung des nachzuweisenden Proteines möglich wird. Die Auswertung der detektierten emittierten Chemilumineszenz erfolgte mittels der Software GeneTools 4.02 des Herstellers der Detektionsbox. Alle spezifischen Banden wurden durch Quotientenbildung zu dem Referenzprotein α -Tubulin ins Verhältnis gesetzt, sodass die erhaltenen Werte miteinander vergleichbar waren.

Detektierte Membranen wurden zunächst dreimal bei Raumtemperatur mit 0,1%igem TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie mit im temperierbaren Wasserbad auf 50 °C erhitztem Stripping-Puffer für 30 Minuten unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung der gelösten Antikörper und Nachweisreagenzien wurden die Membranen hiernach erneut dreimal für jeweils 30 Minuten bei Raumtemperatur in 0,1%igem TBS-T gewaschen und in Blockierungslösung für eine neuerliche Antikörpermarkierung und Proteindetektion überführt.

2.2.6 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Quantifizierung der Interleukin-6-Sekretion erfolgte mittels quantitativem Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)^{133,134} unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Kits.

2.2.6.1 Probenvorbereitung

Für Experimente zur Bestimmung der Interleukin-6-Sekretion wurden HMEC-1-Zellen, wie in den Abschnitten 2.2.1.1, 2.2.1.2 sowie 2.2.3 beschrieben, in 6-Well-Zellkulturplatten mit einer Wachstumsfläche von 8,9 cm² umgesetzt, kultiviert und stimuliert. Beendet wurden die Experimente mit der Abnahme von 1 ml Mediumüberstand.

2.2.6.2 Sandwich-ELISA

Grundlage eines jeden ELISA bildet eine enzym-konjugierte Antigen-Antikörper-Interaktion, welche eine quantitative Bestimmung eines in Lösung befindlichen Antigens ermöglicht.¹³⁵⁻¹³⁸ Bei dem vorliegend angewendeten Sandwich-ELISA wird dabei zunächst eine solide Phase mit einem gegen das zu detektierende, spezifische Antigen gerichteten Fängerantikörper beschichtet. Nachfolgend bindet das in Lösung befindliche Antigen zunächst an den

Fängerantikörper, um anschließend von einem zweiten, ebenso antigen-spezifischen und enzym-konjugierten Detektionsantikörper gebunden zu werden. Enzymatisch katalysiert lässt sich ein den so entstandenen Sandwichkomplexen indirekt proportionaler Farbumschlag quantifizieren.

In einem ersten Schritt wurde dem Coating-Puffer der Interleukin-6-Fängerantikörper zugesetzt, sodass eine Antikörperkonzentration von 1 µg/ml vorlag. Eine optimale Einstellung der Antikörperkonzentration ist notwendig, da eine zu gering konzentrierte Beschichtung der soliden Polystyrol-Phase zu fehlerhaften Quantifizierungen bei nur gering konzentrierten zu bestimmenden Antigenen führen kann.¹³⁷ Hingegen kann eine zu hohe Konzentration zur Bildung instabiler Mehrfachkomplexe resultierend in ebenso fehlerhaften Quantifizierungen führen. Jede Kavität einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurde sodann mit 100 µl der Adsorptionslösung beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Überschüssige Coating-Lösung wurde anschließend durch Ausschlagen entfernt sowie durch die einmalige Zugabe von Waschpuffer ausgespült. Nicht-kovalent, im Wesentlichen auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhend, verblieben die Antikörper gebunden an die solide Phase, die Mikrotiterplatte.¹³⁹ Um unspezifisch adsorbierte, freie Proteinbindestellen zu sättigen, wurden 300 µl einfacher Assay-Puffer in jede Kavität gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entfernung überschüssiger Lösung abermals durch Ausschlagen, bevor jeweils 100 µl mitzuführender Standardkonzentrationen bzw. der zu bestimmenden Proben in jede Kavität pipettiert worden. Zur Annäherung an die tatsächlich in Lösung befindliche Interleukin-6-Konzentration wurde dabei jede Probe bzw. jeder Standard im Duplet prozessiert. Die mitzuführenden Standardkonzentrationen waren nach Herstellerangaben mittels einer Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 31,2 pg/ml, 15,6 pg/ml, 7,8 pg/ml, 3,9 pg/ml, 1,9 pg/ml und 0 pg/ml vorbereitet worden. Anschließend wurden 50 µl in Assay-Puffer gelöster Interleukin-6-Detektionsantikörper jeder Kavität zugegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln bei 700 rpm inkubiert. Überschüssige Lösung wurde nach diesem Inkubationsschritt ausgeschüttet, durch Ausschlagen entfernt sowie durch fünfmaliges Waschen mit jeweils 200 µl Waschpuffer ausgewaschen. Anschließend wurden jeder Kavität 50 µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln bei 700 rpm. Die überschüssige Lösung wurde nachfolgend erneut ausgeschüttet, durch Ausschlagen entfernt sowie fünfmal mit je 200 µl Waschpuffer ausgewaschen. 50 µl kolorimetrisch detektierbares 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurden jeder Kavität zugesetzt. Katalysiert wurde die Umset-

zung, ersichtlich an einem blauen Farbumschlag, durch die konjugierte Meerrettichperoxidase. Die Enzymreaktion wurde nach 30-minütigem kontinuierlichen Schütteln mit 700 rpm bei Raumtemperatur durch Zugabe von 50 µl Stopplösung in jede Kavität beendet. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte in einem Photometer die Messung der Absorption bei 450 nm sowie eine Referenzmessung bei 690 nm. Die Referenzwerte wurden hiernach als Hintergrundwert von den Absorptionswerten subtrahiert. Anhand der mitgeführten Standardkonzentrationen wurde mittels linearer Regression eine Eichgerade berechnet. Nach Mittelung der Duplikate und anschließender Subtraktion des Leerwertes der Lösungen (Standardkonzentration 0 pg/ml) ließen sich mit Hilfe dieser die unbekanntes Interleukin-6-Konzentrationen ermitteln.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie wurde die zeitabhängige Aktivierung des PAR-1-Rezeptors untersucht.

2.2.7.1 Probenvorbereitung

Für Experimente zur zeitabhängigen Bestimmung der PAR-1-Rezeptoraktivierung wurden jeweils 300000 HMEC-1-Zellen, wie in den Abschnitten 2.2.1.1, 2.2.1.2 sowie 2.2.3 beschrieben, in Schalen mit einer Wachstumsfläche von 9 cm² umgesetzt, kultiviert und stimuliert. Zur Beendigung der Stimulationsexperimente wurde der Mediumüberstand steril abgesaugt. Anschließend wurden die HMEC-1-Zellen in rascher Abfolge mit 1 ml kaltem PBS gewaschen sowie mit 500 µl EDTA-versetztem PBS umspült und in den Zellkulturgefäßen unverzüglich auf Eis gelagert. Durch Abklopfen und Resuspendieren wurden die HMEC-1-Zellen vom Zellkulturgefäß gelöst, in Reaktionsgefäße überführt und nachfolgend zur Separation der Zellen von der Pufferlösung bei 4 °C für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 50 µl mit EDTA und 1%igem BSA versetztes PBS aufgenommen. Durch Zugabe von 20 µl mit Phycoerythrin (PE)-konjugiertem SPAN12-Antikörper zu einer jeden zu analysierenden Probe erfolgte die direkte Markierung des an der Zelloberfläche lokalisierten, intakten, nicht-geschnittenen PAR-1-Rezeptors. Ebenso wurde jeweils eine Isotypkontrolle, versetzt mit 20 µl PE-konjugiertem IgG1, mitgeführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit je 100 µl PBS gewaschen und in 300 µl EDTA-versetztem PBS resuspendiert.

2.2.7.2 Messung

Das Durchflusszytometer separiert heterogene Zellpopulationen anhand von ihnen gebundener Fluoreszenz.¹⁴⁰ So ist es möglich, Aussagen über Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften aber auch intrazelluläre Eigenschaften¹⁴¹ von Zellen zu treffen. Während einer Messung werden in sehr kurzer Zeit in einem Probenstrom befindliche Zellen mittels eines Laser erfasst.¹⁴² Eine hieraus resultierende Lichtstreuung wird in 2 Ebenen analysiert. Beim sogenannten Vorwärtsstreulicht handelt es sich um nach vorn abgelenkte Strahlen, welche als Maß für die relative Größe der zu untersuchenden Zellen dienen.¹⁴² Im 90 °Winkel abgestrahltes Seitwärtsstreulicht dient hingegen als Maß für die innere Komplexität bzw. Granularität einer Zelle.¹⁴² Daneben werden durch den Laser angeregte Fluoreszenzmoleküle als Licht emittiert und ebenso in analysierbare elektronische Signale umgewandelt.¹⁴³ Eine Differenzierung funktionell divergierender Zellen wird möglich.¹⁴⁴

Vor Beginn einer Messung war eine Kompensation durchzuführen. Hierunter versteht man die Korrektur der Überlappung verschiedener Emissionsspektren aufgrund ihrer weiten Wellenlängenbereiche.¹⁴⁵ Differenziert wurde zwischen den relevanten SPAN12-Antikörpermarkierten Zellen sowie der Isotypkontrolle. Um unspezifische Eigenfluoreszenz der zu untersuchenden Zellen adäquat zu detektieren wurde ein Dot-Plot-Diagramm erstellt, anhand dessen eine Unterscheidung der differenten Zellpopulationen möglich war. Um die zu analysierende Population der SPAN12-markierten Zellen wurde ein Gate¹⁴⁶ gelegt. Die Einstellungen wurden anschließend entsprechend adaptiert. Für die Auswertung der Messungen wurden Histogramm-Plots erstellt. Bei diesen wurde die Intensität des PE-Fluorochroms logarithmisch gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen.

2.3 Graphische Darstellungen

Darstellungen zur exemplarischen Verdeutlichung molekularbiologischer Zusammenhänge wurden mittels SmartDraw und Microsoft Office PowerPoint 2010 erstellt. Verwendet wurden hierbei auch Abbildungen der PowerPoint-Dateien *Arteries_physiology*, *Blood_immunology*, *Receptors_channels* und *Cell_membrane* des Anbieters Servier Medical Art¹⁴⁷.

2.4 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung der Experimente erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 9.0.0. Dargestellt werden die Werte oder auch das arithmetische Mittel unabhängig

voneinander durchgeführter, gleichartiger Experimente sowie deren Standardfehler (SD, engl. *standard deviation*). Die Möglichkeit zur statistischen Beratung am Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin wurde wahrgenommen. Die statistische Analyse der generierten Daten erfolgte unter Anwendung der Software SPSS Statistics 27 mittels Wilcoxon-Mann-Whitney- oder Kruskal-Wallis-Test für nicht parametrische Werte. Grundlage hierfür bildete die Annahme, dass die analysierten Daten keiner Normalverteilung unterliegen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen. War eine Analyse aufgrund einer zu geringen Anzahl an Experimenten nicht durchführbar, wurden die Ergebnisse deskriptiv statistisch beschrieben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Die Charakterisierung molekularer Mechanismen induziert durch den Protease-aktivierten Rezeptor-1-Agonisten Thrombin

Als Grundlage für die zukünftige Untersuchung induzierter Wirkungen spezifischer PAR-1-Antikörper im Kontext von Transplantatnierenrejektionen war es zunächst notwendig, die Wirkungen des natürlichen PAR-1-Aktivators Thrombin zu analysieren.

Um den Kontakt zur angestrebten Zielsubstanz herzustellen und somit zelluläre Funktionen zu ermöglichen, formen Signaltransduktionsmechanismen ein hoch interaktives Netzwerk, welches die Produktion von sogenannten sekundären Botenstoffen, die Aktivierung von Proteinkinasen sowie die subzelluläre Verteilung von Überträger substraten umfasst.¹⁴⁸

Die Aktivierung folgender intrazellulärer Signalkaskadenkomponenten wurde durch die Bestimmung entsprechender Phosphorylierungen durchgeführt:

- der extrazellulär Signal-regulierten Kinasen 1/2 an der Threonin 202/Tyrosin 204-Phosphorylierungsposition (p-ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}),
- AKT an der Serinphosphorylierungsposition 473 (p-AKT^{Ser473}) sowie
- der 70 kDa ribosomalen Protein-S6-Kinase-1 an der Threoninphosphorylierungsposition 389 (p-p70S6K^{Thr389}).

3.1.1 Die Abhängigkeit der Aktivierung der Signaltransduktion von der Thrombinkonzentration

An einer Gesamtzahl von 4 differenten Konzentrationen (0,5 Units/ml, 1 Unit/ml, 2,5 Units/ml, 5 Units/ml) wurde untersucht, welche Konzentration an Thrombin zu einer nachweisbaren Expression der zur Untersuchung identifizierten intrazellulären Komponenten führte.

3.1.1.1 Thrombin erhöht die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} dosisabhängig

ERK 1 (ebenso als p44^{ERK1} benannt) und ERK 2 (ebenso als p42^{ERK2} benannt) sind Substrate des ERK-Signalweges.¹⁴⁹ Nachdem beide eine ausgesprochen hohe Strukturhomologie von 84%¹⁵⁰ besitzen und zunächst angenommen wurde, dass diese miteinander austauschbar¹⁵¹ sind, wird Ihre Aktivität in der Regel gemeinsam, so auch in den Versuchen dieser Arbeit, bestimmt. Der ERK-Signalweg war die erste charakterisierte Signalkaskade

der MAPKs, bestehend aus einer Gruppe funktionell miteinander verbundener Proteinkinasen¹⁴⁹, welche als Schlüsselkomponenten an einer Vielzahl zellulärer Prozesse mitwirken¹⁴⁸. Die sequentielle Aktivierung der Kaskadenkomponenten wird zunächst durch die GTPase Ras ausgelöst, sodass es mittels Raf und schließlich MEK zur Phosphorylierung von ERK im Zytoplasma kommt.^{149,151} Losgelöst von MEK kann ERK sowohl zytoplasmatisch als auch nach Translokation in den Nucleus weitere Substrate oder auch Transkriptionsfaktoren aktivieren.¹⁵⁰

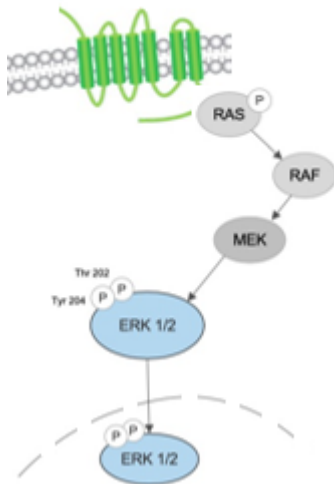


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des ERK-Signalweges [modifiziert nach¹⁵²]

Thrombin stimulierte die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} dosisabhängig. Den ausgeprägtesten signifikanten Effekt auf die Phosphorylierung bewirkte in dieser Versuchsreihe eine Konzentration von 1 Unit Thrombin/ml. Eine höhere Dosis an eingesetztem Thrombin führte nicht zu einer weiteren Steigerung der ERK 1/2-Phosphorylierung.

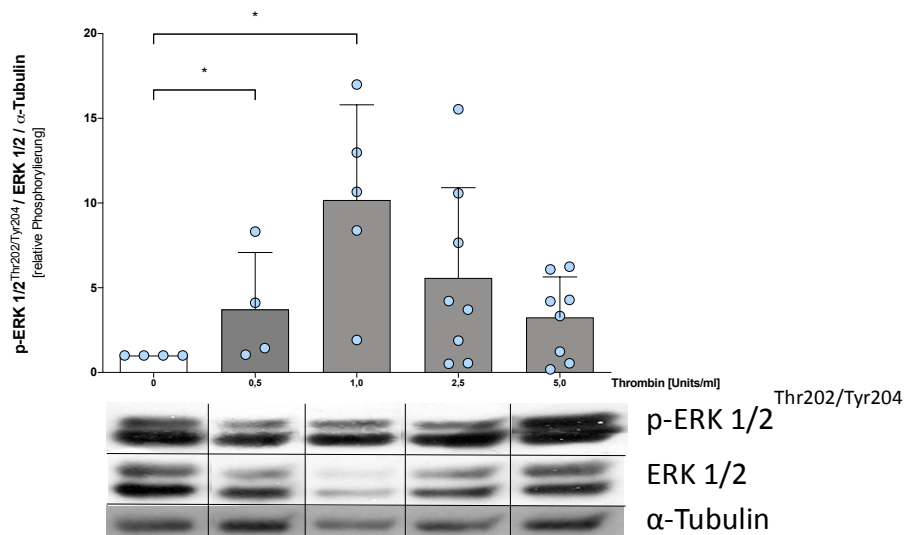


Abbildung 3.2: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit der Dosis. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} als relative Expression zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie nach Stimulation mit 0,5, 1,0, 2,5 sowie 5 Units Thrombin/ml bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=4, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.1.1.2 Thrombin wirkt auf die Phosphorylierung von AKT^{Ser473}

Die ursprünglich als Onkogen identifizierte¹⁵³ Serin-Threonin-Proteinkinase AKT stellt eine der zentralen Effektoren des Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Signalweges dar.¹⁵⁴ Ihre Aktivierung erfolgt in zwei Phasen: Einerseits bezüglich der Pleckstrin-Homologiedomäne (PH)-Domäne am NH₂-terminalen Ende in Assoziation zu PI3K an der Zellmembran¹⁵⁵, andererseits mittels Phosphorylierung der katalytischen Domäne Threonin 308 (AKT^{Thr308}) sowie von Serin 473 (AKT^{Ser473}) in der carboxyterminalen Domäne¹⁵⁶. Infolge der Aktivierung an der Zellmembran lokalisierter PI3K durch beispielsweise auch G-Proteingekoppelte Rezeptoren wird die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol an der 3-Hydroxylgruppe des Inositolringes möglich.¹⁵⁷ Die PH-Domäne AKTs bindet resultierende Phosphatidylinositole mit differierender Präferenz (Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat > Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) >> Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat).¹⁵⁸ Eine hierdurch bedingte Konformationsänderung ermöglicht die Phosphorylierung von Threonin 308 durch die PIP₃-abhängige PDK1 (Phosphoinositid-abhängige Kinase, Pyruvatdehydrogenasekinase 1 oder auch PKB kinase).¹⁵⁸ Erst mit Phosphorylierung von AKT^{Ser473} durch mTORC2 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 2*) wird jedoch die vollumfängliche katalytische Aktivität ermöglicht.¹⁵⁹ Die vollständige Aktivierung schließlich löst Funktionen in einer Vielzahl differierender Substrate, welche an vielfältigen zellulären Prozessen des Metabolismus, der Translation, der Proliferation, des Überlebens und der Angiogenese beteiligt sind, aus.¹⁵³



Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des PI3K-Signalweges bzgl. AKT [modifiziert nach ¹⁵²]

Auch bzgl. der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} deutete sich ein dosisabhängiger Effekt der Wirkung Thrombins an. Dieser zeigte sich in dieser Versuchsreihe am ausgeprägtesten mit einer eingesetzten Konzentration von 5 Units Thrombin/ml. Jedoch war dieser Effekt nicht signifikant.

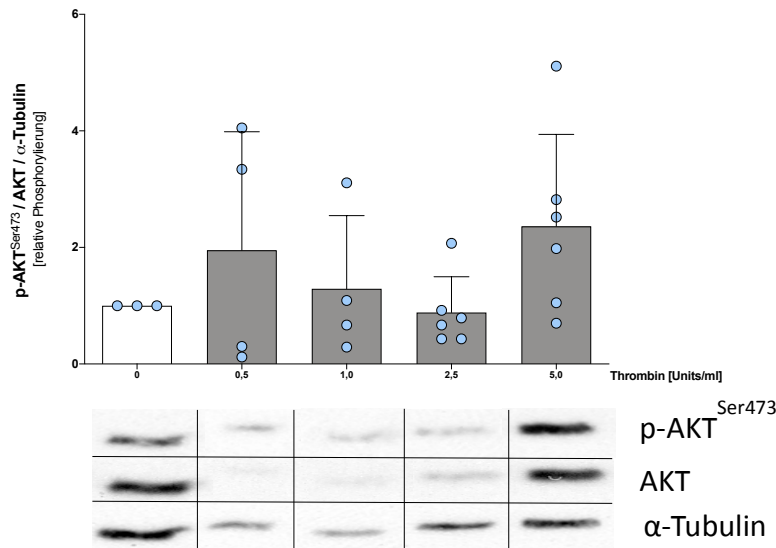


Abbildung 3.4: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit der Dosis. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie nach Stimulation mit 0,5, 1,0, 2,5 sowie 5 Units Thrombin/ml bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=4).

3.1.1.3 Thrombin wirkt auf die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389}

Die p70S6K ist eine Serin-Threonin-Proteinkinase, deren Phosphorylierung sowohl in der wissenschaftlichen als auch klinischen Praxis als Marker der mTORC1 (engl. *mechanistic target of rapamycin complex 1*)-Aktivität dient.^{160,161} Ihre prädominante Form ist dabei ubiquitär exprimiert und nahezu aber nicht ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert.¹⁶⁰ Ähnlich AKT verfügt auch die p70S6K über mehrere Domänen, benannt als katalytische, Verbindungs- und Pseudosubstratdomänen.¹⁶² Auch wird zunächst eine aktivierende Phosphorylierung in diesem Fall des Threonin in Position 229 der katalytischen Domäne notwendig, bevor eine vollumfängliche Kinaseaktivität mit der Phosphorylierung des Threonin der Position 389 (p70S6K^{Thr389}) in der Verbindungsdomäne erreicht wird.¹⁶² Die Positionen von Threonin 421 und Serin 424 (p70S6K^{Thr421/Ser424}) sind in der Pseudosubstratdomäne lokalisiert.¹⁶² S6K1^{Thr389} zeigte sich hoch sensitiv für das fungale Makrolid Rapamycin.¹⁶³ Die Entdeckung von Rapamycin führte schließlich zur Identifizierung des Ziels des Rapamycins (engl. *target of rapamycin* (TOR)) in Hefen und des Ziels des Rapamycins in Säugetieren (engl. *mechanistic target of rapamycin* (mTor)), dem Säugetierhomolog.¹⁶⁴ Heute ist der mTOR-Signalweg als Integrator sowohl intra- als auch extrazellulärer Signale sowie zentraler Regulator des Zellmetabolismus, des Wachstums, der Proliferation und des Überlebens bekannt. Aktiviert in einer Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse führt seine Deregulation zu verschiedenartigen humanen Pathologien.¹⁵²

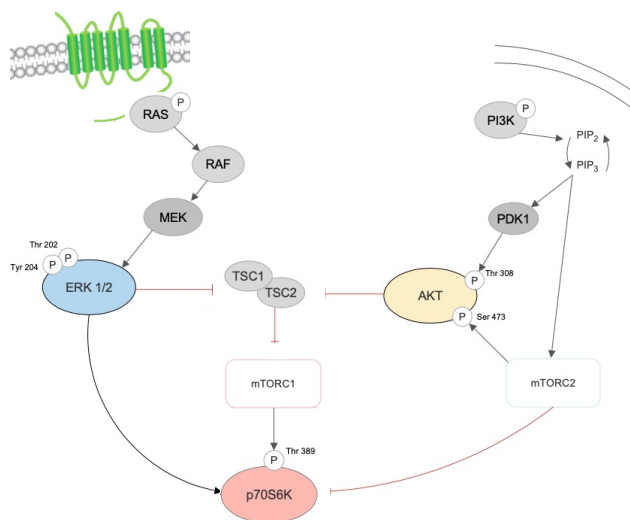


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des mTOR-Signalweges mit p70S6K [modifiziert nach ¹⁵²]

Eine stimulierende Wirkung Thrombins auf die Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} deutete sich in den eingesetzten Dosierungen von 2,5 und 5 Units Thrombin/ml an. Den ausgeprägtesten Effekt auf die Phosphorylierung bewirkte in dieser Versuchsreihe eine Konzentration von 5 Units Thrombin/ml, welcher jedoch keine Signifikanz erreichte.

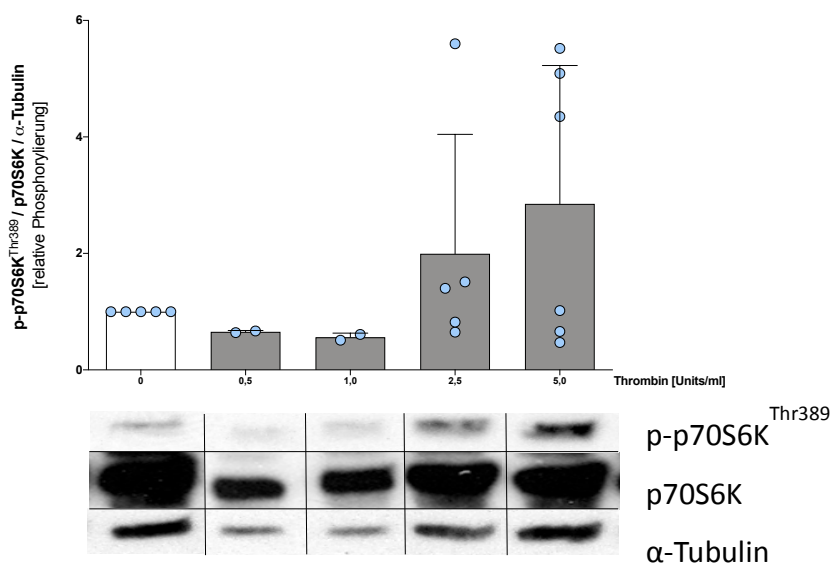


Abbildung 3.6: Analyse der Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit der Dosis. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α - Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie nach Stimulation mit 0,5, 1,0, 2,5 sowie 5 Units Thrombin/ml bestimmt. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=3).

3.1.1.4 Zusammenfassung der dosisabhängigen Wirkung

Zusammenfassend ließen sich in Abhängigkeit der Dosis an eingesetztem Thrombin differierende Effekte hinsichtlich der Phosphorylierung der untersuchten Signalkaskadenkomponenten zeigen. Demonstrieren ließ sich, dass geringere Konzentrationen (0,5 und 1,0

Units Thrombin/ml) zu einer signifikanten Zunahme der Phosphorylierung von p-ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} führten. Hinsichtlich p-AKT^{Ser473} und p-p70S6K^{Thr389} deutete sich ein stimulierender Effekt mit einer vergleichsweise hohen Konzentration (5 Units Thrombin/ml) an. Dieser zeigte sich in der vorliegenden Versuchsreihe jedoch nicht signifikant.

In Übereinstimmung mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe wurde die Stimulation mit Thrombin in einer sehr geringen Konzentration von 0,1 Units/ml sowie in einer demgegenüber vergleichsweise hohen Konzentration von 5 Units/ml ausgewählt, um die gewählten Komponenten der intrazellulären Kaskadenabfolge in allen, im Folgenden dargestellten, Versuchen zu untersuchen.

3.1.2 Die Aktivierung der Signaltransduktion im zeitlichen Verlauf

Aufbauend auf den Ergebnissen der Dosisreihen erfolgten Versuche zur Analyse des zeitlichen Verlaufs Thrombin-induzierter Effekte auf die Phosphorylierung der zu untersuchenden intrazellulären Signalkaskadenkomponenten.

3.1.2.1 Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}

Thrombin stimulierte die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} im zeitlichen Verlauf in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis frühzeitig signifikant mit einem maximalem Anstieg bereits nach 5 Minuten für eine Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml. Hinsichtlich der Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml zeigte sich ein ebenso früher signifikanter Anstieg der Phosphorylierung nach 5 Minuten. Zu den nachfolgenden Zeitpunkten zeigte sich jedoch eine variable Aktivierung, welche zu einer im Mittel signifikanten maximalen Phosphorylierung nach 10 Minuten und nachfolgender Regredienz der Phosphorylierung führte.

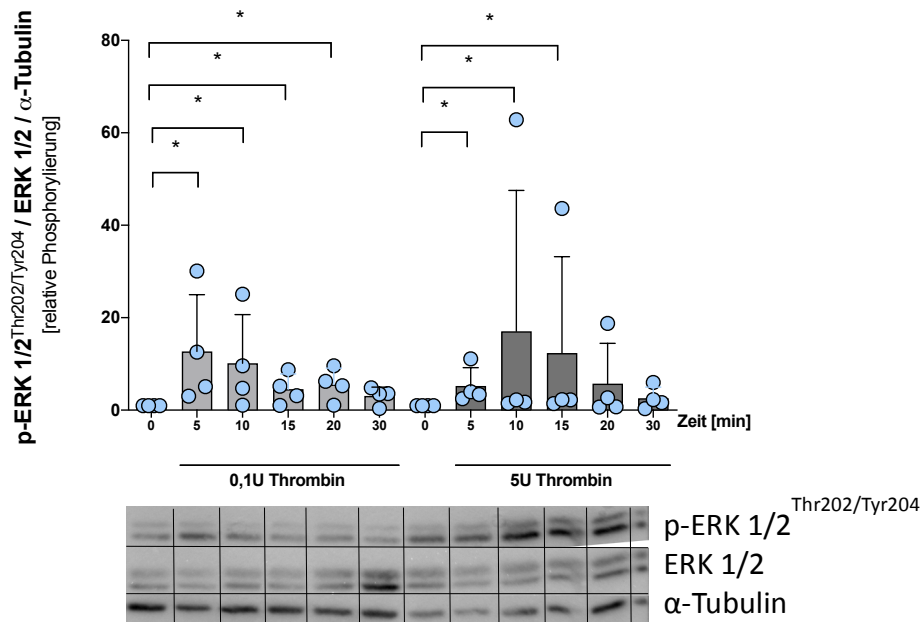


Abbildung 3.7: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit der Dosis im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} als relative Expression zu ERK 1/2 sowie α – Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Stimulation mit 0,1 sowie 5 Units Thrombin/ml bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=4, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.1.2.2 Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung von AKT^{Ser473}

Abhängig von der eingesetzten Dosis an Thrombin zeigte sich ebenso der zeitliche Verlauf der Stimulation der Phosphorylierung von AKT^{Ser473}. Die Stimulation der HMEC-1-Zellen mit einer geringen Konzentration von 0,1 Units Thrombin/ml führte zu einer tendenziell zeitigen Phosphorylierung nach 5 Minuten mit nachfolgender Regredienz der Phosphorylierung bis zum Erreichen des Phosphorylierungsstatus der unstimulierten Kontrolle nach 30 Minuten. Im Gegensatz hierzu deutete sich unter der Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml eine variabelere Aktivierung mit zum Teil protrahierterem Anstieg der Phosphorylierung mit einer im Mittel maximalen Phosphorylierung nach 20 Minuten an. Die gezeigten Effekte erreichten jedoch keine Signifikanz.

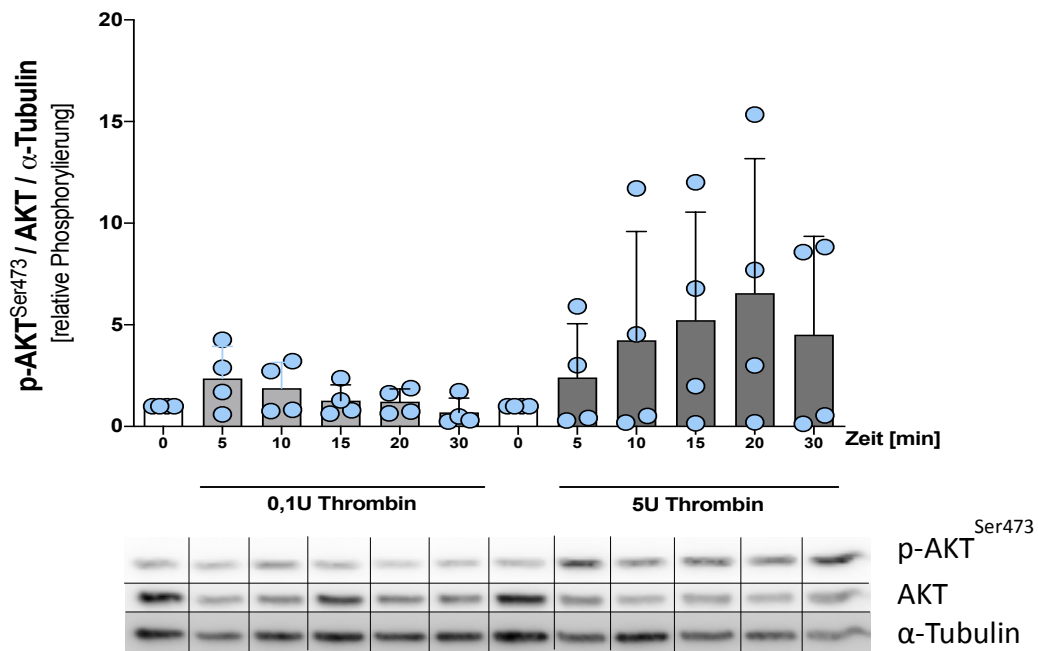


Abbildung 3.8: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit der Dosis im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml sowie mit 5 Units Thrombin/ml bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=4).

3.1.2.3 Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389}

Auch die Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} verlief in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis an Thrombin differierend im zeitlichen Verlauf. Die Stimulation der HMEC-1-Zellen mit 0,1 Units Thrombin/ml führte sowohl nach 5 als auch nach 30 Minuten zu einer Verdoppelung der relativen Phosphorylierung. Bei Stimulation der HMEC-1-Zellen mit 5 Units Thrombin/ml deutete sich eine zeitige maximale Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} nach 5 Minuten mit nachfolgender Regredienz der Phosphorylierung an. Der Phosphorylierungsstatus war auch nach 30 Minuten weiterhin erhöht gegenüber der unstimulierten Kontrolle und wies demnach auf einen Trend zur späteren Phosphorylierung. Jedoch erreichten auch diese Effekte keine Signifikanz.

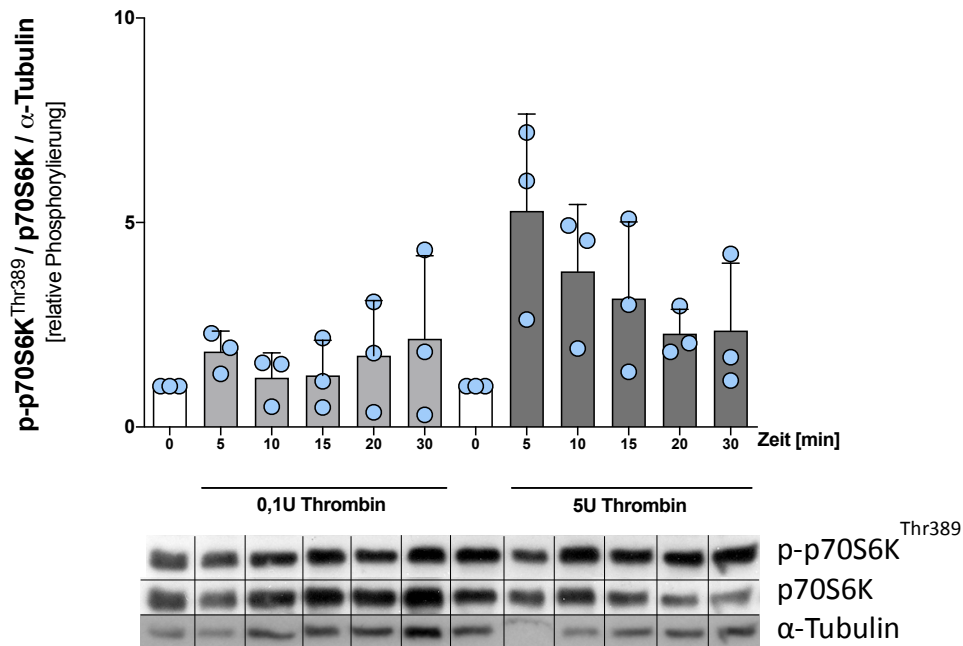


Abbildung 3.9: Analyse der Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} nach Stimulation mit Thrombin in Abhängigkeit der Dosis im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml sowie mit 5 Units Thrombin/ml bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=3).

3.1.2.4 Zusammenfassung der Aktivierung der Signaltransduktion

Zusammenfassend ließ sich ein differierender zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung der untersuchten Signalkaskadenkomponenten zeigen. Demonstrieren ließ sich eine frühzeitige signifikante Aktivierung von p-ERK 1/2 nach 5, 10 und 15 Minuten, auch unter Berücksichtigung der Konzentration an eingesetztem Thrombin. Für p-AKT^{Ser473} und p-p70S6K1^{Thr389} wies der Trend auf eine maximale Phosphorylierung im späteren untersuchten zeitlichen Verlauf nach 20 bzw. 30 Minuten.

3.1.3 Nachweis der Thrombin- sowie PAR-1-Spezifität der induzierten Phosphorylierungseffekte

Die folgenden Versuche dienten der Bestätigung, dass die gezeigten Wirkungen durch den natürlichen Agonisten Thrombin hervorgerufen sowie spezifisch über den PAR-1 vermittelt worden. Alle dargestellten Versuche beziehen sich hierbei auf eine 10-minütige Stimulation der HMEC-1-Zellen mit Thrombin, da diese den Vorergebnissen entsprechend Phosphorylierungseffekte in allen untersuchten Signalkaskadenkomponenten andeutete.

3.1.3.1 Die Wirkung einer direkten Thrombin-Inhibition mit Lepirudin

Zur Bestätigung, dass die Änderungen der Phosphorylierung der untersuchten Signalkaskadenkomponenten in den vorliegenden Versuchen auf Thrombin zurückzuführen waren, erfolgten Experimente mit dem Wirkstoff Lepirudin im Medikament Refludan®.¹⁶⁵ Lepirudin ist ein aus 65 Aminosäuren bestehendes rekombinantes Hirudin zur hochspezifischen bivalenten direkten Inhibition von Thrombin. Durch die bivalente Bindung Lepirudins an die katalytische Region sowie die in unmittelbarer Nähe lokalisierte Exosite 1 entsteht ein irreversibler Komplex, welcher eine Bindung weiterer Substrate an Thrombin und eine infolgedessen bedingte Interaktion unmöglich macht.¹⁶⁶

3.1.3.1.1 Lepirudin wirkt auf die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}

Lepirudin reduzierte die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle in allen eingesetzten Konzentrationen. Mit einer Reduktion um den Faktor 8,7 bzw. 24 gegenüber der nicht inhibierten mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml stimulierten Kontrolle gelang dabei der ausgeprägteste Reduktionseffekt mit der höchsten eingesetzten Konzentration an Lepirudin von 10 µM. Der Effekt war nicht signifikant.

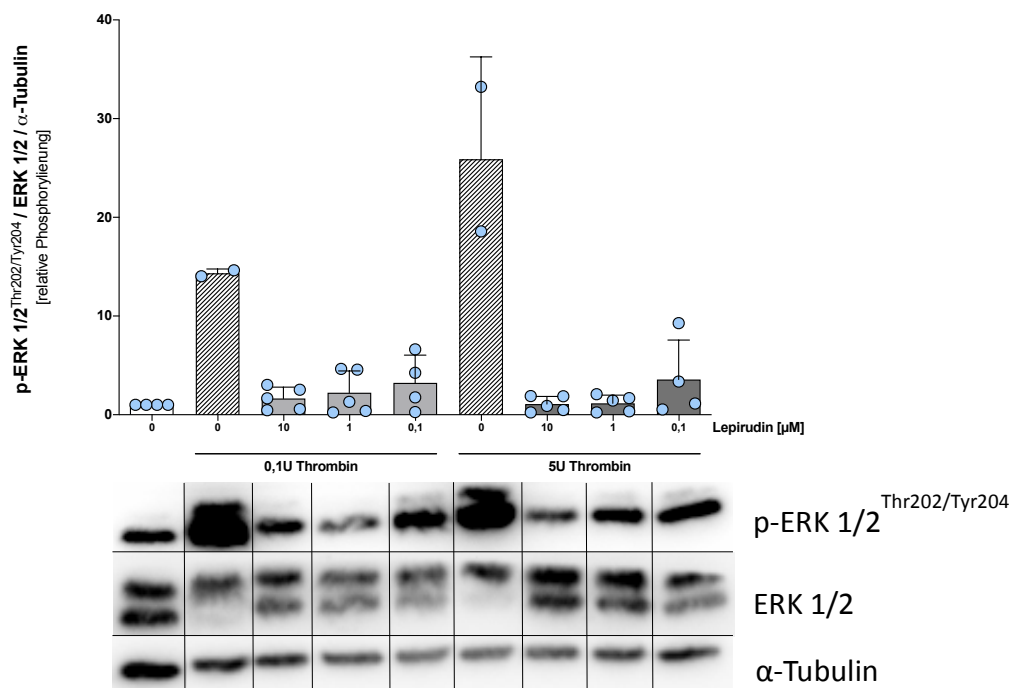


Abbildung 3.10: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inkubation mit dem direkten Thrombininhibitor Lepirudin. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α - Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit Lepirudin in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 µM gemessen. Der Inkubation mit Lepirudin folgte eine 10-minütige Stimulation mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=5).

3.1.3.1.2 Lepirudin wirkt auf die Phosphorylierung von AKT^{Ser473}

Auch bzgl. AKT^{Ser473} deutete sich eine Reduktion der Phosphorylierung gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle bei vorangegangener Inhibition von Thrombin mit Lepirudin in allen eingesetzten Konzentrationen von 10, 1 und 0,1 μM bei einer Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml an. Der Phosphorylierungseffekt von 0,1 Units Thrombin/ml auf AKT^{Ser473} ließ sich durch Lepirudin hingegen nicht reduzieren. Hier zeigte sich vielmehr eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung nach vorheriger Anwendung von Lepirudin. Eine hemmende Wirkung von niedrig-dosiertem Thrombin könnte für diesen Trend ursächlich sein.

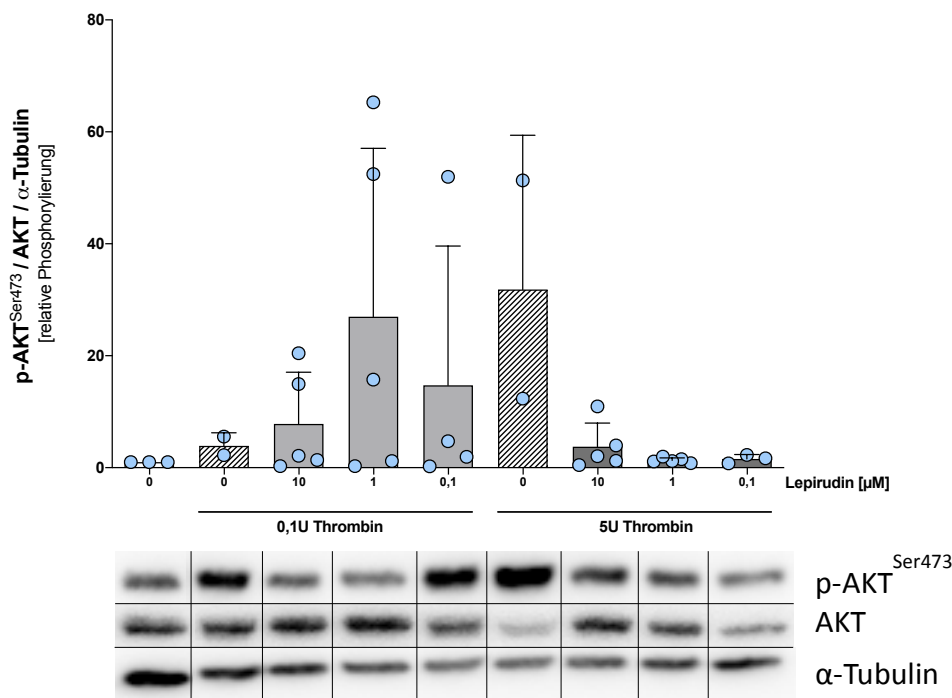


Abbildung 3.11: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Inkubation mit dem direkten Thrombininhibitor Lepirudin. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit Lepirudin in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μM gemessen. Der Inkubation mit Lepirudin folgte eine 10-minütige Stimulation mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=5).

3.1.3.1.3 Lepirudin wirkt auf die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389}

Für p70S6K^{Thr389} deutete sich durch die Vorbehandlung der HMEC-1-Zellen mit Lepirudin ebenso eine Reduktion der Phosphorylierung gegenüber den nicht inhibierten Kontrollen an. Eine sich gleichende Lepirudin-induzierte Reduktion um den Faktor 2,4 bzw. 4,1 gegenüber der nicht inhibierten mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml stimulierten Kontrolle zeigte sich hierbei jedoch für alle eingesetzten Konzentrationen. Die Effekte waren nicht signifikant.

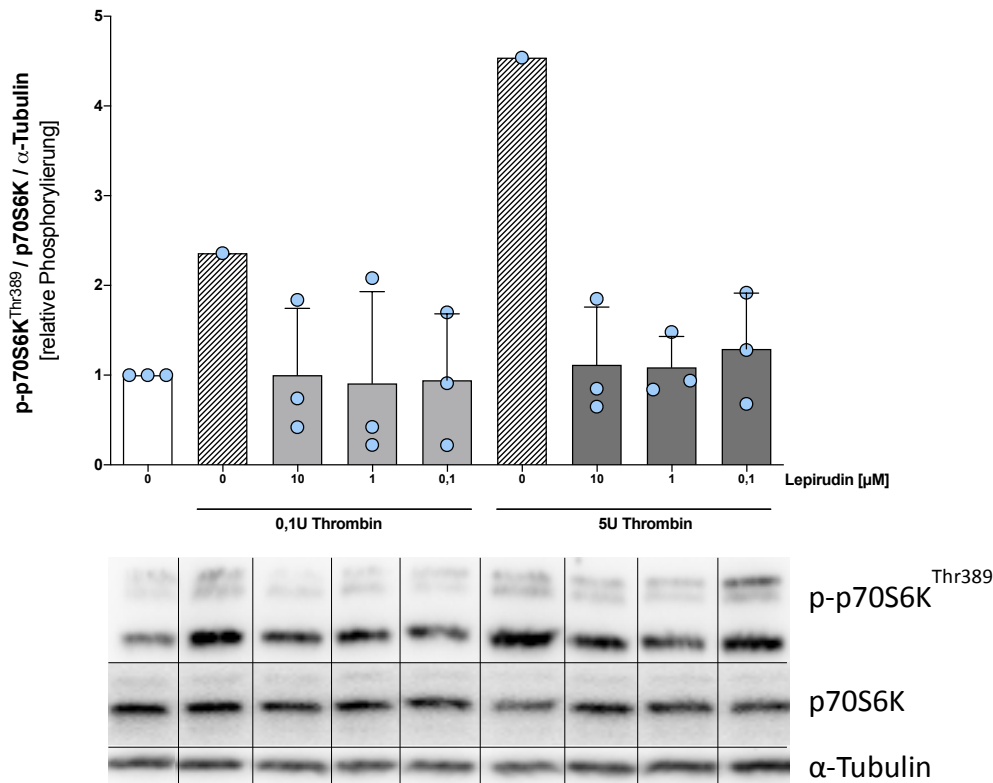


Abbildung 3.12: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Inkubation mit dem direkten Thrombininhibitor Lepirudin. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie zu α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit Lepirudin in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μ M gemessen. Der Inkubation mit Lepirudin folgte eine 10-minütige Stimulation mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=3).

3.1.3.1.4 Zusammenfassung der Wirkung einer direkten Inhibition mit Lepirudin

Tendenziell ließen sich die Wirkungen des Agonisten Thrombin mittels Lepirudin für alle untersuchten Signalkaskadenkomponenten gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle reduzieren. Dosisabhängige Effekte deuteten sich jedoch nur hinsichtlich p-ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} an. Reduzierende Effekte hinsichtlich p-AKT^{Ser473} nach Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml und p-p70S6K^{Thr389} deuteten sich nur unabhängig der eingesetzten Dosis an Lepirudin an.

3.1.3.2 Die Wirkung einer PAR-1-Antagonisierung mit BMS-200261

Zur Bestätigung, dass die gezeigten Wirkungen des natürlichen PAR-1-Aktivators Thrombin PAR-1-mediert erfolgten, wurden Experimente mit Antagonisierung des PAR-1 durchgeführt. Angewendet wurde das trans-cinnamoyl-parafluoro-Phe-paraguanidino-Phe-Leu-Argamid BMS-200261, ein auf der SFLLRN-Ligandensequenz des PAR-1 basierender Peptidantagonist gegen den PAR-1¹⁶⁷, welcher eine stärkere Bindung an den PAR-1 aufweist als die natürliche Ligandensequenz, diesen jedoch nicht aktiviert.

3.1.3.2.1 BMS-200261 wirkt auf die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}

Eine Vorbehandlung mit BMS-200261 in allen eingesetzten Konzentrationen reduzierte den Effekt einer Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml auf die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle. Am wirksamsten zeigte sich hierbei eine Konzentration von 0,1 μM BMS-200261, welche eine Reduktion um den Faktor 5,1 bewirkte. Hinsichtlich einer Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml zeigte sich durch den Einsatz von BMS-200261 ebenso ein tendenziell reduzierender Effekt auf die Phosphorylierung. Mit einer Konzentration von 1 μM BMS-200261 ließ sich eine maximale relative Reduktion um $\approx 35\%$ gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle erreichen. Die Effekte waren nicht signifikant.

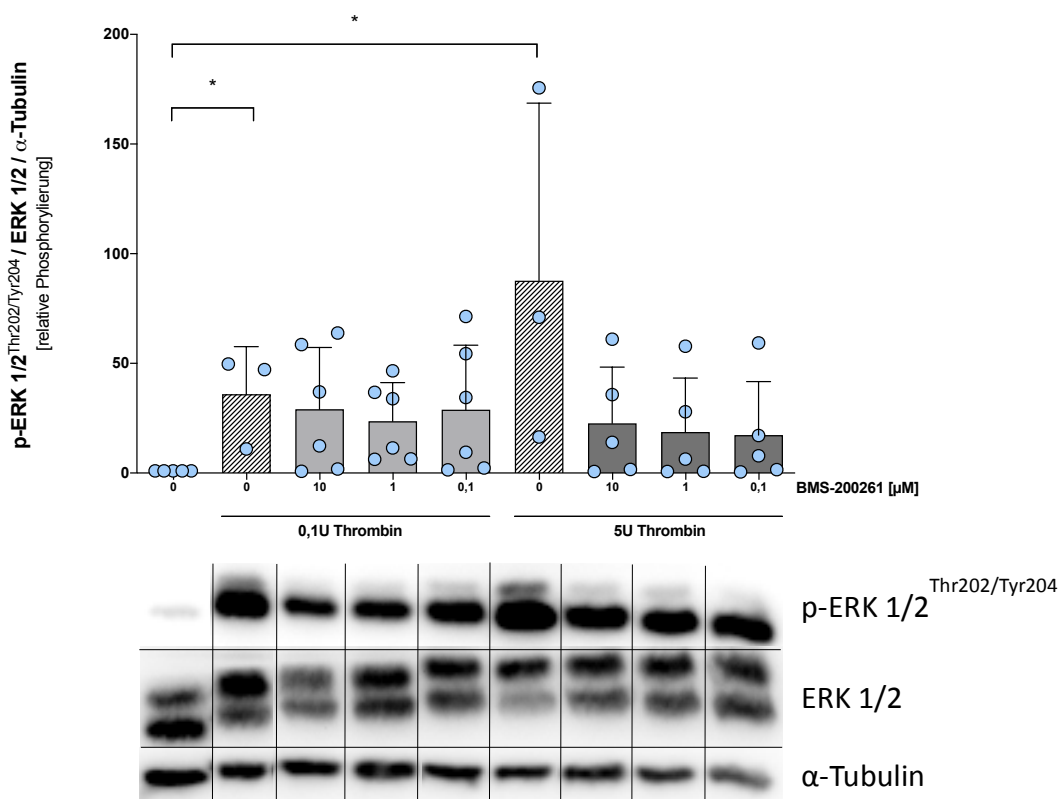


Abbildung 3.13: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inkubation mit dem Antagonisten BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit BMS-200261 in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μM gemessen. Der Inkubation mit BMS-200261 folgte eine 10-minütige Stimulation mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml. Dargestellt sind die Werte \pm SD ($n=6$, $*p<0,05$ vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.1.3.2.2 BMS-200261 wirkt auf die Phosphorylierung von AKT^{Ser473}

Bzgl. AKT^{Ser473} wiederholte sich der differenzielle Effekt der BMS-200261-Antagonisierung ähnlich der Inhibition mittels Lepirudin. Eine vorangegangene Behandlung mit BMS-200261 reduzierte in allen eingesetzten Konzentrationen die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} bei

einer nachfolgenden Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle. Eine maximale reduzierende Wirkung wurde durch 1 μM BMS-200261 um den Faktor 6,8 erzielt. Jedoch führte die BMS-200261-Vorbehandlung mit 10 μM bzw. 1 μM bei nachfolgender Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml erneut zu einer tendenziell erhöhten Phosphorylierung gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle. Ursächlich für diesen Effekt könnte eine hemmende Wirkung von PAR-1 auf die Phosphorylierung von $\text{AKT}^{\text{Ser473}}$ sein. Die Effekte waren nicht signifikant.

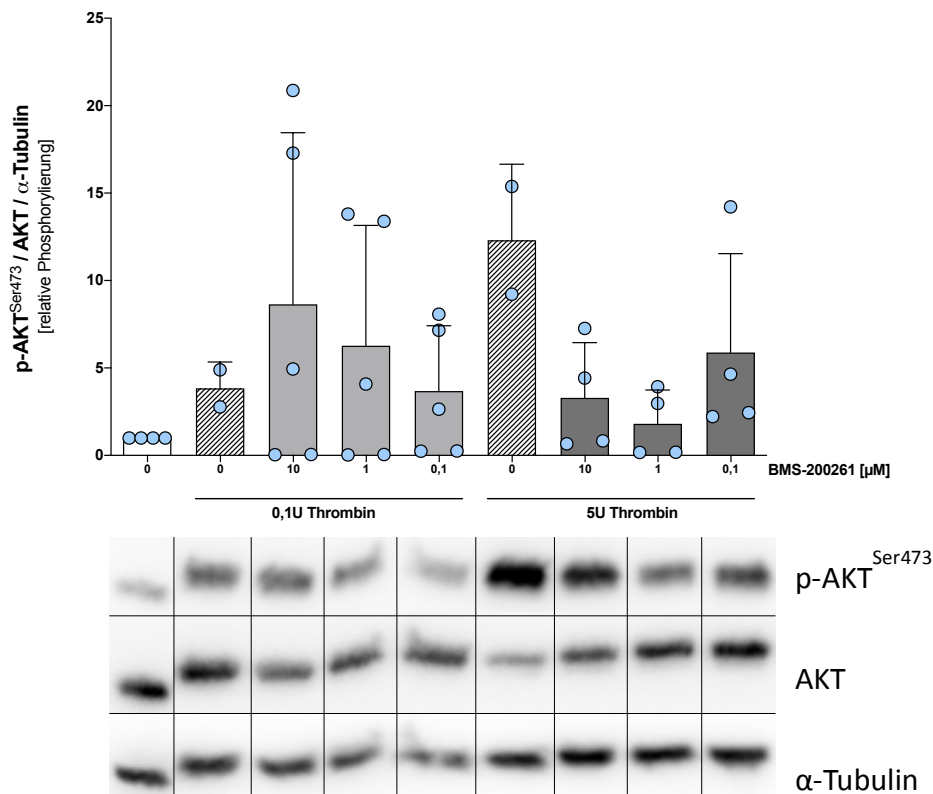


Abbildung 3.14: Analyse der Phosphorylierung von $\text{AKT}^{\text{Ser473}}$ nach Inkubation mit dem Antagonisten BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von $\text{AKT}^{\text{Ser473}}$ normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit BMS-200261 in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μM gemessen. Der Inkubation mit BMS-200261 folgte eine 10-minütige Stimulation mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml. Dargestellt sind die Werte \pm SD ($n=4$).

3.1.3.2.3 BMS-200261 wirkt auf die Phosphorylierung von $\text{p70S6K}^{\text{Thr389}}$

Hinsichtlich der Phosphorylierung von $\text{p70S6K}^{\text{Thr389}}$ bewirkte eine Vorbehandlung mit BMS-200261 eine tendenziell dosisabhängige Reduktion bei nachfolgender Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml. Dieser Reduktionseffekt deutete sich jedoch umgekehrt proportional zur eingesetzten Konzentration an Antagonist an. Das heißt ein maximal reduzierender Effekt um den Faktor 3,2 wurde mit der in diesen Experimenten eingesetzten geringsten Konzentration von 0,1 μM BMS-200261 erreicht. Bzgl. einer Vorbehandlung mit BMS-200261 und

nachfolgender Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml deutete sich ebenso wie bei AKT^{Ser473} eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierung gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle an. Dies könnte ebenso auf eine hemmende Wirkung von PAR-1 hindeuten.

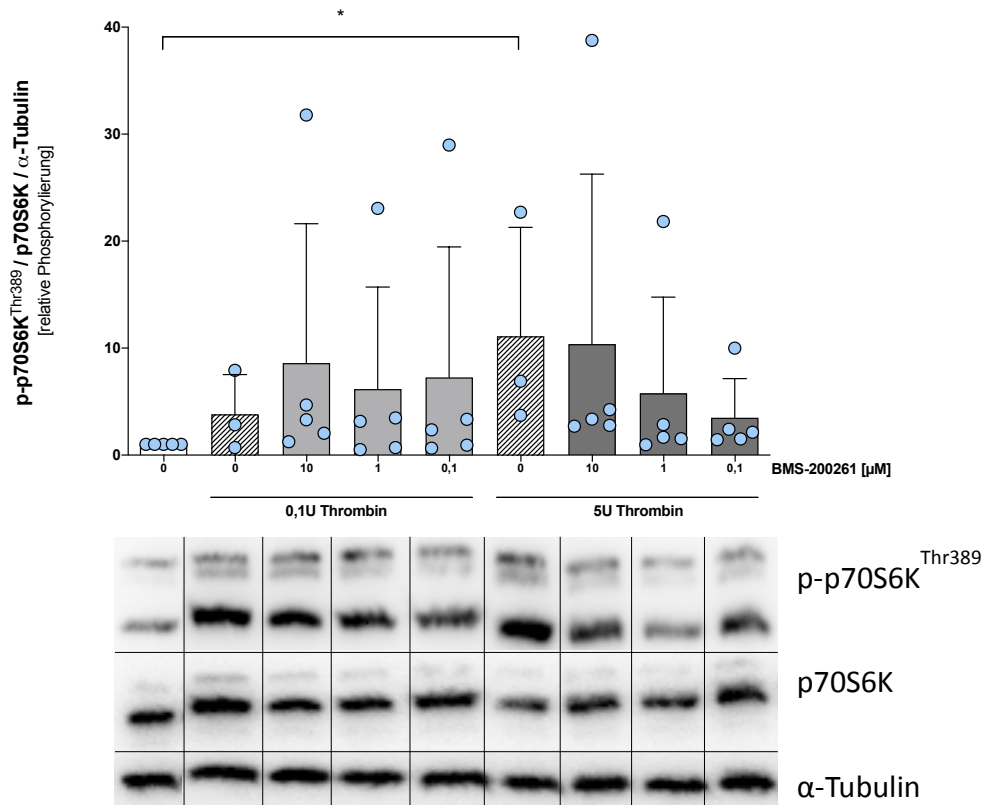


Abbildung 3.15: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Inkubation mit dem Antagonisten BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit BMS-200261 in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μ M gemessen. Der Inkubation mit BMS-200261 folgte eine 10-minütige Stimulation mit 0,1 bzw. 5 Units Thrombin/ml. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=5, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.1.3.2.4 Zusammenfassung der Wirkung einer Antagonisierung mit BMS-200261

Die Wirkungen des PAR-1-Agonisten Thrombin ließen sich mittels BMS-200261 für alle untersuchten intrazellulären Signalkaskadenkomponenten bei nachfolgender Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml reduzieren. Demnach deutete sich an, dass Phosphorylierungseffekte dieser Konzentration an Thrombin auf eine Vermittlung über PAR-1 zurückgeführt werden können. Andeutungsweise ließ sich dies ebenso bei p-ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml nachweisen. Hinsichtlich p-AKT^{Ser473} ließ sich, übereinstimmend mit dem Ergebnis zur Inhibition von Thrombin mittels Lepirudin, nach einer Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung nachweisen. Dieser Effekt ergab sich ebenso hinsichtlich p-p70S6K^{Thr389}.

3.1.4 Der zeitliche Verlauf der Thrombin- sowie PAR-1- spezifischen Inhibition bzw. Antagonisierung der induzierten Phosphorylierungseffekte

Aufbauend auf die vorgenannten Ergebnisse erfolgten Versuche zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Wirkungen der spezifischen direkten Thrombin-Inhibition bzw. einer PAR-1-Antagonisierung auf die Thrombin-induzierten Phosphorylierungseffekte der zu untersuchenden intrazellulären Signalkaskadenkomponenten.

3.1.4.1 Der zeitliche Verlauf hinsichtlich ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}

Thrombin stimulierte die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} in der eingesetzten Dosisierung von 0,1 Units/ml im frühzeitigen Verlauf nach 5 Minuten nicht deutlicher gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Jedoch deutete die Anwendung von Lepirudin [1µM] auch zu diesem Zeitpunkt sowie ebenso zum Zeitpunkt 15 Minuten eine reduzierende Wirkung auf die ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}-Phosphorylierung an. Der Trend zu den Zeitpunkten 20 und 30 Minuten wies auf eine erneut ansteigende Phosphorylierung. In der Gesamtheit zeigte sich jedoch zu allen Zeitpunkten eine deutlich geringere Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber den Versuchen zum zeitlichen Verlauf der Phosphorylierung ohne Anwendung von Lepirudin (siehe Abschnitt 3.1.2.1).

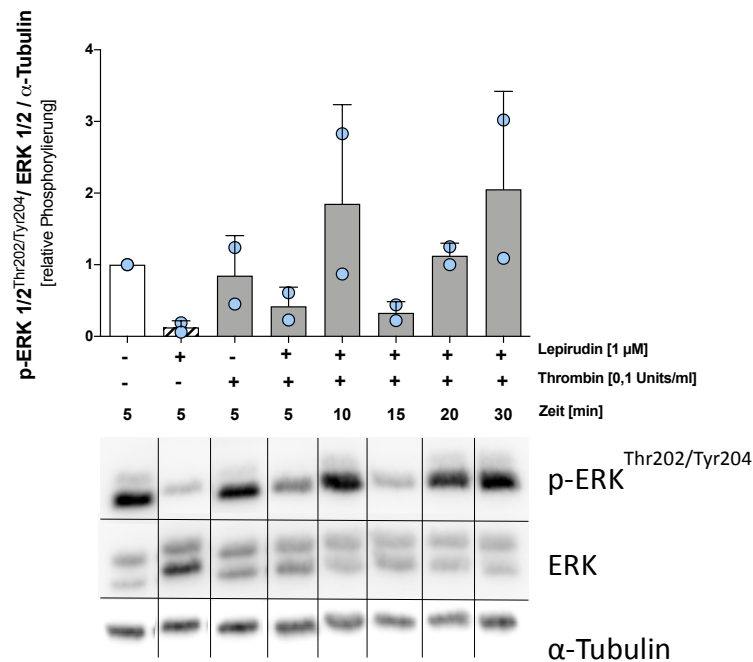


Abbildung 3.16: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inkubation mit dem direkten Thrombininhibitor Lepirudin sowie nachfolgender Stimulation mit Thrombin im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α-Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, inhibierten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit Lepirudin und nachfolgender Stimulation mit Thrombin [0,1 Units/ml] für 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten gemessen. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=2).

Im Versuch zur Darstellung der Wirkung einer Antagonisierung mit BMS-200261 auf die Thrombin-induzierte Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} im zeitlichen Verlauf zeigte sich ein differierender Verlauf. Frühzeitig deutete sich in diesem Versuch eine Zunahme der Phosphorylierung gegenüber der unstimulierten Kontrolle an. Eine der Antagonisierung folgende Stimulation mit Thrombin zeigte jedoch zu allen nachfolgenden Zeitpunkten (10, 15, 20 und 30 Minuten), dass das Phosphorylierungsniveau der nicht antagonisierten Kontrolle tendenziell unterschritten wurde. Der bereits in Abschnitt 3.1.3.2.1 angedeutete reduzierende Effekt von BMS-200261 auf die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} ließ sich demnach erneut darstellen.

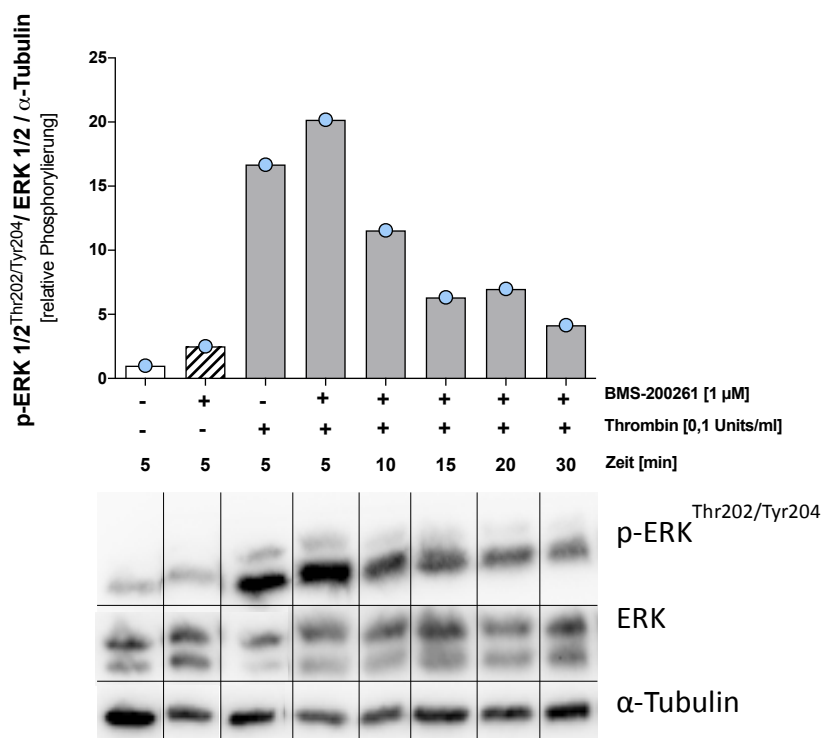


Abbildung 3.17: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inkubation mit dem Antagonisten BMS-200261 sowie nachfolgender Stimulation mit Thrombin im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, antagonisierten und nicht antagonisierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit BMS-200261 und nachfolgender Stimulation mit Thrombin [0,1 Units/ml] für 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten gemessen. Dargestellt ist der Wert eines Experimentes (n = 1).

3.1.4.2 Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung von AKT^{Ser473}

In den vorliegenden Experimenten stimulierte Thrombin die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} in der eingesetzten Dosierung von 0,1 Units/ml im frühzeitigen Verlauf nach 5 Minuten nicht deutlicher gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Jedoch zeigte die vorangegangene

Anwendung von Lepirudin [1µm] mit nachfolgender Thrombinstimulation auch in diesen Versuchen eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} zu den nachfolgenden Zeitpunkten. In der Gesamtheit entspricht der gezeigte Effekt demnach dem Resultat der Experimente zur Anwendung verschiedener Konzentrationen an Lepirudin vor Stimulation mit 0,1 Units/ml Thrombin (siehe Abschnitt 3.1.3.1.2).

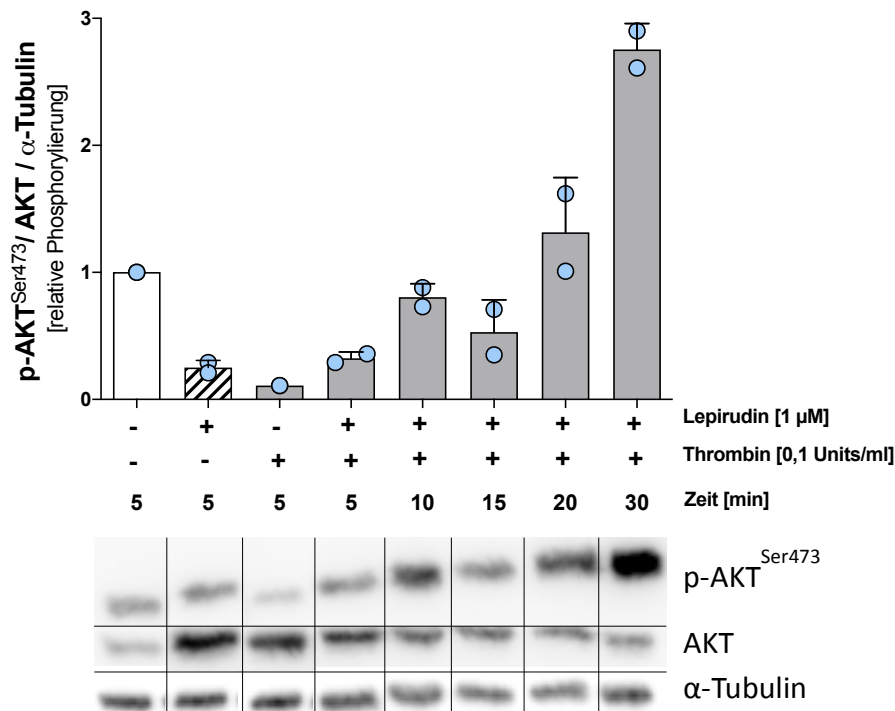


Abbildung 3.18: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Inkubation mit dem direkten Thrombininhibitor Lepirudin sowie nachfolgender Stimulation mit Thrombin im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, inhibierten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit Lepirudin und nachfolgender Stimulation mit Thrombin [0,1 Units/ml] für 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2, *p<0,05 vs. 0, gemäß Kruskal-Wallis-Test besteht ein Unterschied zwischen den Gruppen).

Im Versuch zur Darstellung der Wirkung einer Antagonisierung mit BMS-200261 auf die Thrombin-induzierte Phosphorylierung von AKT^{Ser473} im zeitlichen Verlauf zeigte sich ein gleichsamer Verlauf. Im frühzeitigen Verlauf nach 5 Minuten ließ sich keine deutlichere Phosphorylierung gegenüber der unbehandelten Kontrolle wahrnehmen. Zu späteren Untersuchungszeitpunkten deutete sich jedoch eine Zunahme der Phosphorylierung gegenüber der ausschließlich Thrombin-stimulierten Kontrolle an. In der Gesamtheit entspricht auch dieser gezeigte Effekt demnach dem Resultat der Experimente zur Anwendung verschiedener Konzentrationen an BMS-200261 vor Stimulation mit 0,1 Units/ml Thrombin (siehe Abschnitt 3.1.3.2.2).

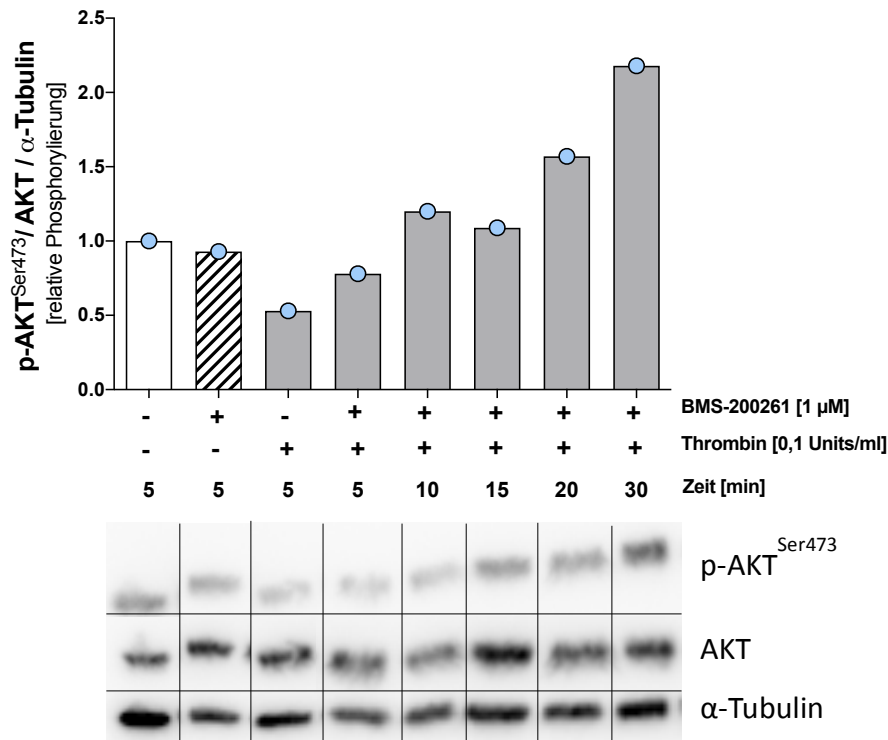


Abbildung 3.19: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Inkubation mit dem Antagonisten BMS-200261 sowie nachfolgender Stimulation mit Thrombin im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, antagonisierten und nicht antagonisierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit BMS-200261 und nachfolgender Stimulation mit Thrombin [0,1 Units/ml] für 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten gemessen. Dargestellt ist der Wert eines Experimentes (n = 1).

3.1.4.3 Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389}

Thrombin stimulierte die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} in der eingesetzten Dosierung von 0,1 Units/ml im frühzeitigen Verlauf nach 5 Minuten in diesen Experimenten ebenso nicht deutlicher gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Auch zu den weiteren Zeitpunkten zeigte die Anwendung von Lepirudin [1μm] vor der Stimulation mit Thrombin ein der unbehandelten Kontrolle vergleichbares Phosphorylierungsniveau. Nach 20 bzw. 30 Minuten zeigte sich der Trend einer steigenden Phosphorylierung.

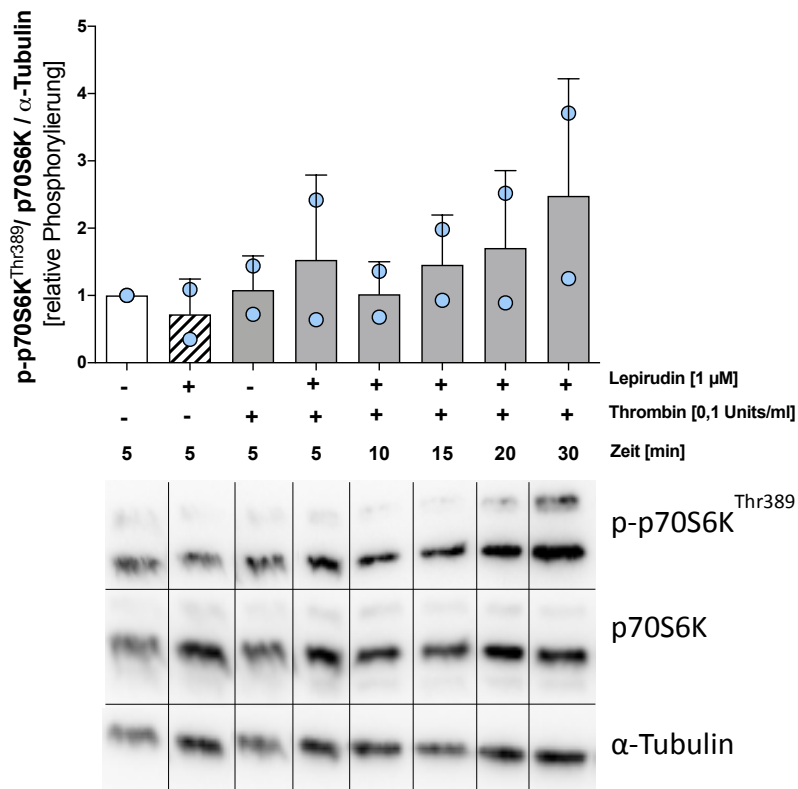


Abbildung 3.20: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Inkubation mit dem direkten Thrombininhibitor Lepirudin sowie nachfolgender Stimulation mit Thrombin im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, inhibierten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit Lepirudin und nachfolgender Stimulation mit Thrombin [0,1 Units/ml] für 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

Im Versuch zur Darstellung der Wirkung einer Antagonisierung mit BMS-200261 auf die Thrombin-induzierte Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung gegenüber der unbehandelten sowie der kurzfristig (5 Minuten) Thrombin-stimulierten Kontrolle bis zum Zeitpunkt von 20 Minuten. In der Gesamtheit entspricht auch dieser gezeigte Effekt demnach dem Resultat der Experimente zur Anwendung verschiedener Konzentrationen an BMS-200261 vor Stimulation mit 0,1 Units/ml Thrombin (siehe Abschnitt 3.1.3.2.3).

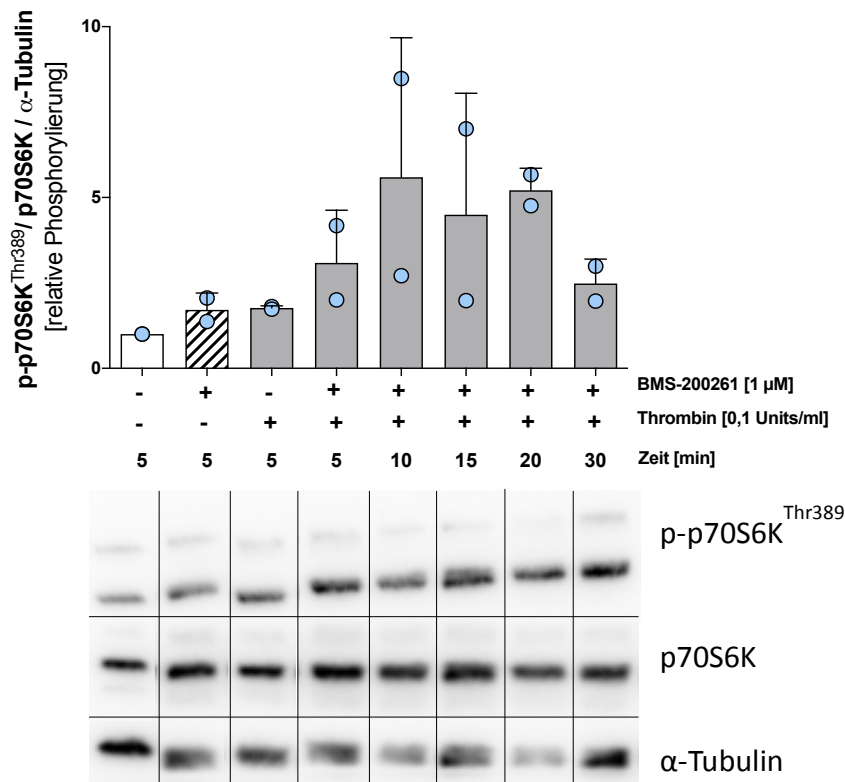


Abbildung 3.21: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Inkubation mit dem Antagonisten BMS-200261 sowie nachfolgender Stimulation mit Thrombin im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, antagonisierten und nicht antagonisierten Kontrollen sowie nach 2-stündiger Inkubation mit BMS-200261 und nachfolgender Stimulation mit Thrombin [0,1 Units/ml] für 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

3.1.4.4 Zusammenfassung der Thrombin- sowie PAR-1- spezifischen Inhibition bzw. Antagonisierung der induzierten Phosphorylierungseffekte auf die Signaltransduktion im zeitlichen Verlauf

Zusammenfassend glichen die Wirkungen einer direkten Thrombin-Inhibition bzw. einer PAR-1-Antagonisierung den Resultaten der Vorversuche auch im zeitlichen Verlauf für alle untersuchten Signalkaskadenkomponenten.

3.2 Die Charakterisierung molekularer Mechanismen induziert durch Antikörper gerichtet gegen den Protease-aktivierten Rezeptor-1

3.2.1 Nachweis von Immunglobulinen G und PAR-1-Antikörpern

In allen aufgearbeiteten Patienten- bzw. Probandeneluaten ließen sich gelöste Immunglobuline G nachweisen. Ebenso ließen sich in den Patientenuelaten Antikörper gegen den Protease-aktivierten Rezeptor-1 bestimmen.

Im Folgenden wurden die Wirkungen gegen den PAR-1 gerichteter Antikörper auf die vor- genannten intrazellulären Signalkaskadenkomponenten untersucht. Hierfür wurden die HMEC-1-Zellen Immunglobulinen gesunder Probanden als auch PAR-1-Antikörper-positiver Patienten mit einer Transplantatnierenrejektion ausgesetzt.

3.2.2 Die Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptor-1 im zeitlichen Verlauf

Untersucht wurde der zeitliche Verlauf der Aktivierung des PAR-1 durch agonistisch wir- kende gegen den PAR-1 gerichtete Antikörper. An einer Gesamtzahl von 4 differentiellen Kon- zentrationen (0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml) wurde zunächst ermittelt, welche Konzentration an Immunglobulineluat zu einer nachweisbaren Aktivierung des PAR-1 führ- te. Anschließend wurden 12 Zeitpunkte (3, 5, 8, 10, 15, 30 Minuten sowie 1, 2, 4, 6, 12, 15 Stunden) hinsichtlich einer nachweislichen PAR-1-Aktivierung analysiert.

Signifikant höher war die Anzahl aktiver PAR-1 nach einer mindestens 10-minütigen Stimu- lation mit Immunglobulinen von Patienten mit Transplantatnierenrejektion im Vergleich zu den kürzeren untersuchten Zeitpunkten.

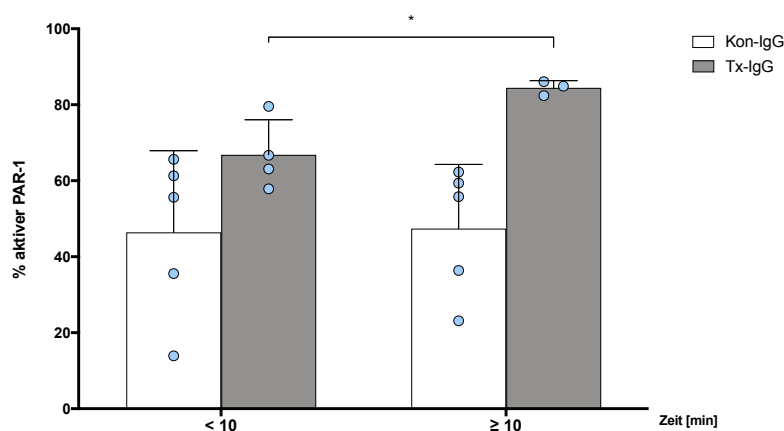


Abbildung 3.22: Analyse der relativen Aktivierung des PAR-1 nach Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die relative Zahl aktivierter PAR-1. Die Zahl inaktiver Rezeptoren wurde für einen Zeitraum < 10 sowie ≥ 10 Minuten nach Stimulation mit Immunglobulinen [1 mg/ml] gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion gemessen. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=5, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.2.3 Die Abhängigkeit der ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}-Aktivierung von der Konzentration an PAR-1-Antikörper-positiven IgG

An einer Gesamtzahl von 4 verschiedenen Konzentrationen (0,5 mg IgG/ml, 1 mg IgG/ml, 1,5 mg IgG/ml, 2 mg IgG/ml) wurde untersucht, welche Konzentration an PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat zu einer nachweisbaren Phosphorylierung der zur Untersuchung identifizierten intrazellulären Komponente ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} führte.

PAR-1-Antikörper-positives Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion erhöhte die Phosphorylierung in einer eingesetzten Konzentration von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 1,5 mg/ml gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Ein hoher Phosphorylierungseffekt wurde für Tx-IgG dabei mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml erzielt. Phosphorylierungseffekte deuteten sich jedoch auch bei einer Stimulation der HMEC-1-Zellen mit IgG gesunder Probanden (Kon-IgG) gegenüber der unbehandelten Kontrolle an. Jedoch waren die Effekte nicht signifikant.

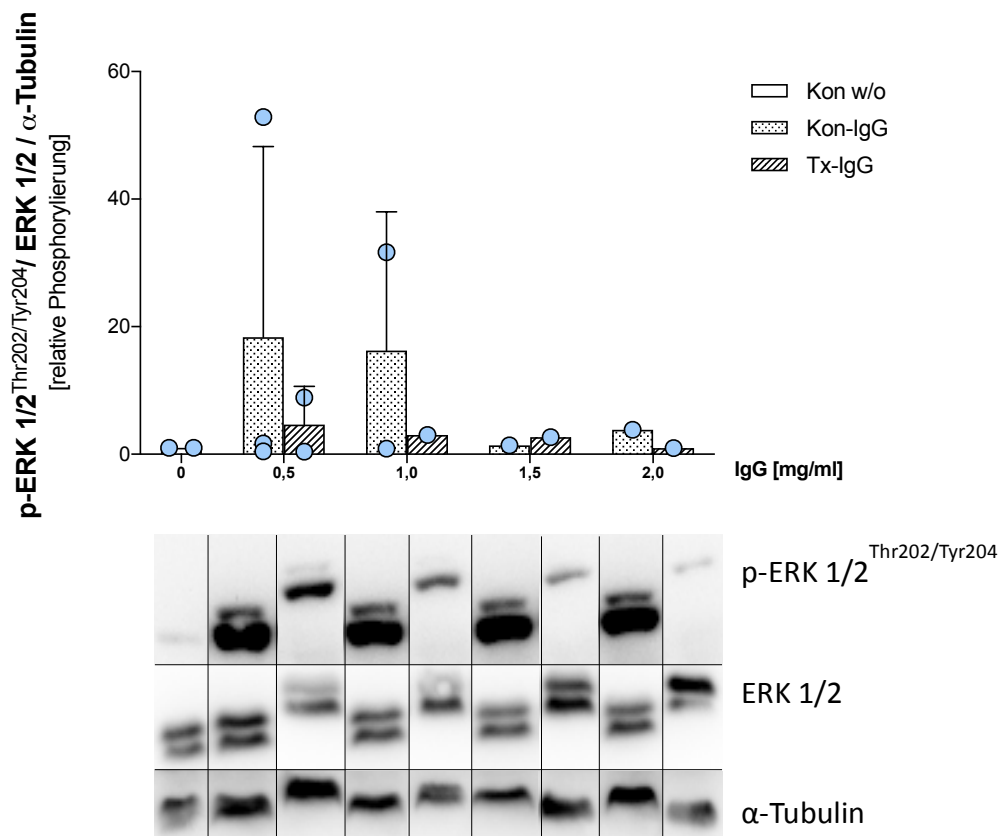


Abbildung 3.23: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) in Abhängigkeit der Dosis. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} als relative Expression zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde nach Stimulation mit 0,5, 1, 1,5 und 2 mg/ml der vorgeannten Immunglobulineluate gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

3.2.4 Die Aktivierung der Signaltransduktion durch PAR-1-Antikörper im zeitlichen Verlauf

Aufbauend auf die Ergebnisse der Dosisreihe erfolgten Versuche zur Analyse des zeitlichen Verlaufs PAR-1-Antikörper-initiiertes Effekte auf die Phosphorylierung der identifizierten intrazellulären Signalkaskadenkomponenten mit 1 mg/ml PAR-1-Antikörper-positivem Immunglobulineluat.

3.2.4.1 Die Wirkung auf ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}

Es zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Stimulation der HMEC-1-Zellen mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulinen mit einem Maximum nach 10 Minuten. Signifikant erhöht zeigte sich die Phosphorylierung nach 5 und 15 Minuten gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Jedoch ließ sich ein deutlicher Anstieg der Phosphorylierung auch nach Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden nach 5, 10 und 15 Minuten gegenüber der unbehandelten Kontrolle verzeichnen.

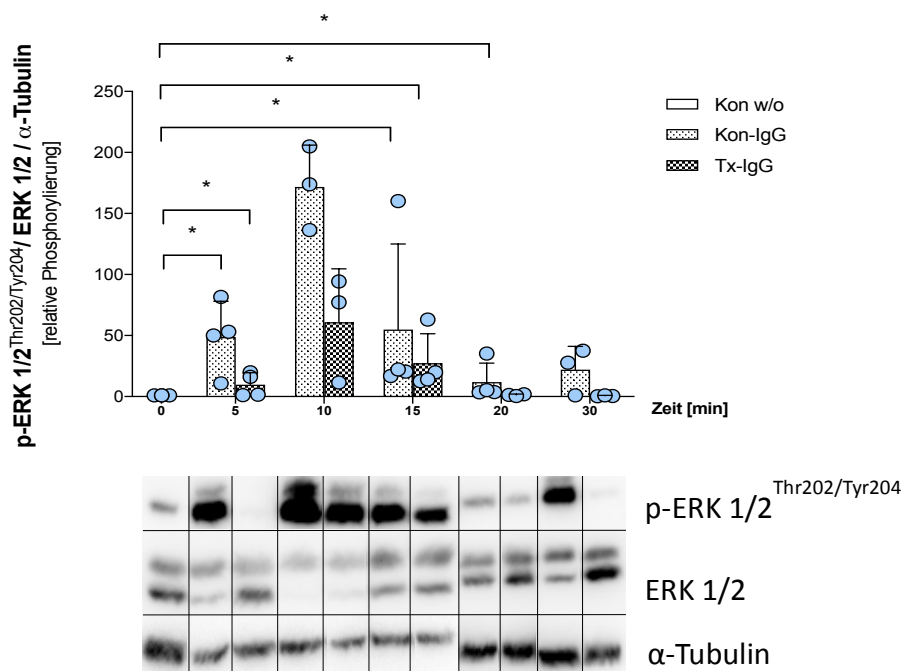


Abbildung 3.24: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Stimulation mit Immunglobulineluat [1 mg/ml] gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=4, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test, *p<0,05 vs. 0, gemäß Kruskal-Wallis-Test besteht ein Unterschied zwischen den Gruppen).

3.2.4.2 Die Wirkung auf AKT^{Ser473}

Bzgl. AKT^{Ser473} führte die Stimulation der HMEC-1-Zellen mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulinen von Patienten mit Transplantatnierenrejektion zu einem Anstieg der Phosphorylierung bzgl. aller untersuchter Zeitpunkte gegenüber der nicht behandelten Kontrolle. Ein maximaler Effekt deutete sich hier nach 30 Minuten an. Jedoch ließ sich ebenso ein Anstieg der Phosphorylierung nach Stimulation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden von 5 über 10 auf 15 Minuten (Maximum) gegenüber nicht behandelten Kontrollen verzeichnen.

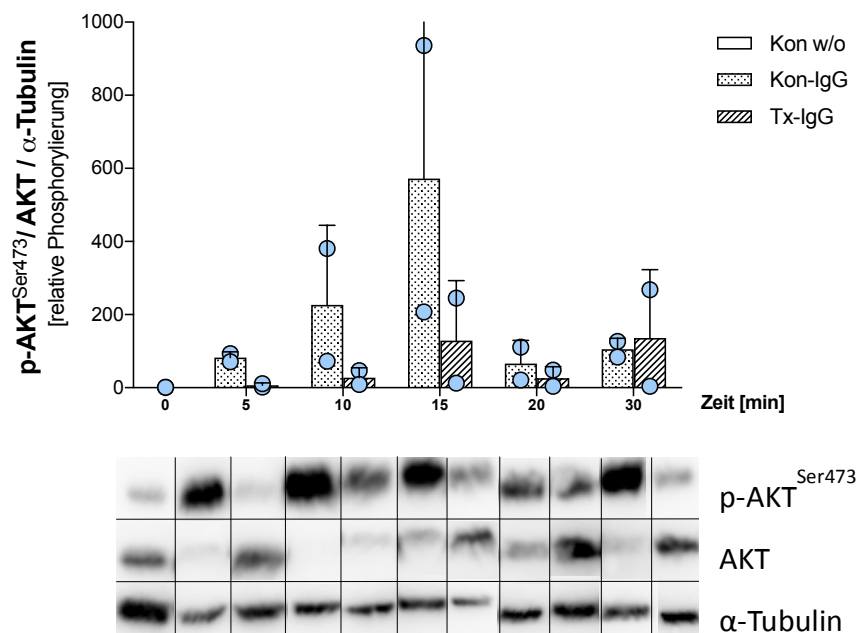


Abbildung 3.25: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Stimulation mit Immunglobulineluaten [1 mg/ml] gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

3.2.4.3 Die Wirkung auf p70S6K^{Thr389}

Hinsichtlich der Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} zeigte sich ein Phosphorylierungsmaximum nach 30 Minuten für die Stimulation der HMEC-1-Zellen mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulinen von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Jedoch wurde dies wiederum ebenso für eine Stimulation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden demonstriert. Die Effekte erreichten keine Signifikanz.

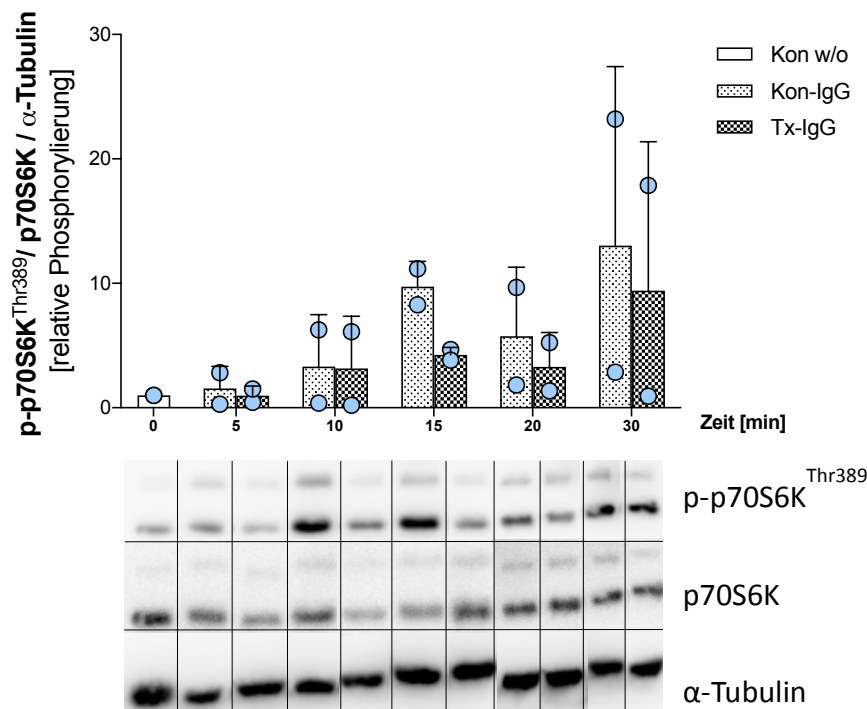


Abbildung 3.26: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) im zeitlichen Verlauf. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p-p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Die Phosphorylierung wurde in unstimulierten Kontrollen sowie 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten nach Stimulation mit Immunglobulineluaten [1 mg/ml] gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion bestimmt. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

3.2.4.4 Zusammenfassung der Wirkung von PAR-1-Antikörpern auf die Aktivierung der Signaltransduktion im zeitlichen Verlauf

Erneut ließen sich frühe maximale Effekte bezüglich der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} mit einem Maximum nach 10 Minuten zeigen. Hinsichtlich p-AKT^{Ser473} und p-p70S6K^{Thr389} bestand in Konkordanz zu den Experimenten mit Thrombin eine erhöhte Phosphorylierung zu den späteren untersuchten Zeitpunkten mit einem Maximum nach 30 Minuten.

3.2.5 Nachweis der PAR-1-Spezifität der induzierten Signalkaskadenaktivierung

Die folgenden Versuche dienten dem Nachweis, dass die gezeigten Wirkungen nicht durch den natürlichen Agonisten Thrombin, sondern PAR-1-vermittelt hervorgerufen worden. Alle dargestellten Versuche beziehen sich hierbei auf eine 15-minütige Stimulation der HMEC-1-Zellen mit Immunglobulineluaten, da zu diesem Zeitpunkt entsprechend den Vorergebnissen Phosphorylierungseffekte bei allen untersuchten Signalkaskadenkomponenten nachweisbar waren.

3.2.5.1 Die Antikörper-Wirkung in Abhängigkeit einer direkten Thrombininhibition

Zur Bestätigung, dass die gezeigten Antikörper-induzierten Wirkungen ohne Einfluss des natürlichen PAR-1-Aktivators Thrombin hervorgerufen worden, untersuchten wir die Auswirkungen einer direkten Inhibition von Thrombin mittels Lepirudin vor Applikation PAR-1-Antikörper-positiver Tx-Immunglobulineluate.

3.2.5.1.1 Lepirudin reduziert die PAR-1-IgG-Wirkung auf ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nicht

PAR-1-Antikörper-positive Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion bedingten eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach einer vorangegangenen Inhibition von Thrombin mit Lepirudin gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle. Im Gegensatz hierzu reduzierte eine vorangegangene Thrombininhibition die Wirkung der Immunglobulineluate gesunder Probanden auf die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle tendenziell.

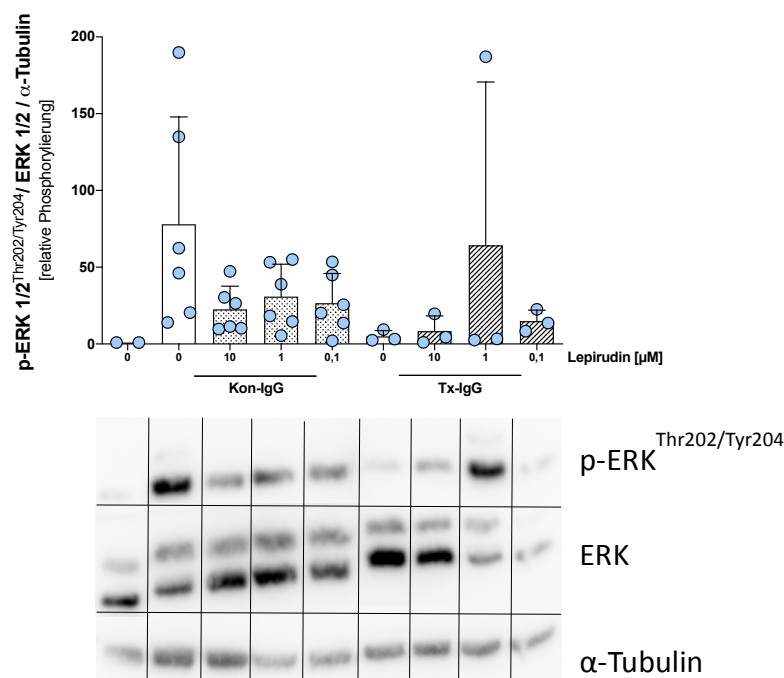


Abbildung 3.27: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inhibition der Inkubation mit Immunglobulineluates gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluates von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) durch den direkten Thrombininhibitor Lepirudin. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach zwei-stündiger Inkubation mit dem direkten Thrombin-Inhibitor Lepirudin folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluates gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluates [1 mg/ml] und Lepirudin in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μ M gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=6, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test, *p<0,05 vs. 0, gemäß Kruskal-Wallis-Test besteht ein Unterschied zwischen den Gruppen).

3.2.5.1.2 Lepirudin reduziert die PAR-1-IgG-Wirkung auf AKT^{Ser473} nicht

Hinsichtlich AKT^{Ser473} führte eine Vorbehandlung mit Lepirudin und nachfolgender Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten von Patienten mit Transplantatnierenrejektion tendenziell ebenso zu einer Erhöhung der Phosphorylierung. Jedoch zeigte die Vorbehandlung mit 10 μM Lepirudin mit nachfolgender Tx-IgG-Stimulation ein vergleichbares Phosphorylierungsniveau gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle. Erst mit sinkender vorangegangener Konzentration an direktem Thrombininhibitor von 1 bzw. 0,1 μM Lepirudin stieg die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} stimuliert durch Tx-IgG. Die vorangegangene Thrombininhibition bewirkte für die nachfolgende Stimulation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden, dass sich die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle variabel zeigte, jedoch tendenziell abnahm und somit der Phosphorylierungseffekt im Zusammenhang mit der Wirkung von Thrombin stehen kann. Signifikante Ergebnisse wurden nicht erzielt.

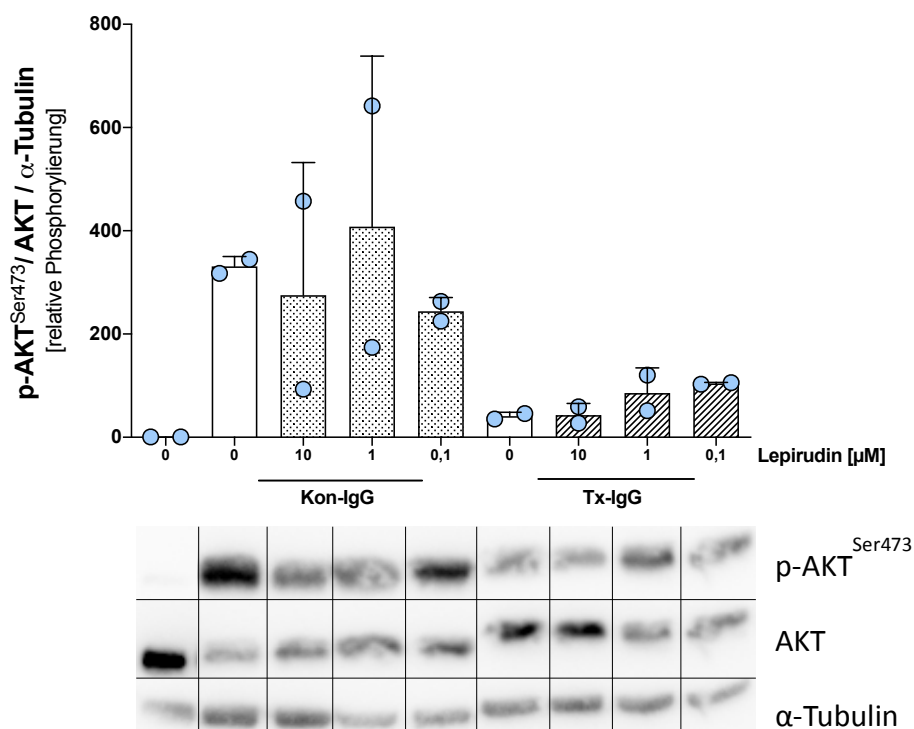


Abbildung 3.28: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Inhibition der Inkubation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) durch den direkten Thrombininhibitor Lepirudin. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu AKT sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach zwei-stündiger Inkubation mit dem direkten Thrombin-Inhibitor Lepirudin folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluaten [1 mg/ml] und Lepirudin in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μM gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

3.2.5.1.3 Lepirudin reduziert die PAR-1-IgG-Wirkung auf p70S6K^{Thr389} nicht

Nur eine Vorbehandlung mit 10 μM Lepirudin zeigte bei nachfolgender Stimulation mit Tx-IgG eine tendenzielle Zunahme der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle. Hinsichtlich der Stimulation mit IgG gesunder Probanden bestätigte sich erneut, dass hier die Anwendung von Lepirudin zu einer tendenziellen Reduktion der Phosphorylierung gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle führte. Die Werte erreichten keine Signifikanz.

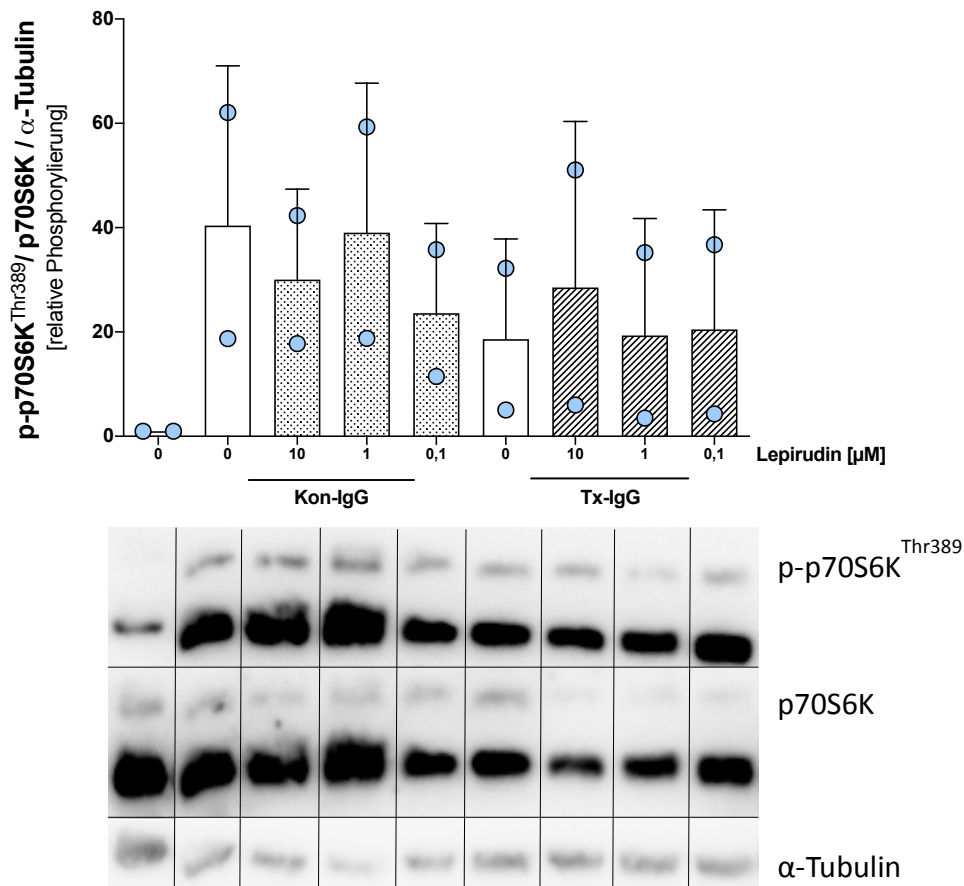


Abbildung 3.29: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Inhibition der Inkubation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) durch den direkten Thrombininhibitor Lepirudin. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p-p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K^{Thr389} sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach zwei-stündiger Inkubation mit dem direkten Thrombin-Inhibitor Lepirudin folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluat [1 mg/ml] und Lepirudin in aufsteigender Konzentration von 0,1, 1 und 10 μM gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

3.2.5.1.4 Zusammenfassung der PAR-1-IgG-Wirkung in Abhängigkeit einer direkten Thrombininhibition

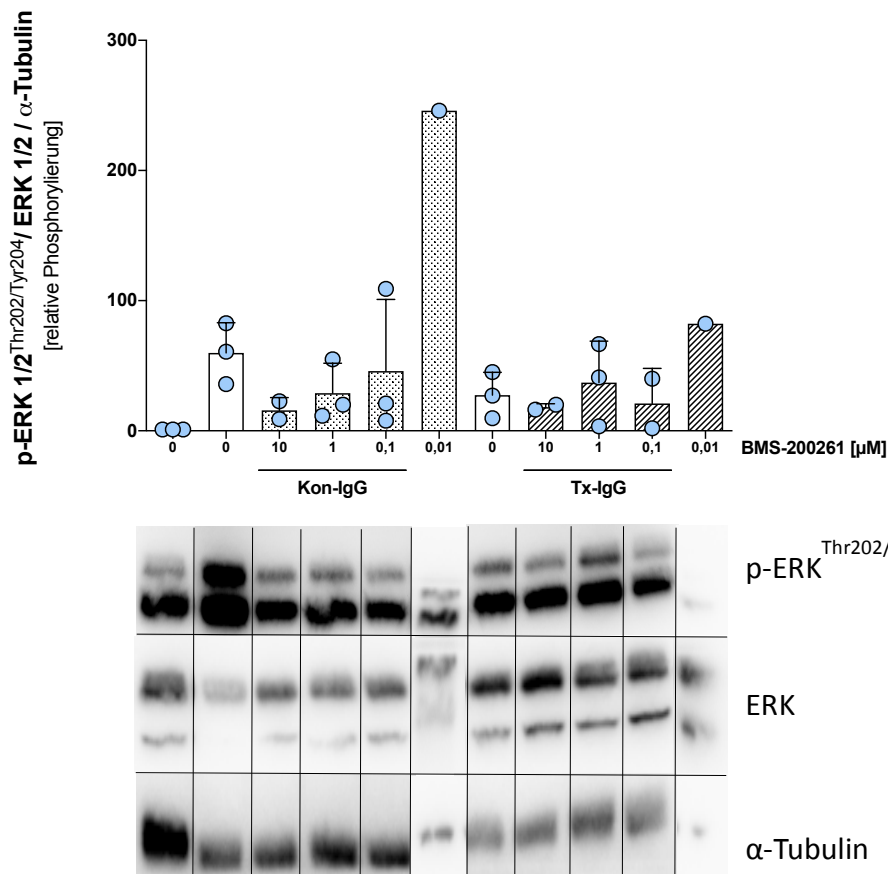
Zusammenfassend deutete sich hinsichtlich ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} an, dass eine vorangegangene Thrombininhibition mit nachfolgender Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat zu einer Erhöhung der Phosphorylierung führte. Eine Inhibition vor Stimulation mit IgG gesunder Probanden führte zur tendenziellen Reduktion der Phosphorylierung. Demnach lassen sich diese Immunglobulin-assoziierten Phosphorylierungseffekte im Zusammenhang mit der Wirkung Thrombins sehen. Ein solcher Trend zeigte sich auch bzgl. der Phosphorylierungseffekte mit IgG gesunder Probanden hinsichtlich AKT^{Ser473} sowie S6K1^{Thr389}. Im Gegensatz dazu führte PAR-1-IgG von Patienten mit Nierentransplantatrejektion unabhängig von Thrombin zu Aktivierungen dieser Signalwege.

3.2.5.2 Die Antikörper-Wirkung in Abhängigkeit einer PAR-1-Antagonisierung mit BMS-200261

Zur Untersuchung, ob die gezeigten Antikörper-induzierten Wirkungen durch den Protease-aktivierten-Rezeptor 1 vermittelt wurden, erfolgten Experimente mit Antagonisierung des PAR-1-Rezeptors durch den spezifischen Blocker BMS-200261 vor Applikation der PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluate.

3.2.5.2.1 BMS-200261 reduziert die PAR-1-IgG-Wirkung auf ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}

Eine vorangegangene Antagonisierung mit BMS-200261 in einer Konzentration von 10 µM bewirkte eine verringerte Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle. Für geringere Konzentrationen an eingesetztem BMS-200261 ließ sich dieser Effekt nicht in dieser Deutlichkeit nachweisen. Jedoch entsprach das Phosphorylierungsniveau tendenziell dem der nicht antagonisierten Kontrolle mit Ausnahme der geringsten eingesetzten Dosis an BMS-200261 von 0,01 µM. Hier bedingte die nachfolgende Stimulation mit Tx-IgG eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle. Die Wirkung der Immunglobulineluate gesunder Probanden auf die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} reduzierte BMS-200261 proportional zur eingesetzten Dosis, mit einer maximalen beziehungsweise minimalen Reduktion hinsichtlich 10 µM beziehungsweise 0,01 µM, sodass auch diesbezüglich eine PAR-1-Aktivierung mit Beeinflussung der Aktivierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} anzunehmen ist. Jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant.



6bbildung 3.30: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inhibition der Inkubation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) durch den tethered-ligand-Sequenz-Antagonisten des PAR-1-Rezeptors BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach zwei-stündiger Inkubation mit BMS-200261 folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluaten [1 mg/ml] und BMS-200261 in aufsteigender Konzentration von 0,01, 0,1, 1 und 10 μ M gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=3).

3.2.5.2.2 Der Einfluss von PAR-1-IgG auf die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} in Abhängigkeit von BMS-200261

Bzgl. AKT^{Ser473} bewirkte eine vorangegangene Antagonisierung mit BMS-200261 vor der Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten für Tx-IgG keine Reduktion der Phosphorylierung gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle. Die nachfolgende Stimulation mit 10 und mit 0,1 μ M bewirkte eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle. Darüber hinaus deutete sich bezüglich der Wirkung der Immunglobulineluate gesunder Probanden auf p-AKT^{Ser473} eine ebenso proportionale Reduktion der Phosphorylierung, vergleichbar p-ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}, hinsichtlich der eingesetzten Dosis an BMS-200261 an.

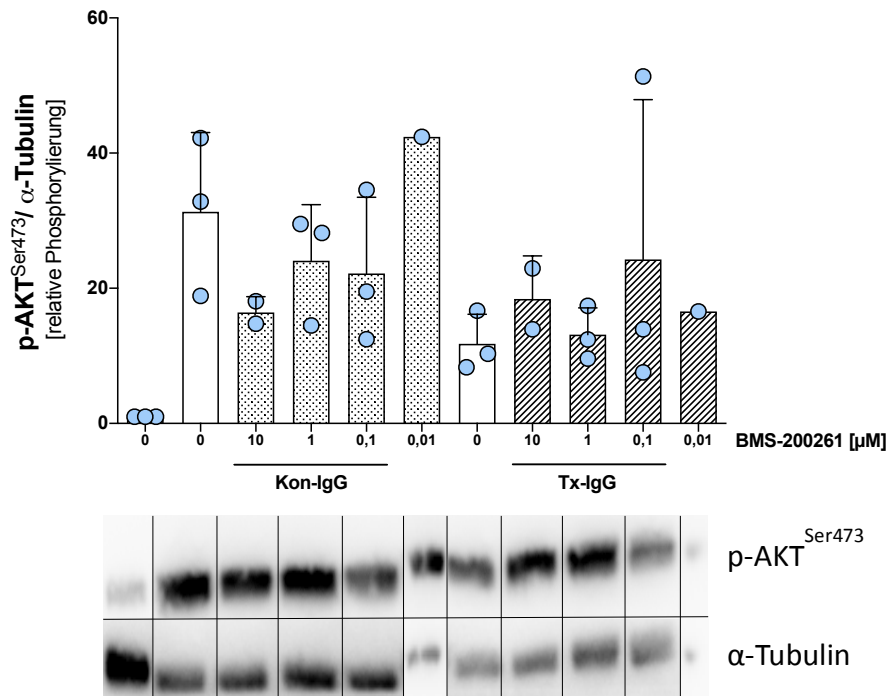


Abbildung 3.31: Analyse der Phosphorylierung von AKT^{Ser473} nach Inhibition der Inkubation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) durch den tethered-ligand-Sequenz-Antagonisten des PAR-1-Rezeptors BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} normalisiert zu α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach zwei-stündiger Inkubation mit BMS-200261 folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluaten gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluaten [1 mg/ml] und BMS-200261 in aufsteigender Konzentration von 0,01, 0,1, 1 und 10 μ M gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=3).

3.2.5.2.3 Der Einfluss von PAR-1-IgG auf die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} in Abhängigkeit von BMS-200261

PAR-1-IgG von Tx-Patienten führte nach vorangegangener Inkubation mit BMS-200261 zu einer variablen, im Mittel jedoch tendenziell erhöhten Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} gegenüber der nicht antagonisierten Kontrolle. Darüberhinaus zeigten sich für die Stimulation mit IgG gesunder Probanden keine wesentlichen Effekte auf die Phosphorylierung. Auch ließ sich keine Wirkung der Immunglobulineluate gesunder Probanden auf die Phosphorylierung der p70S6K^{Thr389} in Abhängigkeit einer Antagonisierung mit BMS-200261 nachweisen.

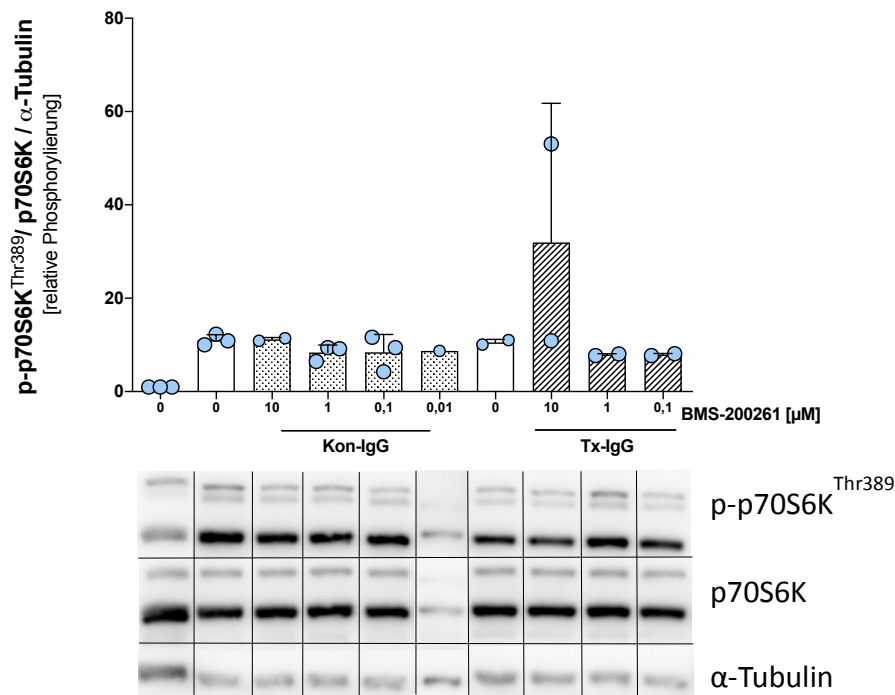


Abbildung 3.32: Analyse der Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} nach Inhibition der Inkubation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) durch den tethered-ligand-Sequenz-Antagonisten des PAR-1-Rezeptors BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389} normalisiert zu p70S6K sowie α -Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach zwei-stündiger Inkubation mit BMS-200261 folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluat [1 mg/ml] und BMS-200261 in aufsteigender Konzentration von 0,01, 0,1, 1 und 10 μ M gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=3, *p<0,05 vs. 0, gemäß Kruskal-Wallis-Test besteht ein Unterschied zwischen den Gruppen).

3.2.5.2.4 Zusammenfassung der PAR-1-vermittelten Antikörper-Wirkung

Zusammenfassend zeigte die Antagonisierung des PAR-1 mittels BMS-200261 ausschließlich hinsichtlich der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} eine tendenziell reduzierende Wirkung und kann damit mit einem PAR-1-medierten Effekt in Zusammenhang stehen. Hinsichtlich der p70S6K^{Thr389} deutete sich eine erhöhte Phosphorylierung unabhängig von Thrombin und PAR-1 nach Stimulation mit Tx-IgG an. Bzgl. AKT^{Ser473} bewirkte eine Antagonisierung mit BMS-200261 eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierung. Demnach wäre die durch Tx-IgG induzierte Phosphorylierung nicht durch Thrombin vermittelt. Eine Antagonisierung mit BMS-200261 bewirkte zudem eine tendenzielle Erhöhung der Phosphorylierung, sodass PAR-1 eine negativ regulierende Position einzunehmen scheint.

3.2.6 Der Effekt von PAR-1-IgG auf ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} in Abhängigkeit von Pertussistoxin

Bestätigt werden sollte zudem die G-Protein-gekoppelte Transduktion PAR-1-mediierter Wirkungen auf ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}. Das ADP-ribosylierende Pertussistoxin (PTX) verhindert durch eine kovalente Modifizierung die Aktivierung der Unterfamilien G_i, G_o und G_t.¹⁶⁸ Bisher bekannt ist eine Bindung von PAR-1 an G_{q/11}, G_{i/o} und G_{12,13}.¹⁶⁹ Nach Vorbehandlung mit PTX führte die Stimulation mit PAR-1-Tx-IgG unerwartet zu einer tendenziellen Erhöhung der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}. Am wirksamsten war hierbei die Inhibition mit 50 ng/ml PTX. Bereits die Anwendung von PTX an HMEC-1-Zellen ohne nachfolgende IgG-Stimulation bewirkte eine tendenzielle Reduktion der ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}-Phosphorylierung. Dies deutet eine inhibierende Wirkung des PTX an, welche schon unter nicht stimulierten Bedingungen wirkt.

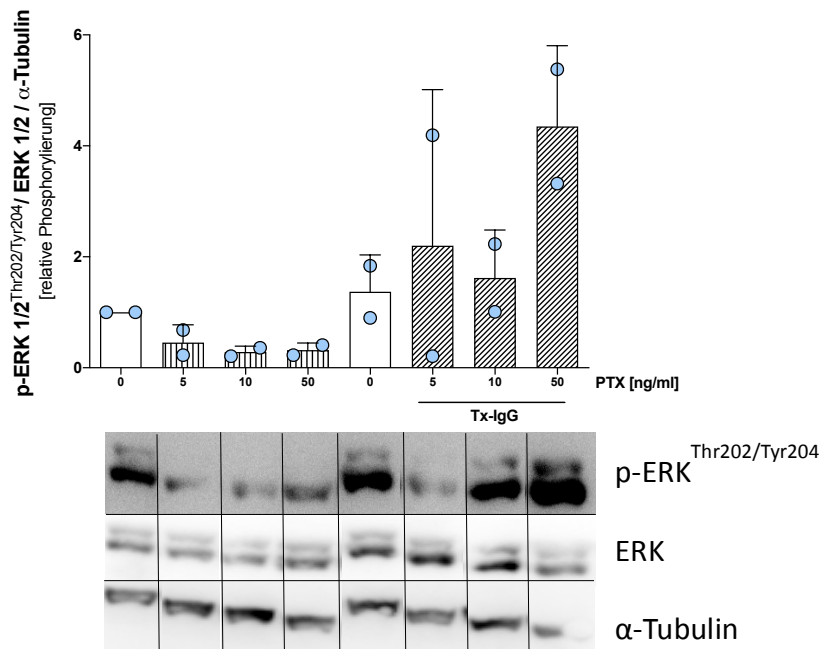


Abbildung 3.33: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Inhibition des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR-1 durch Pertussistoxin sowie Inkubation mit Immunglobulineluat [1 mg/ml] von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG). Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie α-Tubulin in HMEC-1-Zellen. Nach einstündiger Inkubation mit dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Inhibitor Pertussistoxin folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluat von Patienten mit einer Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten, nicht inhibierten und inhibierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluat der Patientengruppe und Pertussistoxin in aufsteigender Konzentration von 5, 10 und 50 ng/ml gemessen. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=2).

3.2.7 Die Wirkung einer Neutralisierung von PAR-1-IgG auf ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} mittels Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife

Zur Bestätigung der antikörper-induzierten Aktivierung des PAR-1 wurde die Neutralisierung der PAR-1-Antikörper mit einem der funktionellen Konformation der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 entsprechenden Peptid untersucht.

Bekannt ist, dass die 2. extrazelluläre Schleife des PAR-1 kritisch für spezies-spezifische Ligandeninteraktionen und die Erkennung von Peptidagonisten ist.¹⁷⁰ In Untersuchungen zur Struktur des Thrombinrezeptors an chimären Rezeptoren mit humanen als auch *Xenopus laevis*- Anteilen ließ sich die Ligandendomäne, welche die transmembranäre Signaltransduktion initiiert, in den Aminosäurepositionen 244 bis 268 der 2. extrazellulären Schleife als maßgeblich für Agonisten identifizieren.¹⁷¹ Insbesondere die Aminosäure Glutamin an Position 260 wurde hierbei als entscheidend für das Ansprechen des Rezeptors auf als korrekt identifizierte Agonisten ausfindig gemacht.¹⁷² Die gemeinsame Inkubation von PAR-1-Antikörper-positivem Immunglobulineluat mit der synthetischen Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife führt zur Bindung des Antikörpers an die Sequenz, sodass keine Antikörperbindung an den PAR-1 erfolgen kann.

Die Stimulation mit Tx-IgG, bei welchem eine Neutralisierung der PAR-1-Antikörper mittels des synthetischen Peptids erfolgte führte zu keiner Veränderung der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Bzgl. einer Stimulation mit IgG gesunder Probanden zeigte sich nach Neutralisierung im Mittel ebenso kein Effekt.

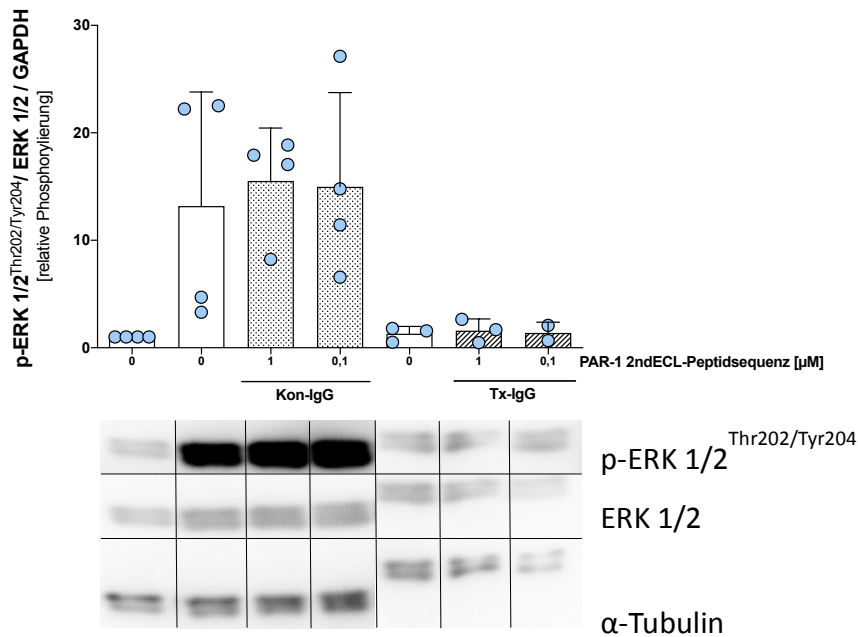


Abbildung 3.34: Analyse der Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} nach Neutralisierung der Wirkung von PAR-1-Antikörpern durch die Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 sowie Inkubation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) sowie PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG). Die graphische Darstellung zeigt die Phosphorylierung von ERK 1/2^{Thr202/Tyr204} normalisiert zu ERK 1/2 sowie GAPDH in HMEC-1 Zellen. Nach einstündiger Inkubation mit der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 in den Konzentrationen von 1 bzw. 0,1 µM folgte eine 15-minütige Stimulation mit Immunglobulineluat gesunder Probanden sowie von Patienten mit Transplantatnierenrejektion. Die Phosphorylierung wurde in unbehandelten und nicht neutralisierten Kontrollen sowie nach Inkubation mit Immunglobulineluat [1 mg/ml] und der Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 in aufsteigender Konzentration von 0,1 und 1 µM gemessen. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=3).

3.3 Die Wirkung von PAR-1-Antikörper-positivem IgG von Patienten mit Transplantatnierenrejektion auf die endotheliale Sekretion von Interleukin-6

Zur Klärung einer Wirkung gegen den PAR-1 gerichteter Antikörper auf die endotheliale Inflammation wurde die Sekretion von IL-6 an HMEC-1-Zellen untersucht.

Erhöhte Serumkonzentrationen an IL-6 sind bei Patienten mit Transplantatnierenrejektionen¹¹⁵ vorbeschrieben.

3.3.1 Die Expression von Interleukin-6 ist abhängig von der Konzentration an eingesetztem PAR-1-Antikörper-IgG

Die Konzentration an PAR-1-Antikörper-positivem Immunglobulineluat, welche zu einer nachweisbaren Induktion von IL-6 führte wurde bestimmt. Die eingesetzten Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion erhöhten die Sekretion von Interleukin-6 dosisabhängig. Proportional zum Anstieg der eingesetzten Konzentration an Antikörper-

pereluat von 0,5 mg/ml, 1 mg/ml über 1,5 mg/ml auf 2 mg/ml stieg die Konzentration an sezerniertem Interleukin-6. Jedoch erreichten die Werte keine Signifikanz.

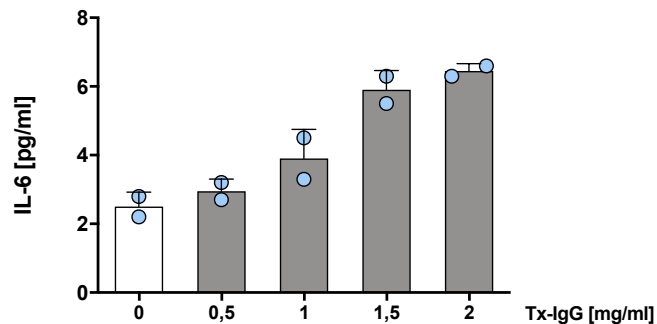


Abbildung 3.35: Analyse der Sekretion von Interleukin-6 nach Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) in Abhängigkeit von der Dosis. Die graphische Darstellung zeigt die Sekretion von IL-6 [pg/ml] durch HMEC-1-Zellen. Die Sekretion wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Antikörpereluat von Patienten mit Transplantatnierenrejektion in aufsteigender Konzentration von 0,5, 1, 1,5 und 2 mg/ml gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=2).

3.3.2 Die Expression von Interleukin-6 ist abhängig von der Zeitdauer der Einwirkung der PAR-1-Antikörper-IgG

PAR-1-Antikörper-positive Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion erhöhten die Sekretion von Interleukin-6 proportional zur Zeitdauer der Stimulation. Von 3, 6 über 12 auf 24 Stunden stieg die Konzentration an sezerniertem Interleukin-6 signifikant gegenüber der Stimulation von HMEC-1-Zellen mit Immunglobulineluat gesunder Probanden als Kontrollgruppe an. Bei Letzteren zeigte sich ein deutlich geringer zunehmender signifikanter Effekt auf die Sekretion von Interleukin-6.

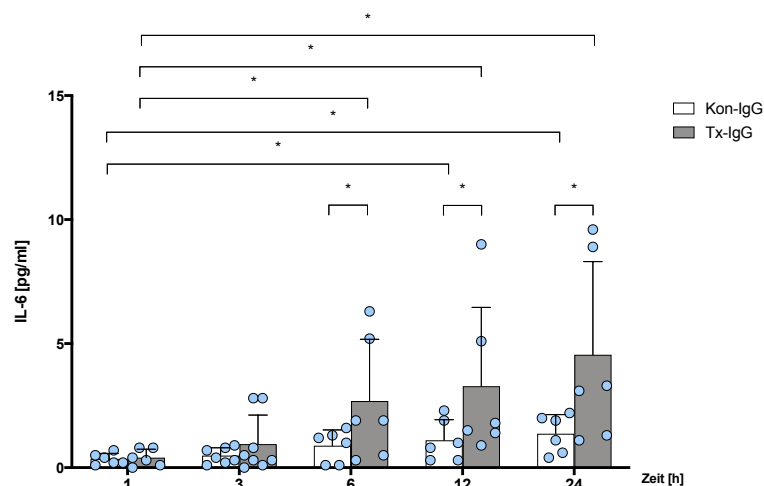


Abbildung 3.36: Analyse der Sekretion von Interleukin-6 nach Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat [1 mg/ml] von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) sowie mit Immunglobulineluat gesunder Probanden (Kon-IgG) in Abhängigkeit von der Zeit. Die graphische Darstellung zeigt die Sekretion von IL-6 [pg/ml] durch HMEC-1-Zellen. Die Sekretion wurde nach 1-, 3-, 6-, 12- sowie 24-stündiger Inkubation mit den vorgenannten Immunglobulineluat gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=8, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.3.3 Die Wirkung des Inhibitors PD184352 auf die PAR-1-IgG-stimulierte IL-6-Sekretion

Der MEK-Inhibitor PD184352 ist ein auch oral verfügbarer, hochspezifischer niedrigmolekularer Inhibitor gegen eine der Schlüsselkomponenten der ERK-Signalkaskade, MEK1/MEK2.¹⁷³ Auf diesem Weg hemmt PD184352 die Phosphorylierung von ERK 1/2 sowie die hierdurch nicht stattfindende nachfolgende Signaltransduktion effektiv. Erfolgreich eingesetzt wurde PD184352 bereits in Versuchen zur Inhibition von ERK 1/2 in HUVECs.¹⁷⁴ Die signifikante Wirkung der PAR-1-Antikörper-positiven Tx-IgG auf die Sekretion von Interleukin-6 wurde durch PD184352 tendenziell proportional zur eingesetzten Konzentration gegenüber der nicht inhibierten Kontrolle reduziert.

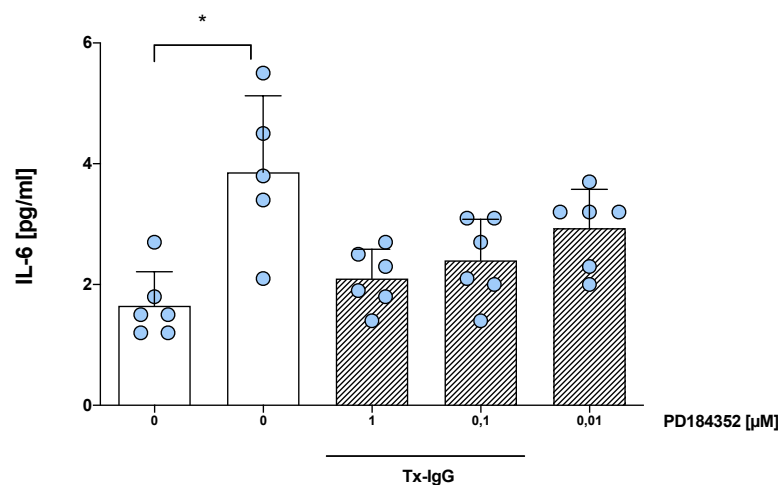


Abbildung 3.37: Analyse der Sekretion von Interleukin-6 nach Inhibition der Wirkung PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluats [1 mg/ml] von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) mit PD184352, einem Inhibitor der ERK-Signalkaskade. Die graphische Darstellung zeigt die Sekretion von IL-6 [pg/ml] durch HMEC-1-Zellen. Die Sekretion wurde in unbehandelten und nicht inhibierten Kontrollen sowie nach 1-stündiger Inkubation mit PD184352 in aufsteigender Konzentration von 0,01, 0,1 und 1 μM, gefolgt von einer 24-stündigen Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluaten der Patientengruppe gemessen. Dargestellt sind die Werte ± SD (n=6, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

3.3.4 Die Wirkung PAR-1-Antikörper-positiver Tx-IgG-eluate auf die Expression von Interleukin-6 wird durch die Antikörper-Neutralisierung sowie eine PAR-1-Antagonisierung reduziert

Die Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife sowie der PAR-1-Rezeptorantagonist BMS-200261 reduzierten die Wirkung der PAR-1-Antikörper-positiven Tx-Immunglobulineluats auf die Sekretion von IL-6 signifikant. PAR-1-Antikörper-positive Immunglobulineluats der Patientengruppe erhöhten die Sekretion von Interleukin-6. Der neutralisierende Effekt einer vorangegangenen Inkubation mit der Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife auf die PAR-1-Antikörper zeigte sich diskret umgekehrt proportional zur eingesetzten Konzentration an Peptidsequenz von 1 zu 0,1 μM. Ebenso bewirkte der PAR-

1-Rezeptorantagonist BMS-200261 eine diskret umgekehrt proportionale und signifikante Reduktion der Sekretion von Interleukin-6 in den eingesetzten Dosierungen von 10 zu 1 μM BMS-200261.

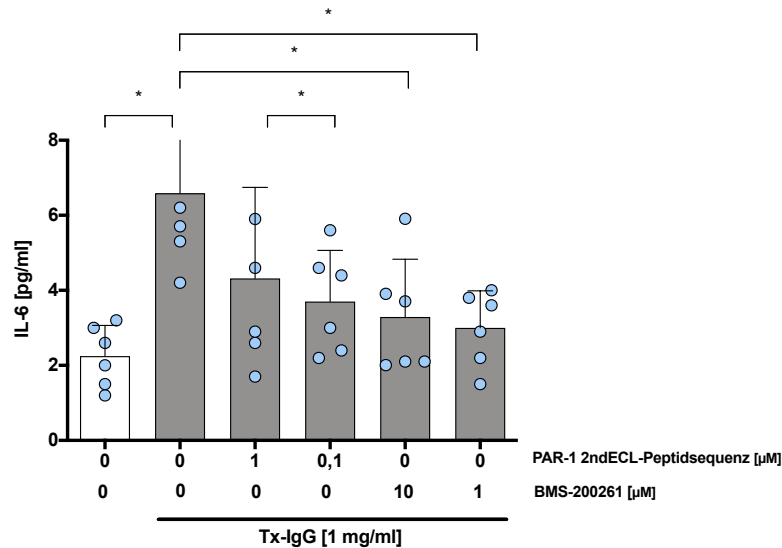


Abbildung 3.38: Analyse der Sekretion von Interleukin-6 nach Neutralisierung bzw. Inhibition der Wirkung PAR-1-Antikörper-positiver Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion (Tx-IgG) nach Inkubation mit der Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife bzw. BMS-200261. Die graphische Darstellung zeigt die Sekretion von IL-6 [pg/ml] durch HMEC-1-Zellen. Die Sekretion wurde in unbehandelten und nicht neutralisierten bzw. inhibierten Kontrollen sowie nach 1-stündiger Inkubation mit der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 oder BMS-200261 in den Konzentrationen von 1 bzw. 0,1 und 10 bzw. 1 μM , gefolgt von einer 24-stündigen Stimulation mit PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulineluat der Patientengruppe gemessen. Dargestellt sind die Werte \pm SD (n=6, *p<0,05 vs. 0, Mann-Whitney-U-Test).

4. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses gegen den G-Proteingekoppelten Protease-aktivierten Rezeptor-1 gerichteter Antikörper auf molekulare Mechanismen in der Pathologie der Transplantatnierenrejektion. Hierfür wurden physiologische sowie pathologische, durch isolierte PAR-1-Antikörper vermittelte Prozesse an immortalisierten Endothelzellen, HMEC-1-Zellen, untersucht.

Erstmalig ist es mit dieser Arbeit gelungen, zelluläre Wirkungen von PAR-1-Antikörpern im Kontext von Transplantatnierenrejektionen nachzuweisen. Antikörper-induziert erfolgt eine PAR-1-vermittelte Aktivierung von ERK 1/2. Diese ließ sich in einen funktionellen Zusammenhang zur Sekretion von IL-6 als inflammatorischer Komponente der untersuchten Pathologie stellen. Bestätigt wurden die Ergebnisse durch receptorspezifische Inhibitoren und Antagonisten.

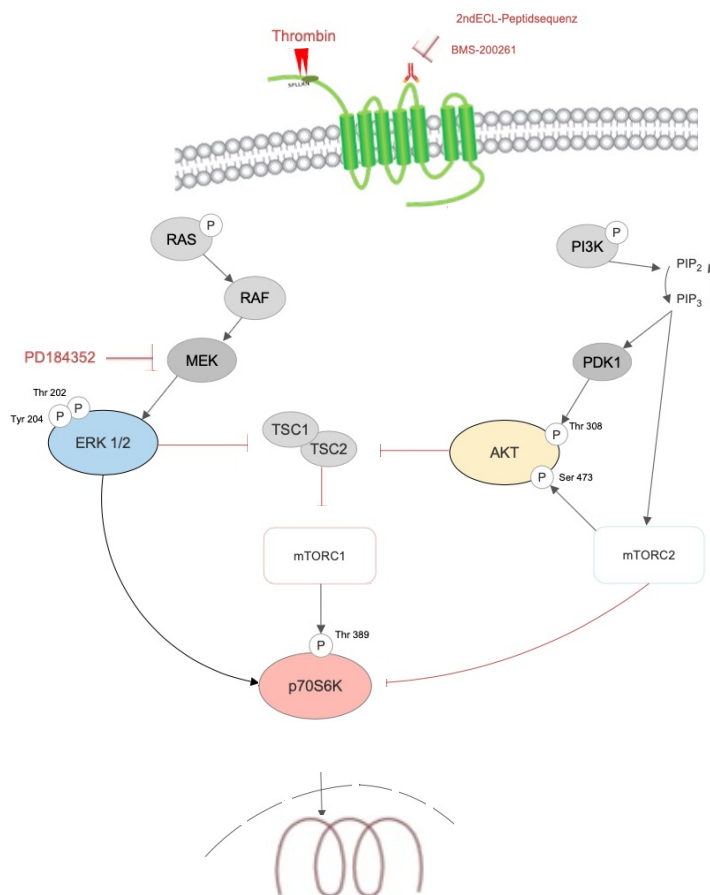


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des untersuchten interaktiven Netzwerkes.

4.1 HMEC-1-Zellen als Grundlage für das Untersuchungsmodell

Die Durchführung der dargestellten Versuche erfolgte an immortalisierten humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen. Hierdurch ließen sich die Herausforderungen der Kul-

tur primärer mikrovaskulärer Endothelzellen: die Isolation zur Kultivierung sowie die fortgesetzte anspruchsvolle Kultivierung neben einer sehr geringen Lebensspanne überwinden. Zeichen der Seneszenz wurden in HMEC-1-Zellen auch nach 95 Passagen nicht beschrieben.¹¹⁸ Dies galt es bei der Wahl der eingesetzten Endothelzellen zu beachten, da ein alternde Zellen kennzeichnender pro-inflammatorischer Phänotyp sowie die p53-medierte Seneszenz mit der Freisetzung von IL-6 verbunden ist.¹⁷⁵ Vorteilhaft in der Anwendung der in Karyo- und Phänotyp stabilen HMEC-1-Endothelzelllinie gegenüber primären Zellkulturen war zudem ihre umfassendere Charakterisierung sowie die Stabilität ihrer endothelialen Eigenschaften¹⁷⁶, sodass eine Standardisierung der experimentellen Bedingungen für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich war. Neben für die Charakterisierung von Endothelzellen notwendigen Oberflächenmolekülen wurden an HMEC-1-Zellen auch an der Hämostase beteiligte Komponenten nachgewiesen.^{177,121} Eine Untersuchung mit hämostatischen Prozessen assoziierter Pathologien war aus diesem Grund angemessen. Aus Untersuchungen zur Assoziation der Expression von Thrombospondin sowie angiogenetischer Prozesse zu PAR-1 war zudem bekannt, dass HMEC-1-Zellen mit PAR-1 gekoppelte G-Proteine exprimieren.^{178,179} Ein Vergleich von HMEC-1-Zellen sowie weiterer populärer Endothelzelllinien, ECV304 und EA.hy926, mit primären humanen Nabelschnurvenenendothelzellen (HUVECs), einer häufig zur Anwendung kommenden Groß-Gefäß-Zelllinie, hatte zudem bestätigt, dass HMEC-1-Zellen primärem Endothel am ähnlichsten sind.¹⁸⁰ Neben der vaskulären Lokalisation geht auch die organotypische Lokalisation von Endothelzellen mit einer funktionellen und molekular-mechanistischen Differenzierung für die Aufrechterhaltung von Prozessen wie beispielsweise der Hämostase sowie der Inflammation einher.^{181,182} Die konstituierende pathogene Vaskulopathie der Transplantatnierenrejektion hat ihre Genese in der mikrovaskulären renalen Endothelzelle.^{183,184} Das renale Gefäßbett lässt sich morphologisch sowie funktionell in die Kompartimente Glomerulum, kortikale peritubuläre Kapillaren sowie Vasa recta mit entsprechend differierenden mikrovaskulären Betten differenzieren.¹⁸¹ Bekannt ist, dass PAR-1 in gesunden Nieren sowohl glomerulär als auch tubulointerstitiell exprimiert wird.¹⁸⁵ Untersuchungen an Biopsien mit Charakteristika einer chronischen Transplantatnephropathie zeigten, dass PAR-1 glomerulär, tubulär und vaskulär, in endothelialen und mesangialen Zellen sowie in peritubulären Kapillaren zu finden waren.¹⁸⁵ Wie in Abschnitt 1.2.1.3 dargelegt zeigen sich charakteristische Veränderungen sowohl bei akuten als auch chronischen Rejektionen in vorgenannten Kompartimenten.

Autoantikörper-induzierte pathologische Prozesse gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wurden bereits hinsichtlich AT₁-R sowie ET_A-R an HMEC-1-Zellen untersucht.¹⁸⁶

4.2 Die Wirkung des natürlichen PAR-1-Aktivators Thrombin auf die Aktivierung der Signaltransduktion in HMEC-1-Zellen

Für die Beantwortung der Fragestellung zum Einfluss isolierter, gegen den PAR-1 gerichteter Antikörper auf PAR-1-medierte molekulare Mechanismen, war zunächst die Charakterisierung der Wirkung des natürlichen PAR-1-Aktivators Thrombin auf die zu untersuchenden molekularen Signalwegskomponenten in HMEC-1-Zellen von großer Bedeutung.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Wirkung Thrombins auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 abhängig von der eingesetzten Dosis sowie der Dauer der Einwirkung ist. Für AKT und p70S6K deutete sich dies ebenso an. Mit der Anwendung des direkten Thrombininhibitors Lepirudin im Pharmakon Refluidan® ließen sich die Thrombin-induzierten Effekte auf die Phosphorylierung der untersuchten intrazellulären Signalkaskadensubstrate, mit Ausnahme von AKT^{Ser473} bzgl. 0,1 Units Thrombin/ml, im Trend hemmen und sich somit die Thrombin-Spezifität der dargestellten Induktionen zeigen.

Dass Thrombin in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit in verschiedenen Konzentrationen wirksam ist und diese darüber hinaus auch differierende Wirkungseffekte bedingen wurde an HUVECs und HPAECs gezeigt.¹⁸⁷ Bei diesen induzierte eine vergleichsweise geringe Konzentration an Thrombin (bis 50 pM) in Abhängigkeit einer gemeinsamen Aktivierung des PAR-1 sowie des PI3K-Signalweges anti-inflammatorische, zytoprotektive Effekte währenddessen hohe Konzentrationen (>100 pM Thrombin) proinflammatorisch wirkten.

Der zeitliche Verlauf Thrombin-induzierter PAR-1-mediierter Effekte war für die intrazelluläre Signalkaskade PI-PLC/PKC α -c-Src an synovialen Fibroblasten untersucht wurden.¹⁸⁸

Bzgl. dieser gelang der Nachweis, dass Thrombin die Phosphorylierung von I κ B α , IKK α/β sowie p65^{Ser276} zeitabhängig, beginnend mit einer Zunahme nach 15 Minuten induziert. Im Gegensatz zu den Analysen der vorliegenden Arbeit waren die Untersuchungszeitpunkte 5 und 10 Minuten jedoch nicht, sondern nur die Effekte nach 15, 30, 60 und 120 Minuten analysiert wurden. Darüber hinaus wurde Thrombin ausschließlich in einer Konzentration von 3 Units/ml eingesetzt.

Mit der Anwendung des direkten Thrombininhibitors Lepirudin im Pharmakon Refluidan® ließ sich die Spezifität der Thrombin-induzierten Effekte in den Analysen dieser Arbeit andeuten. Weitere Komponenten dieses Pharmakons sind Mannitol sowie Natriumhydroxid zur Einstellung des pH auf 7.¹⁶⁵ Die Halbwertszeit für Lepirudin wird nach intravenöser humaner Applikation mit 60 Minuten angegeben.¹⁶⁶ In den hier dargestellten Versuchen wurde Lepirudin für eine Zeitdauer von 2 Stunden vor Applikation des stimulierenden Substrates

eingesetzt. Hierbei fand Berücksichtigung, dass die vielfältigen und komplexen, unter anderem auch katabolen Stoffwechselprozesse des menschlichen Organismus im nachgestellten in-vitro-System nicht stattfinden. Die inhibitorische Wirkung Lepirudins auf eine Thrombin-vermittelte PAR-1-Aktivierung war in-vitro zudem bereits erfolgreich an Thrombozyten demonstriert worden. Bei diesen Untersuchungen war Lepirudin in den Konzentrationen 0,16 µg/ml, 1,6µg/ml und 16µg/ml eingesetzt, eine Wirkung bereits in der geringsten applizierten Konzentration gezeigt worden.¹⁸⁹

Wie vorgenannt erfolgten bereits Untersuchungen zum Einfluss von Thrombin auf PAR-1-medierte molekulare Mechanismen, auch in Assoziation zu IL-6. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen jedoch erstmalig die konzentrations- und zeitabhängigen Effekte der Wirkung Thrombins auf ERK 1/2 sowie tendenziell für AKT und p70S6K in HMEC-1-Zellen. Aus Tierversuchen an Schweinen ist bekannt, dass die Inhibition von Thrombin während der Ischämie-Reperusionsperiode eine protektive Wirkung auf eine chronische Inflammation des Transplantates sowie eine spätere tubuläre Atrophie hat.¹⁹⁰ Daneben ist aus Untersuchungen zur systemischen Sklerose bekannt, dass Thrombin eine entscheidende Rolle als Mediator in der Entwicklung und Progression einer Fibrose einnimmt. Beschrieben ist diesbezüglich ein Wirkungszusammenhang zwischen TF und Thrombin sowie dem GPCR ET_A-R.¹⁹¹ Auch in der Genese weiterer Erkrankungen wurden Thrombin inflammatorische Effekte zugeschrieben.¹⁹²

Bisher beschriebene Wirkungen Thrombins auf die endotheliale Zellaktivierung, die Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine, die Induktion wichtiger profibrotischer Faktoren¹⁹³ sowie zelluläre Prozesse die Differenzierung von Myofibroblasten betreffend¹⁹³ legen in Übereinstimmung mit den vorgenannten Untersuchungen einen Wirkungszusammenhang auch für Prozesse der non-HLA-Antikörper-vermittelten Transplantatnierenrejektion nahe.

4.3 Der Nachweis der Thrombin-induzierten PAR-1-abhängigen Aktivierung

Zur Bestätigung, dass die Thrombin-induzierten Aktivierungen PAR-1-vermittelt erfolgten, wurde die Wirkung des PAR-1-Peptidantagonisten BMS-200261 auf die intrazellulären Signalkaskadenkomponenten untersucht.

In der Tendenz führte dessen Anwendung für alle mit 5 Units Thrombin/ml gezeigten Aktivierungen zu einer Reduktion des Thrombin-induzierten Effekts.

Zur Bestätigung spezifisch über PAR-1-vermittelter Effekte war BMS-200261 bereits in Untersuchungen an humanen Endothelzellen eingesetzt wurden.¹⁹⁴ In der Anwendung zu berücksichtigen ist, dass eine kompetitive Hemmung mit einer mitunter sehr hohen lokalen Konzentration des gebundenen Peptidliganden, generiert durch das proteolytische Schnei-

den Thrombins, auftreten kann.⁸⁴ Aus diesem Grund wurden die vorliegenden Antagonisierungsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Als Alternative zur Bestätigung der PAR-1-Aktivierung wäre zudem die Anwendung eines freien, synthetischen Hexapeptids mit der Aminosäuresequenz des gebundenen Liganden SFLLRN in Frage gekommen. Ein solches Peptid aktiviert den PAR-1 mit einer halb-maximalen effektiven Konzentration im Bereich von 3-10 μM und erreicht damit die vermutete lokale Konzentration des gebundenen Agonistenpeptids von etwa 0,4mM, ohne dass eine kompetitive Hemmung von Bedeutung wäre.⁸⁴

Bekannt ist darüber hinaus, dass Thrombin neben PAR-1 auch die Rezeptoren PAR-3 und PAR-4 aktiviert, daher ist ein Thrombin-induzierter Phosphorylierungseffekt auf ERK 1/2, AKT und p70S6K über PAR-3/4 nicht ausgeschlossen. Erwiesen ist hinsichtlich PAR-4, dass dieser mit einer 50-fach geringeren Potenz als PAR-1 durch α -Thrombin aktiviert wird und damit einen Rezeptor mit niedriger Affinität für Thrombin darstellt.¹⁹⁵

Weiterhin kann, von der mittels BMS-200261 nachgewiesenen PAR-1-Spezifität unberührt, nicht ausgeschlossen werden, dass auch funktionelle Interaktionen auf die Aktivierung der intrazellulären Signalkaskadenkomponenten Einfluss nahmen. Diese sind in verschiedenen vaskulären Gefäßbetten zwischen verschiedenen Protease-aktivierten Rezeptoren bekannt.^{195,196} PAR-1-PAR-2-Heterodimere bewirken beispielsweise eine differenzielle ERK 1/2 Expression¹⁹⁷ und der vorgenannte PAR-3 kann ebenso als Cofaktor für eine Aktivierung des PAR-4 dienen.¹⁹⁸

Beschrieben ist, dass während pathologischer Bedingungen die endotheliale Thrombin-PAR-Signaltransduktion dereguliert wird und es so zu einem Verlust der Barrierefunktion sowie zur Ausbildung eines pro-inflammatorischen und pro-angiogenen Phenotyps kommt.¹⁹⁹ Aus diesem Grund ist die Bedeutung Thrombin-PAR-1-vermittelter molekular-induzierter Prozesse in der endothelialen Schädigung mit Auswirkungen auf die Transplantatnierenrejektion durchaus naheliegend, bisher jedoch noch nicht beschrieben.

4.4 Die Aktivierung des PAR-1 durch PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG im zeitlichen Verlauf

Um die Aktivierung des PAR-1 durch agonistische Antikörper nachzuweisen wurde die Aktivierung des PAR-1 mit dem Antikörper SPAN12 durchflusszytometrisch im zeitlichen Verlauf untersucht.

Die Stimulation mit Tx-IgG führte zu einem signifikanten Anstieg der aktiven PAR-1 nach mindestens 10 Minuten.

Zuvor war durch die Arbeitsgruppe Nakayama et al. die Aktivierung von PAR-1 mittels SPAN12 an HUVECs untersucht worden. In dieser Arbeit war im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen eine frühe Aktivierung nach 3 Minuten mit anschließender Internalisierung sowie einem nachfolgenden Recycling an die Zellmembranoberfläche nach 3 Stunden demonstriert wurden.²⁰⁰ Die Stimulation hatte hierbei jedoch mit Thrombin und nicht einem Immunglobulineluat stattgefunden.

Eine Aktivierung von PAR-1 ausgelöst durch PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG wurde mit den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen.

4.5 Die Bedeutung von ERK 1/2 in der Antikörper-induzierten PAR-1-Aktivierung im Kontext einer Transplantatnierenrejektion

Zum Verständnis der Bedeutung von ERK 1/2 in der Antikörper-induzierten PAR-1-Aktivierung im Kontext einer Transplantatnierenrejektion wurde dessen Phosphorylierung sowohl nach Stimulation mit Thrombin als auch nach Stimulation mit Tx-IgG untersucht.

Gezeigt wurde zunächst ein zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt Thrombins auf die Phosphorylierung von ERK 1/2, dessen Spezifität sich durch Inhibitorversuche mit Lepirudin andeutete. Eine Antagonisierung des PAR-1 führte zu einer Hemmung der Thrombin-induzierten Phosphorylierung. Dass PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG eine Phosphorylierung von ERK 1/2 induziert wurde gezeigt. Die PAR-1-Rezeptorspezifität ließ sich nachweisen.

Bisher beschrieben sind konzentrationsabhängige Effekte Thrombins auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 im Zusammenhang mit der Wirkung von Antiphospholipidantikörpern auf humane Thrombozyten. Eine minimale Dosis von 0,2 Units/ml Thrombin war, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, notwendig um bei diesen Untersuchungen einen Phosphorylierungseffekt zu erzielen.²⁰¹

Hinsichtlich des in den vorliegenden Versuchen demonstrierten zeitlichen Verlaufs der Phosphorylierung von ERK 1/2 sind vergleichbare Effekte in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen beschrieben. Eine Aktivierung nach 2,5 bis 15 Minuten mit einem Maximum der induzierten Phosphorylierung nach 5 Minuten wurde beispielsweise für die Wirkung des α -adrenergen Agonisten Phenylephrin an ventrikulären Kardiomyozyten adulter Ratten demonstriert.²⁰² Auch anti-endotheliale Antikörper (AECA) in Seren von Patienten mit der rheumatoiden Erkrankung Morbus Behçet bewirkten an nicht immortalisierten humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) eine ERK 1/2-Phosphorylierung mit einem Maximum nach 5 Minuten.²⁰³

Daneben sind Interaktionen von PAR-1 mit dem ERK 1/2-Signalweg über verschiedene sowohl GPCR-abhängige als auch –unabhängige Mechanismen beschrieben¹⁹⁵, für die Niere jedoch nur hinsichtlich einer Begünstigung interstitieller Fibrosierungsprozesse an Tubuluszellen.²⁰⁴ Weiterhin ist eine ERK 1/2-Aktivierung im Rahmen der Proliferation von Mesangiumzellen untersucht²⁰⁵, jedoch für PAR-2. Thrombin-induzierte PAR-1-vermittelte Effekte auf ERK 1/2 sind bisher nur für Untersuchungen an murinen Bandscheiben beschrieben.²⁰⁶

Der allenfalls diskret antagonisierbare Effekt von ERK 1/2 gegenüber einer nicht antagonisierten Stimulation mit 0,1 Units Thrombin/ml in den vorliegenden Versuchen kann auch auf einen vergleichsweise geringen Thrombin-induzierbaren Stimulationseffekt auf ERK 1/2 im Falle der Anwendung einer niedrigen Thrombindosis zurückzuführen sein.

Bereits in der initialen Studie unserer Arbeitsgruppe zur non-HLA-Antikörper-medierten Vaskulopathie mit resultierender Transplantatnierenrejektion wurde die Beteiligung von ERK 1/2 an Antikörper-medierten Prozessen gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben.⁷⁴ Eine maximale Antikörper-induzierte ERK 1/2-Phosphorylierung wurde bei dieser nach 10 Minuten demonstriert. Weiterhin ist eine ERK 1/2 -Beteiligung in verschiedener Weise an Antikörper-medierten Prozessen im Rahmen von Transplantatnierenrejektionen beschrieben, nicht jedoch in Assoziation zu einem non-HLA-Antikörper- oder PAR-1-medierten Rejektionsmechanismus. Untersuchungen der Arbeitsgruppe Iwasaki et al. weisen auf einen benefiziellen Effekt einer ERK-Inhibition im Rahmen HLA-Antikörper-vermittelter chronischer Antikörperrejektionen hin.²⁰⁷ Auch in Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhanges von HLA-Klasse II-Antikörpern, resultierender Endothelzellaktivierung sowie Transplantatschädigung wurde eine Phosphorylierung von ERK 1/2 in Verbindung mit einer Zunahme der IL-6-Produktion durch Endothelzellen aufgezeigt.²⁰⁸ Diese Untersuchungen waren zudem an HMEC-1-Zellen durchgeführt wurden, jedoch wurden die Analysen zur IL-6-Sekretion an CoKulturen mit allogenen peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) durchgeführt und der pathologische Prozess vornehmlich der Regulierung über AKT zugeschrieben.

Bekannt sind Antikörper-induzierte Aktivierungen von ERK 1/2 darüber hinaus auch an Fibroblasten, bei welchen es ERK 1/2-vermittelt zu einer Erhöhung der Produktion profibrotischer und pro-angiogener Chemokine kommt.²⁰⁹ Für die Niere ist eine Beteiligung so beispielsweise für den autoimmunen Prozess der renalen Fibrose im Rahmen einer Lupus Nephritis bei systemischem Lupus erythematodes beschrieben.²¹⁰ Auch weitere Untersuchungen zu ERK 1/2-Aktivierungen bei Prozessen der Produktion extrazellulärer Matrix²¹¹ sowie der Fibrose im Rahmen einer systemischen Sklerose legen eine Aktivierung bei rena-

len Prozessen der zellulären Hypertrophie mit subendothelialer Ablagerung von fibrillärem Material sowie einer in der Folge resultierenden Entstehung einer Transplantatglomerulopathie als morphologisches Korrelat einer chronischen Rejektion nahe.²¹²

4.5.1 Die Aktivierung des PAR-1 durch PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG

Zur Bestätigung, dass die nachgewiesene PAR-1-Aktivierung tatsächlich durch Antikörper gerichtet gegen den PAR-1 zu einer ERK 1/2-Aktivierung führte, wurde die Wirkung einer Neutralisierung der PAR-1-Tx-Antikörper untersucht.

Die Anwendung der eingesetzten synthetischen, einer der funktionellen Konformation der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 entsprechenden Peptidsequenz bewirkte, dass PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG die Phosphorylierung von ERK 1/2 gegenüber der nicht neutralisierten Kontrolle nicht erhöhte. Ihr Einsatz führte demnach zur Neutralisierung der PAR-1-Tx-Antikörper sowie deren erwarteter Wirkung.

In den Experimenten unserer Arbeitsgruppe zur Identifizierung von non-HLA-Antikörpern gegen den G-Protein-gekoppelten AT₁-R wurde das Epitop der rezeptoraktivierenden Antikörper mittels Bioassay in der 2. extrazellulären Schleife des AT₁-R nachgewiesen.⁷⁴ Um die Spezifität der AT₁-R-vermittelten Wirkungen durch Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion zu überprüfen hatte man auch im Rahmen dieser Untersuchungen kurze synthetische Peptide korrespondierend zur Sequenz der 2. extrazellulären Schleife des AT₁-R eingesetzt. Aufgrund der Strukturhomologie zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren hinsichtlich der 7 transmembranären Helices sowie der bekannten Erkenntnisse zur kritischen Lokalisation der ligandenbindenden Domäne ließ sich eine vergleichbare Position des entscheidenden Epitops für Rezeptor-aktivierende Antikörper auch in der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 annehmen. Die Sequenz dieser ligandenbindenden Domäne der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 ist bekannt.¹⁹⁵ Die in den vorliegenden Untersuchungen eingesetzte korrespondierende synthetische Peptidsequenz hatte bereits in Untersuchungen zur Charakterisierung des Einflusses von Autoantikörpern gegen PAR-1 auf die Funktion von Zellen des Herz-Kreislauf-Systems Anwendung gefunden.²¹³ Über die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hinaus sind für weitere Rezeptoren und Pathologien die Wirkung agonistischer Antikörper vermittelt über die 2. extrazelluläre Schleife G-Protein-gekoppelter Rezeptoren untersucht.²¹⁴⁻²¹⁹ Am PAR-1 sind, wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben, agonistisch-wirkende Antikörper bisher ausschließlich für Patienten mit primärem epitheliale Ovarialkarzinom beschrieben.⁹⁴ Im Rahmen einer klinischen Studie war eine ELISA-basierte Bestimmung der PAR-1-Antikörper-Serumkonzentration betroffener Patientinnen erfolgt. Diese stand in negativer Korrelation zur histologischen

Gradierung der Erkrankung. Ein angestrebter signifikanter Zusammenhang mit dem progressionsfreiem oder Gesamtüberleben ließ sich nicht nachweisen.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Proteinsequenz der 2. extrazellulären Schleife als bedeutsame Bindestelle für die Aktivierung Antikörper-vermittelter Mechanismen erneut bzw. am PAR-1 für die Niere erstmalig gezeigt.

4.5.2 Die Tx-Antikörper-induzierte GPCR-PAR-1-Aktivierung

Nachdem auch GPCR-unabhängige Interaktionen zwischen PAR-1 und ERK 1/2 beschrieben sind, sollte die durch Antikörper aktivierte G-Protein-gekoppelte Transduktion noch einmal bestätigt werden. Die Anwendung von 5 und 10 ng/ml Pertussistoxin vor PAR-1-Antikörper-positiver Tx-IgG-Stimulation hatte ein ERK 1/2-Phosphorylierungsniveau vergleichbar der nicht-antagonisierten Kontrolle bewirkt, währenddessen 50 ng/ml eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung von ERK 1/2 bedingte. Da Pertussistoxin, wie in Abschnitt 3.3.5 benannt, eine kovalente Modifikation der GPCR-Unterfamilien G_i , G_o und G_t bewirkt, kommt eine Aktivierung über andere in Zusammenhang mit PAR-1 bereits beschriebene GPCR-Unterfamilien weiterhin in Betracht. Eine fehlende wirksame Erniedrigung der Phosphorylierung von ERK 1/2 gegenüber der nicht PTX-behandelten Kontrolle unterstützt diese Annahme. Bekannt ist zudem eine präferenzielle Aktivierung Thrombins hinsichtlich $G_{\alpha_{12}}$ oder $G_{\alpha_{13}}$ neben der differierenden Affinität Thrombins auf verschiedene PAR-Subtypen. Insofern kann eine ebenso präferenzielle Aktivierung und Affinität einer Unterfamilie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch Antikörper nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren ist aus der Entwicklung von PAR-1-Antagonisten bekannt, dass durch die Dissoziationsrate eines aktivierenden bzw. inaktivierenden Liganden Einfluss auf den Umfang der Effekte vermittelt über den PAR-1 genommen werden kann.⁸⁴ So ist hinsichtlich Voraxapar, einem hoch-spezifischen, irreversiblen PAR-1-Antagonisten zwar eine Protektion vor rekurrenten Myokardinfarkten, diese jedoch mit einhergehenden erhöhten Blutungs-raten, erreicht worden. Nach diesen Erkenntnissen wurde die Entwicklung einer Substanz angestrebt, welche die Fähigkeit hat mit einer Dissoziationsrate an den PAR-1 zu binden, welche die Signaltransduktion am PAR-1 aktiviert bzw. in diesem Fall nicht aktiviert, jedoch den Rezeptor wiederum schnell genug für andere Agonisten bzw. Antagonisten freigibt. Die Dissoziationsrate der IgG wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Jedoch kann auch diese das vorliegende Ergebnis mitbedingen. Weiterhin wird für den SFLLRN-Liganden gemutmaßt, dass dieser in sequentieller Weise an den PAR-1 binden könnte, initial an die extrazelluläre Schleife, über eine Reihe von konformationellen Zwischenstadi-

en nachfolgend jedoch auch tiefer eintauchend in den Kern des Rezeptors.⁸⁴ Dies könnte ebenso auf Antikörper zutreffen, welche in Abhängigkeit deren Beschaffenheit differierende Effekte, wie vorliegend, zur Folge haben. Auch kann vergleichbar in der vorliegenden Arbeit gezeigter konzentrationsabhängiger Effekte Thrombins auf die Aktivierung von ERK 1/2 sowie tendenziell auf die weiteren untersuchten intrazellulären Signalkaskadenkomponenten bzgl. der hier vorliegenden konzentrationsabhängigen Effekte von Pertussistoxin eine differenzielle Wirkung der verbliebenen einwirkenden Dosis an Substrat nicht ausgeschlossen werden. Ebenso kann ein Feedback-Mechanismus als Ursache der induzierten Phosphorylierung mit Einsatz der höchsten Konzentration an Pertussistoxin in Frage kommen. Thrombin, PAR-1 und auch ERK 1/2 betreffende Feedbackmechanismen sind vorbeschrieben. So ist hinsichtlich der Produktion von Thrombin beispielsweise eine mittelbare Regulation über Protein C, dessen Produktion wiederum durch Thrombin initiiert wird, bekannt.²²⁰ Das produzierte Protein C seinerseits verhindert über einen negativen Feedbackmechanismus eine exzessive Produktion von Thrombin. Darüber hinaus ist auch phosphoryliertes ERK 1/2 an positiven und negativen Feedbackmechanismen im ERK-Signalweg beteiligt.²²¹ Beispielsweise löst die ERK-vermittelte SOS-Phosphorylierung hinsichtlich der Aktivierung von Ras einen negativen Feedbackmechanismus aus. Über einen positiven Feedbackmechanismus wiederum führt die ERK 1/2-induzierte RKIP-Phosphorylierung zu einer vermehrten Phosphorylierung von MEK und damit letztlich erneut von ERK. Ein Thrombin-PAR-1-ERK 1/2-Feedbackmechanismus ist bisher für den purinergen P2Y-Rezeptor an humanen Thrombozyten in Abhängigkeit von der Thromboxan A₂-Produktion untersucht.²²² Im Zusammenhang mit IL-6 ist in Burkittlymphomzelllinien eine ERK-abhängige IL-6-Feedbackschleife beschrieben.²²³ Die Komplexität nachgewiesener Interaktionen der ERK-Signalkaskade²²⁴ schließt das Vorliegen eines derartigen Mechanismus auch in den vorliegenden Untersuchungen nicht aus.

Weiterhin kommt als Ursache für den gezeigten Effekt der erhöhten ERK 1/2-Phosphorylierung ein analoger bei Mäusemastzellen beschriebener konzentrationsabhängiger Thrombin/PAR-1/IL-6-Mechanismus in Frage. Nachgewiesen wurde bei diesem, dass niedrige α -Thrombin-Konzentrationen zu einer synergistischen, bis zu 100-fach potenzierten IL-6-Ausschüttung führten, währenddessen hohe Konzentrationen lediglich einen additiven Effekt bedingten.²²⁵ Eine zu geringe Aktivierung des PAR-1 kann zu einer höher potenzierten ERK 1/2-Phosphorylierung geführt haben. Weiterhin ist aus Untersuchungen an kultivierten Rattenastrozyten bekannt, dass die PAR-1-abhängige Aktivierung der ERK-Signalkaskade sowohl durch einen Pertussistoxin-sensitiven G _{$\beta\gamma$} -phosphatidylinositol-3-kinase- als auch einen Pertussistoxin-insensitiven G_q-PLC-(InsP₃ Rezeptor)/Ca²⁺-PKC-

Signaltransduktionsmechanismus erfolgen kann.²²⁶ Beschrieben wurden diese Erkenntnisse die Thrombin-PAR-1-abhängige ERK 1/2-Aktivierung an HMEC-1-Zellen betreffend durch die Arbeitsgruppe McLaughlin et al.¹⁷⁸. Versuche zur Darstellung der G_q-abhängigen Antikörper-Aktivierung von PAR-1 z.B. durch Inhibition mit Bis I erfolgten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht. Eine Ergänzung in weiteren Experimenten wäre jedoch denkbar. In Zusammenschau mit den durchflusszytometrischen Experimenten zur Aktivierung des PAR-1 im zeitlichen Verlauf sowie den Versuchen zur Neutralisierung der Wirkung der PAR-1-Antikörper durch die eingesetzte synthetische, einer der funktionellen Konformation der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 entsprechenden Peptidsequenz und dem hiermit mittelbar nachgewiesenen Epitop der rezeptoraktivierenden Antikörper in der 2. extrazellulären Schleife des G-Protein-gekoppelten PAR-1 wurde mit dieser Arbeit jedoch gezeigt, dass PAR-1-Antikörper G-Protein-vermittelte Wirkungen auf ERK 1/2 ausüben. Der Subtyp bzw. die Untergruppen des/der verantwortlichen GPCR wurde vorliegend jedoch nicht näher analysiert.

4.6 Die Bedeutung von AKT^{Ser473} in der antikörper-induzierten PAR-1-Aktivierung im Kontext einer Transplantatnierenrejektion

Weiterhin sollten im Rahmen dieser Arbeit die Wirkungen gegen den PAR-1 gerichteter Tx-Antikörper auf AKT^{Ser473} untersucht werden. Aus diesem Grund wurde auch dessen Phosphorylierung sowohl nach Stimulation mit Thrombin als auch nach Stimulation mit Tx-IgG untersucht. Auch für AKT^{Ser473} ließ sich auf Proteinebene ein tendenziell zeit- und konzentrationsabhängiger Phosphorylierungseffekt Thrombins zeigen. Durch Inhibitorversuche mit Lepirudin ließ sich die Spezifität tendenziell jedoch nur für eine Stimulation mit 5 Units Thrombin/ml nachweisen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Lepirudininhibition zeigte sich die Wirkung einer PAR-1-Antagonisierung mit BMS-200261 auf AKT^{Ser473} in der Charakterisierung der HMEC-1-Zellen, sodass in der Zusammenschau eine differenzielle Wirkung der Thrombin-induzierten PAR-1-Aktivierung auf AKT^{Ser473} in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis an Thrombin angenommen werden kann. Dass PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG eine tendenziell erhöhte Phosphorylierung von AKT^{Ser473} bewirkt wurde gezeigt. Die PAR-1-Rezeptorspezifität ließ sich tendenziell bestätigen. Bezüglich Tx-IgG bewirkte eine Lepirudininhibition mit sinkender Konzentration eine steigende Phosphorylierung von AKT^{Ser473}, mit BMS-200261 jedoch wurden auch in hoher Antagonistendosis Phosphorylierungseffekte mit Tx-IgG erzielt. Einerseits können Tx-IgG-Effekte demnach mit einer Thrombinwirkung einhergehen, andererseits wirkt sich die PAR-1-Antagonisierung positiv

auf die Aktivierung von AKT^{Ser473} aus, sodass hier eine negativ regulierende Wirkung der PAR-1-Antikörper auf AKT^{Ser473} annehmbar wäre.

Vergleichbare Effekte hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der AKT^{Ser473}-Phosphorylierung sind durch die Arbeitsgruppe Minhajuddin et al.²²⁷ beschrieben. In Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen wurde eine Phosphorylierung von AKT nach 5 Minuten mit Stimulierung durch 5 Units/ml Thrombin in der Charakterisierung der mTOR-regulierten ICAM-1-Expression an HUVECs demonstriert, währenddessen nach 30 Minuten ebenso wie nach 1 und 2 Stunden keine erhöhte AKT-Phosphorylierung nachweisbar war. Ein zeitabhängiger, bis zu 120 Minuten währender Thrombin-induzierter PAR-1-vermittelter Effekt auf die AKT-Phosphorylierung wurde hingegen in murinen Bandscheiben mit einer deutlich geringeren Dosis von 100 nM Thrombin gezeigt.²⁰⁶ Auch hinsichtlich AKT sind in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit demnach dosisabhängige Effekte der Thrombin-induzierten Phosphorylierung nachzuvollziehen. Dass Thrombin in Abhängigkeit der eingesetzten Dosis differierende nachfolgende Prozesse induzieren kann, war, wie vorgenannt, bereits an HUVEC und HPAECs durch Bae et al.¹⁸⁷ gezeigt wurden. Wie in Abschnitt 4.5.1 für ERK 1/2 diskutiert kommt darüber hinaus auch ein Feedbackmechanismus hinsichtlich Thrombin-PAR-1-AKT in Betracht. Eine positive Feedbackschleife zwischen dem G-Proteingekoppelten Rezeptor EGFR, AKT sowie mTORC1 ist für die Proliferation squamöser Zellkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches beschrieben.²²⁸ Die AKT-kontrollierte mTORC1-Aktivierung von IKK/NF-κB steigert dabei die EGFR-Rezeptorexpression. Übereinstimmend mit der vorliegenden Annahme sind demnach extra- intrazelluläre Feedbackmechanismen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch für AKT bekannt.²²³

Wie vorgenannt sind PAR-1-Autoantikörper bisher ausschließlich für die Entität primärer epithelialer Ovarialkarzinome beschrieben.⁹⁴ Jedoch ist eine Beteiligung AKTs an fibrotischen Prozessen sowie der epithelial-mesenchymalen Transition im Rahmen chronischer Antikörper-vermittelter Transplantatnierenrejektionen bekannt.^{223,229} Im Gegensatz zur Wirkung des endogenen Aktivators Thrombin auf AKT^{Ser473}, führte eine PAR-1-Antagonisierung von Tx-IgG zu einer tendenziell erhöhten Aktivierung. Dass PAR-1-Antikörper eine negativ regulierende Funktion während Transplantatnierenrejektionen einnehmen können, wurde durch unsere Arbeitsgruppe für die Sekretion von VEGF nachgewiesen.²³⁰ Angenommen wird, dass die Hemmung der VEGF-Freisetzung und -verfügbarkeit durch PAR-1-Antikörper zur Aufrechterhaltung der endothelialen Dysfunktion beiträgt, sowie eine gestörte Gefäßintegrität aufrechterhält. Das Ergebnis der vorliegenden Experimente, dass PAR-1-Antikörper zu einer Dysregulation des an Prozessen der Proliferation, des Überlebens und der Angiogenese beteiligten AKTs führt ergänzt diese Entdeckung.

Daneben ist ein stimulatorischer Effekt von SSc-Immunglobulin auf die Phosphorylierung von AKT an glatten vaskulären Gefäßmuskelzellen (VSMCs) demonstriert wurden. Autoantikörper gegen den PDGF-Rezeptor standen in dieser Untersuchung in Interaktion mit dem EGFR-Rezeptor und bedingten eine Aktivierung von AKT. Diese führte unter Beteiligung von ERK 1/2 zu einer erhöhten Proteinsynthese und pro-fibrotischen Veränderungen.²³¹ Übereinstimmend mit den Hinweisen aus der Literatur wurden mit den vorliegenden Experimenten erstmalig endotheliale Wirkungen von PAR-1-Antikörper-positiven Immunglobulinen auf die Phosphorylierung von AKT^{Ser473} gezeigt.

4.7 Die Bedeutung der p70S6K in der antikörper-induzierten PAR-1-Aktivierung im Kontext einer Transplantatnierenrejektion

Schließlich sollte auch die Wirkung gegen den PAR-1 gerichteter Tx-Antikörper auf die p70S6K an der Phosphorylierungsposition Thr389 als Marker für eine Aktivierung der mTORC1-Aktivität untersucht werden. Daher wurde auch deren Aktivierung sowohl nach Stimulation mit Thrombin als auch nach Stimulation mit Tx-IgG untersucht.

Auch für die p70S6K^{Thr389} ließ sich ein tendenziell zeit- und konzentrationsabhängiger Effekt Thrombins auf die Phosphorylierung zeigen, dessen Spezifität mittels Lepirudin nachvollziehbar wurde. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Antagonisierung des PAR-1 auf AKT^{Ser473} zeigten sich die Effekte von BMS-200261 auf p70S6K^{Thr389}. Eine tendenzielle Reduktion der Thrombin-induzierten Phosphorylierung ließ sich nur für eine Stimulationsdosis von 5 Units Thrombin/ml nachweisen. PAR-1-Antikörper positives Tx-IgG stimulierte die Phosphorylierung von p70S6K^{Thr389}. Die Anwendung von Lepirudin führte nicht zu einer wirksamen Hemmung der Tx-induzierten Phosphorylierung. Demnach ließ sich ein IgG-induzierter Effekt darstellen. Eine Antagonisierung mit BMS-200261 vor Stimulation mit Tx-IgG konnte die Phosphorylierung induziert durch PAR-1-Antikörper-positives Tx-IgG für 10µM nicht wirksam hemmen. Bzgl. 1µM und 0,1µM zeigte sich ein der nicht antagonisierten Kontrolle vergleichbares Phosphorylierungsniveau der p70S6K^{Thr389}. Dieses Ergebnis zeigte sich ebenso in einem ergänzenden, nicht dargestellten Versuch hinsichtlich einer wirksamen Antagonisierung der Tx-IgG-induzierten Wirkung auf p70S6K^{Thr421/Ser424}. Nicht auszuschließen ist, dass Thrombin-PAR-1-vermittelt bei der Stimulation mit Tx-IgG ein basaler Phosphorylierungseffekt aufrechterhalten wird. Ursächlich könnte das in den Versuchen verwendete Minimalmedium, welches 0,5% FCS enthielt, sein. Dieses wurde in der Vorbereitung zwar gegen isotone Natriumchloridlösung dialysiert, jedoch nicht hitzeinaktiviert. Aus diesem Grund ist es möglich, dass sich Prothombin weiterhin im Zellkulturmedium befand und dieses durch endothelzellständige Proteinase, z.B. Fibrinogenlikeprotein

²³² in aktives Thrombin umgesetzt wurde. Dieses wiederum könnte einen basalen Phosphorylierungseffekt aufrechterhalten haben.

Bekannt ist aus den vorgenannten Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Minhajuddin et al.²²⁷ eine zeitabhängige Thrombin-induzierte Phosphorylierung der p70S6K^{Thr421/Ser424}. Diese zeigte sich in den vorliegenden Ergebnissen ebenso für die p70S6K^{Thr389}. Daneben ist auch an Transplantatnierenbiopsien bei Vorliegen einer verzögerten Transplantatfunktion eine erhöhte Phosphorylierung der p70S6K demonstriert wurden. Im Rahmen der benannten Arbeit erfolgten Untersuchungen zu Ischämie-Reperfusionsschäden an einem Schweinemodell.²³³ Immunhistochemisch wurde eine nach 15 Minuten beginnende, bis zu 45 Minuten andauernde Thrombin-induzierte p70S6K-Phosphorylierung gezeigt.

Wie auch hinsichtlich AKT^{Ser473} beschrieben kommt hinsichtlich der angedeuteten konzentrationsabhängigen Thrombineffekte auf die Phosphorylierung der p70S6K ebenso ein differenzieller Wirkmechanismus mit einem Feedbackmechanismus hinsichtlich Thrombin-PAR-1-S6K1 in Betracht. Ein Wirkungszusammenhang hinsichtlich PAR-1 und S6K1 ist bisher hinsichtlich der neuronalen Protektion im Rahmen eines ischämischen Geschehens an primären neuronalen Kulturen von Sprague-Dawley-Rattenembryonen untersucht.²³⁴ Daneben ist eine Interaktion in einem Mäusemodell zur Endometriose dargestellt.²³⁵ Weiterhin sind neutrale gegen den TSH Rezeptor der Schilddrüse gerichtete Antikörper im Rahmen autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen wie bspw. Morbus Basedow bekannt²³⁶, welche eine Aktivierung sowohl der S6K1 als auch des ERK-Signalweges bewirken.

Auch hier kommen demnach differenzielle Regulationsmechanismen der Antikörper-induzierten Pathologie in Betracht.

4.8 Die Wirkung PAR-1-Antikörper-positiver Tx-Immunglobulineluate auf die Sekretion von IL-6

Die Wirkung gegen den PAR-1-gerichteter Antikörper auf die endotheliale Inflammation wurde anhand der Sekretion von IL-6 an HMEC-1-Zellen untersucht.

Belegt wurde mittels Dosis- und Zeitreihen, dass die Stimulation von HMEC-1-Zellen mit PAR-1-Antikörper-positivem Immunglobulineluat zu einer tendenziell erhöhten Sekretion von IL-6 führt. Ein maximaler Effekt zeigte sich dabei mit 2 mg IgG sowie 24 Stunden nach erfolgter Stimulation. Mit der Reduktion der IL-6-Freisetzung durch den Einsatz des MEK-Inhibitors PD184352 (CI-1040) ließ sich zeigen, dass die Effekte auf IL-6 in Zusammenhang mit ERK 1/2 stehen. Sowohl durch den Einsatz des PAR-1-Antagonisten BMS-200261 als auch der synthetischen Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife ließ sich die IL-6-Sekretion wirksam reduzieren und demnach auf einen PAR-1-Wirkungseffekt zurückführen.

Erhöhte Serumkonzentrationen an IL-6 sind bei Patienten mit Transplantatnierenrejektionen¹¹⁵ bekannt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war eine zeit- und konzentrationsabhängige Thrombin-induzierte Produktion von IL-6 mit einer maximalen Freisetzung nach 24 Stunden bereits an synovialen Fibroblasten nachgewiesen wurden.¹⁸⁸ Ebenso war an HUVEC eine konzentrationsabhängige IL-6-Produktion demonstriert wurden.²³⁷ Dass auch Autoantikörper G-Protein-vermittelt Wirkungen auf die IL-6-Sekretion haben können ist anhand der Wirkung von IgG an Präeklampsie erkrankter Frauen untersucht wurden.²³⁸ Dieses hatte nach dem Transfer in schwangere Mäuse durch eine Aktivierung des AT₁-R auch an deren Nieren zu Nierenschädigungen geführt. Die Ergänzung dieser Untersuchungen an humanem Gewebe identifizierte Endothelzellen als entscheidendes Kompartiment für die pathologische Wirkungsentfaltung der AT₁-R-Autoantikörper-induzierten Prozesse. Resultierend in einer erhöhten IL-6-Produktion kommt es in deren Folge ebenso zu einer erhöhten Expression der vasokonstriktiven Substanz ET-1, welche abermals über einen endothelialen G-Protein-gekoppelten Rezeptor Signale transduziert.

In humanen primären Mesangium- und proximalen Tubuluszellen wurde beschrieben, dass die IL-6-Produktion intrazellulär durch ERK 1/2 mediiert wird.²³⁹ Eine relevante Rolle wurde ERK 1/2 darüberhinaus in SSc-Fibroblasten in der Vermittlung profibrotischer Effekte nachgewiesen.²⁴⁰ Auch in den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde eine Reduktion einer Immunglobulinelat-induzierten IL-6-Freisetzung durch den MEK-Inhibitor PD184352 nachgewiesen. In weiteren aktuellen Experimenten an Burkittlymphomzelllinien wurde durch die Anwendung des MEK-Inhibitors Trametinib die Phosphorylierung von ERK 1/2 und die hieraus resultierende IL-6-Sekretion wirksam reduziert.²²³ Darüber hinaus wurde in der vorgenannten Untersuchung eine ERK/IL-6-Feedbackschleife durch Trametinib nachweislich unterbrochen und eine hierdurch bestehende Chemoresistenz überwunden.

Eine Vielzahl von Untersuchungen zu proinflammatorischen PAR-1-mediierten Prozessen liegt für den Kontext respiratorischer²⁴¹ oder allergischer^{242,243} Erkrankungen vor. Nur einzelne Untersuchungen haben die Interaktion von PAR-1 mit IL-6 hinsichtlich renaler Effekte zum Gegenstand. In einer Untersuchung zur Wirkung des natürlichen Thrombininhibitors Hirudin an Rattennieren wurde eine Reduktion von PAR-1 und IL-6 nach Anwendung von Hirudin gezeigt.²⁴⁴ Es wurde dem anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch wirkendem Hirudin eine nierenprotektive Wirkung mit Unterdrückung der inflammatorischen Reaktion, der Ablagerung von extrazellulärer Matrix im renalen Interstitium sowie einer Verbesserung einer renalen Schädigung nachgewiesen. Daneben ist eine PAR-1-Expression weiterhin in transplantatinfiltierenden dendritischen Zellen untersucht.²⁴⁵ Diesen wurde eine pathogene Rolle

in einer erworbenen allogenen Immunantwort mit resultierender Transplantatschädigung zugeschrieben.

In Untersuchungen zur Anwendung des monoklonalen Antikörpers Tocilizumab gegen den IL-6R in therapierefraktären chronischen Antikörper-vermittelten Transplantatnierenrejektionen mit Transplantatglomerulopathie in HLA-sensibilisierten Transplantatempfängern²⁴⁶ wurde gezeigt, dass Tocilizumab die Konzentration donorspezifischer Antikörper signifikant reduzierte, die renale Funktion stabilisierte und positive Effekte auf Transplantatüberleben und das Patientenüberleben hatte. Eine aktuelle Phase II-Pilotstudie zur Wirksamkeit des direkten IL-6-Antikörpers Clazakizumab bei späten antikörper-mediierten Transplantatnierenrejektionen bestätigte erneut den benefiziellen Effekt einer Neutralisierung von IL-6 auf den Erkrankungsverlauf.²⁴⁷ Ein Zusammenhang zwischen IL-6 und non-HLA-Antikörper-vermittelten Transplantatnierenrejektionen ist in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Mit den vorliegenden Analysen ist erstmalig gezeigt worden, dass PAR-1-Antikörper-positiv Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion zu einer vermehrten Sekretion von IL-6 führen. Weiterhin ließ sich durch den Einsatz des MEK-Inhibitors PD184352 nachvollziehen, dass der gezeigte Effekt in Zusammenhang mit ERK 1/2 vermittelt wurde. Aus diesem Grund ließ sich die erhöhte Sekretion von IL-6 mittels MEK-Inhibition reduzieren. Auch die Hypothese, dass gegen den GPCR PAR-1 gerichtete Antikörper auf die endotheliale Inflammation wirken, ließ sich durch die nachgewiesene PAR-1-abhängige Sekretion von IL-6 bestätigen. Nachgewiesen wurde darüberhinaus die agonistische Wirkung der PAR-1-Antikörper an einem Epitop der 2. extrazellulären Schleife.

4.9 Die Wirkung von IgG gesunder Probanden (Kon-IgG) auf PAR-1 sowie die untersuchten intrazellulären Signalwegskomponenten

Zum Verständnis der pathogenetischen Bedeutung von gegen den G-Protein-gekoppelten PAR-1 gerichteten Antikörpern im Kontext einer Transplantatnierenrejektion erfolgten Tx-IgG-Experimente im Vergleich zu Immunglobulineluates gesunder Probanden (Kon-IgG).

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass durchflusszytometrisch eine Aktivierung des PAR-1 auch durch IgG gesunder Probanden vorlag. In den Versuchen zur Darstellung der konzentrationsabhängigen Aktivierung sowie des zeitlichen Verlaufs der PAR-1-Aktivierung zeigte sich zudem eine Aktivierung von ERK 1/2 mit einem Maximum in einer Konzentration von 0,5 mg/ml bzw. nach 10 Minuten nach erfolgter Stimulation mit Immunglobulineluates gesunder Probanden. Auch hinsichtlich Akt^{Ser473} bzw. p70S6K^{Thr389} deuteten sich durch Kon-IgG induzierte Phosphorylierungseffekte mit einem maximalen Anstieg nach 15 bzw. 30 Minuten gegenüber der nicht behandelten Kontrolle an. Eine Inhibition mit

Thrombin vor Stimulation mit IgG gesunder Probanden führte hinsichtlich ERK 1/2 zu einer tendenziellen Reduktion der Phosphorylierung und läßt sich somit in Zusammenhang mit der Wirkung Thrombins stellen. Auch reduzierte der PAR-1-Antagonist BMS-200261 die Wirkung von Kon-IgG auf die Phosphorylierung von ERK 1/2. Diese BMS-200261-induzierte tendenzielle Reduktion ließ sich nur für Akt^{Ser473}, nicht aber für p70S6K^{Thr389} zeigen. Hingegen führte die Anwendung der synthetischen Peptidsequenz der 2. extrazellulären Schleife des PAR-1 vor Applikation von Immunglobulineluatens gesunder Probanden nicht zu einer reduzierenden Wirkung auf die Phosphorylierung von ERK 1/2. Hinsichtlich IL-6 zeigte die Stimulation mit Kon-IgG einen deutlich geringeren sowie im zeitlichen Verlauf später auftretenden Effekt auf die Expression als die Anwendung von Tx-IgG.

Dass auch gesunde Probanden gegen PAR-gerichtete Antikörper aufweisen, wurde ebenso in bisher nicht veröffentlichten Experimenten unserer Arbeitsgruppe zur funktionellen Charakterisierung der endothelvermittelten PAR-2-Aktivierung nachgewiesen. Weiterhin ließ sich in diesen Versuchen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass PAR-Antikörper gesunder Probanden zur Aktivierung ebenjener Signalkaskaden führten, welche ebenso durch PAR-Antikörper-positive Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion aktiviert wurden. Die gemeinsame Aktivierung derselben untersuchten Signalwegskomponenten resultierte jedoch in Abhängigkeit des gesunden oder pathologischen Kontextes in einer differenziellen, das heißt einer pro- oder antiangiogenen Wirkung. Über die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hinaus zeigten auch die Untersuchungen zu Autoantikörpern gegen den PAR-1 bei Patientinnen mit primärem epitheliale ovariellem Karzinom erniedrigte Antikörpertiter der Erkrankten gegenüber den gesunden Probandinnen und assoziierten diese in negativer Korrelation zum Erkrankungsstadium und somit differierenden Wirkungen in Abhängigkeit des Kontextes.⁹⁴ Die Annahme, dass Autoantikörper gerichtet gegen GPCR eine physiologische Komponente des humanen Immunsystems darstellen unterstützen Untersuchungen von Cabral-Marques et al.²⁴⁸ Diese wiesen eine spezifische anti-GPCR-Autoantikörper-Netzwerksignatur in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht bei gesunden Untersuchten nach. Diese unterschied sich deutlich von Pathologie-assoziierten Netzwerksignaturen wie beispielsweise jener einer systemischen Sklerose, einer wie vorgenannt ebenso mit einer Vaskulopathie einhergehenden Erkrankung. Hypothesiert wird, dass erst die Dysregulation des natürlichen Netzwerkes zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen führt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der Wirkung von Immunglobulineluatens gesunder Probanden können demnach auch als Grundlage für weitere Untersuchungen zu anti-GPCR-Antikörper-Netzwerken bei Gesunden dienen.

4.10 Limitationen der Arbeit

Bei der Betrachtung der Untersuchungen dieser Arbeit ist zu berücksichtigen, dass diese als Experimente zur Wirkung von Antikörpern gegen den Protease-aktivierten Rezeptor-1 auf molekulare Pathomechanismen bei der Abstoßung von Transplantatnieren sowie bei der renalen Krise im Rahmen einer systemischen Sklerose (Daten nicht gezeigt) angelegt war, da beiden Pathologien eine sich gleichende Phänotypie sowie die Genese der Vasculopathie in der mikrovaskulären Endothelzelle gemein ist. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen in einer vergleichsweise kleinen Anzahl für den jeweiligen Einzelversuch reproduziert. Dies ist bei der Interpretation dieser Daten zu beachten. Nachdem sich abzeichnete, dass ERK 1/2 eine bedeutsame Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion einnimmt, wurden die Untersuchungen zu den weiteren Signalkaskadenkomponenten mit lediglich explorativen Charakter fortgeführt.

Zudem kann mittels Western-Blot zwar eine eindeutige Identifizierung spezifischer Proteine erfolgen, eine Quantifizierung erfolgt jedoch in relativer Bestimmung. Weiterhin ist auf die mitunter große Variabilität mit Wertedifferenz in den Versuchen mit PAR-1-Antikörperpositiven Immunglobulineluat hinzuweisen. Diese kann auch Folge differierender IgG-Konzentrationen zwischen verschiedenen angewendeten Isolaten eines Patienten sein. Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis und letztlich auch die exakte Quantifizierung eines ausgewählten Proteins mittels ELISA. Hier ließen sich die Ergebnisse aus den Western-Blot-Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Experimenten bestätigen. Die statistische Analyse dieser Daten zeigte, dass diese robust und reproduzierbar sind.

Nicht auszuschließen ist, dass sich im eingesetzten Immunglobulineluat verschiedene Antikörper befanden, welche Wirkungen auf die untersuchten intrazellulären Signalkaskadenkomponenten oder IL-6 zeigten. Dies gilt es insbesondere hinsichtlich der Beschreibung neutralisierender Autoantikörper gegen IL-6 zu beachten.²⁴⁹ Die Spezifität der gezeigten Ergebnisse wurde aus diesem Grund mittels pharmakologischer Rezeptorblockaden bestätigt. Weiterhin wurden Auswirkungen auf die Sekretion von IL-6 und nicht die Wirkung von IL-6 auf weitere Faktoren untersucht. Zu berücksichtigen bleibt dieser Aspekt jedoch hinsichtlich des potenziellen Feedbackmechanismus und dessen Regulation.

Darüber hinaus dient die S6K zwar als weithin genutzter Marker für die Aktivität von mTORC1, ein eindeutiger Nachweis der mTOR-Beteiligung ist jedoch durch den ergänzenden Einsatz von Rapamycin zu bestätigen. Die erhaltenen Ergebnisse können demnach als Basis für weitere Experimente dienen.

4.11 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Antikörpern wird als Kennzeichen von Autoimmunerkrankungen, deren Aktivität und Prognose eine entscheidende Bedeutung zugeschrieben.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig nachgewiesen, dass gegen den PAR-1-gerichtete Antikörper an pathologischen endothelialen Prozessen der Transplantatnierenrejektion mitwirken. Antikörper-induziert erfolgte die Aktivierung des PAR-1. Darüber hinaus stimulierten Antikörper-positive Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion die Aktivierung von ERK 1/2 tendenziell unabhängig von Thrombin. Dies deutete sich ebenso für die weiteren untersuchten Signalwegskomponenten an. Eine spezifische pharmakologische Blockade bestätigte die PAR-1-Aktivierung von ERK 1/2.

Weiterhin ist mit den vorliegenden Analysen erstmalig der Nachweis gelungen, dass PAR-1-Antikörper-positive Immunglobulineluate von Patienten mit Transplantatnierenrejektion zu einer vermehrten Sekretion von IL-6 führen. Damit wurde erstmalig eine Wirkung gegen den PAR-1-gerichteter Antikörper auf die endotheliale Inflammation dieser Pathologie nachgewiesen. Durch den Einsatz des MEK-Inhibitors PD184352 ließ sich zudem zeigen, dass die erhöhte Sekretion von IL-6 unter Beteiligung von ERK 1/2 erfolgte.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass gegen den GPCR PAR-1 gerichtete Antikörper über ERK 1/2 die Sekretion von IL-6 unterhalten können. Damit ließ sich erstmalig zeigen, dass gegen den PAR-1-gerichtete Antikörper an pathologischen endothelialen Prozessen der Transplantatnierenrejektion mitwirken und über IL-6 die endotheliale Inflammation unterhalten können.

Die vorliegenden Ergebnisse können somit als Grundlage für zukünftige Untersuchungen sowohl die Genese als auch die Therapie der Transplantatnierenrejektion betreffend dienen. Sie können dabei maßgeblich zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, z.B. hinsichtlich der Anwendung von pharmakologischen Mehrfachkombinationen zur Behandlung betroffener Patienten beitragen.

4.12 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmalig einen Zusammenhang zwischen gegen PAR-1-gerichteten Antikörpern, der intrazellulären Regulation über ERK 1/2 sowie der Sekretion von IL-6 an mikrovaskulärem Endothel. Der Erfolg der Nierentransplantation zeigt sich durch die ausbleibenden Erfolge zur Verbesserung des Langzeittransplantatüberlebens beeinträchtigt. Mit Nachweis der gemeinsamen Beteiligung von PAR-1, ERK 1/2 und IL-6 an Prozessen der mikrovaskulären renalen Vaskulopathie gelang die Identifizierung weiterer therapeutischer Zielstrukturen zur Behandlung der Pathologie. Die vorliegenden Ergebnisse sind daher von entscheidender klinischer Relevanz. Zielgerichtete Therapiestrategien gewannen seit Identifizierung intrazellulärer Signalkaskaden vor allem in der Behandlung onkologischer Erkrankungen zunehmend an Bedeutung.²⁵⁰ Medikamente, die zur Behandlung onkologischer Erkrankungen entwickelt worden waren, werden heute auch bei der Rejektion von Transplantatnieren eingesetzt. Durch die zentrale Rolle des ERK-Signalweges in einer Vielzahl diverser Prozesse in verschiedenen Zellen kann insbesondere die MEK-Inhibition eine zentrale Rolle mit signifikantem klinischen Benefit in der Behandlung von Pathologien spielen.¹⁷³ Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte oral verfügbare MEK-Inhibitor PD184352 (CI-1040) wurde bereits erfolgreich in klinischen Studien der Phase 1 angewendet.¹⁷³ Diese bestätigten seine Sicherheit sowie das pharmakologische Profil einer kontinuierlichen täglichen Anwendung. Gemeinsam mit dem ebenso in klinischer Anwendung befindlichen Tocilizumab bzw. Clazakizumab sowie Voraxapar als oral verfügbarem, in klinischem Gebrauch befindlichen PAR-1-Inhibitor^{251,252}, ist eine Kombinationstherapie zur Behandlung non-HLA-medierter-Transplantatnierenrejektionen auf Grundlage der vorliegenden prä-klinischen Versuche durchaus vorstellbar geworden. Ergänzende klinische Untersuchungen zu Nebenwirkungen und Dosierung der Substrate werden empfohlen. Darüber hinaus ist durch die Identifikation eines weiteren non-HLA-Antikörpers die Grundlage für weitere Untersuchungen zwischen HLA- und non-HLA-Antikörper-mediierten Effekten auch synergistischer Natur bei Transplantatnierenrejektionen gelegt.

Literaturverzeichnis

- 1 Chaplin, D. D. 1. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* **117**, S430-435, doi:10.1016/j.jaci.2005.09.034 (2006).
- 2 Wardemann, H. & Nussenzweig, M. C. B-cell self-tolerance in humans. *Adv Immunol* **95**, 83-110, doi:10.1016/S0065-2776(07)95003-8 (2007).
- 3 Kivity, S., Agmon-Levin, N., Blank, M. & Shoenfeld, Y. Infections and autoimmunity--friends or foes? *Trends Immunol* **30**, 409-414, doi:10.1016/j.it.2009.05.005 (2009).
- 4 Shoenfeld, Y., Blank, M., Abu-Shakra, M., Amital, H., Barzilai, O., Berkun, Y., Bizzaro, N., Gilburd, B., Zandman-Goddard, G., Katz, U., Krause, I., Langevitz, P., Mackay, I. R., Orbach, H., Ram, M., Sherer, Y., Toubi, E. & Gershwin, M. E. The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases--2008. *Isr Med Assoc J* **10**, 13-19 (2008).
- 5 Fujii, T. Direct and indirect pathogenic roles of autoantibodies in systemic autoimmune diseases. *Allergol Int* **63**, 515-522, doi:10.2332/allergolint.14-RAI-0801 (2014).
- 6 van Venrooij, W. J., Zendman, A. J. & Pruijn, G. J. Autoantibodies to citrullinated antigens in (early) rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* **6**, 37-41, doi:10.1016/j.autrev.2006.03.008 (2006).
- 7 Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A. & Harley, J. B. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* **349**, 1526-1533, doi:10.1056/NEJMoa021933 (2003).
- 8 Weiner, E. S., Hildebrandt, S., Senecal, J. L., Daniels, L., Noell, S., Joyal, F., Roussin, A., Earnshaw, W. & Rothfield, N. F. Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. A prospective study. *Arthritis Rheum* **34**, 68-77, doi:10.1002/art.1780340111 (1991).
- 9 Coutinho, A., Kazatchkine, M. D. & Avrameas, S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* **7**, 812-818, doi:10.1016/0952-7915(95)80053-0 (1995).
- 10 Lacroix-Desmazes, S., Kaveri, S. V., Mouthon, L., Ayoub, A., Malanchere, E., Coutinho, A. & Kazatchkine, M. D. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods* **216**, 117-137, doi:10.1016/s0022-1759(98)00074-x (1998).
- 11 Naparstek, Y. & Plotz, P. H. The role of autoantibodies in autoimmune disease. *Annu Rev Immunol* **11**, 79-104, doi:10.1146/annurev.iy.11.040193.000455 (1993).
- 12 Bei, R., Masuelli, L., Palumbo, C., Modesti, M. & Modesti, A. A common repertoire of autoantibodies is shared by cancer and autoimmune disease patients: Inflammation in their induction and impact on tumor growth. *Cancer Lett* **281**, 8-23, doi:10.1016/j.canlet.2008.11.009 (2009).
- 13 Gleicher, N., Barad, D. & Weghofer, A. Functional autoantibodies, a new paradigm in autoimmunity? *Autoimmun Rev* **7**, 42-45, doi:10.1016/j.autrev.2007.06.001 (2007).
- 14 Gunther, J., Rademacher, J., van Laar, J. M., Siegert, E. & Riemekasten, G. Functional autoantibodies in systemic sclerosis. *Semin Immunopathol* **37**, 529-542, doi:10.1007/s00281-015-0513-5 (2015).
- 15 Guild, W. R., Harrison, J. H., Merrill, J. P. & Murray, J. Successful homotransplantation of the kidney in an identical twin. *Trans Am Clin Climatol Assoc* **67**, 167-173 (1955).
- 16 Murray, J. E., Merrill, J. P. & Harrison, J. H. Kidney transplantation between seven pairs of identical twins. *Ann Surg* **148**, 343-359 (1958).
- 17 Kuss, R., Legrain, M., Mathe, G., Nedey, R. & Camey, M. Homologous human kidney transplantation. Experience with six patients. *Postgrad Med J* **38**, 528-531, doi:10.1136/pgmj.38.443.528 (1962).
- 18 Hatzinger, M., Stastny, M., Grutzmacher, P. & Sohn, M. [The history of kidney transplantation]. *Urologe A* **55**, 1353-1359, doi:10.1007/s00120-016-0205-3 (2016).

- 19 Dealy, J. B., Jr., Dammin, G. J., Murray, J. E. & Merrill, J. P. Total body irradiation in man: tissue patterns observed in attempts to increase the receptivity of renal homografts. *Ann N Y Acad Sci* **87**, 572-585 (1960).
- 20 Morris, P. J. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *N Engl J Med* **351**, 2678-2680, doi:10.1056/NEJMp048256 (2004).
- 21 Schwartz, R. & Dameshek, W. The effects of 6-mercaptopurine on homograft reactions. *J Clin Invest* **39**, 952-958, doi:10.1172/JCI104116 (1960).
- 22 Chamberlain, G., Baboolal, K., Bennett, H., Pockett, R. D., McEwan, P., Sabater, J. & Sennfalt, K. The economic burden of posttransplant events in renal transplant recipients in Europe. *Transplantation* **97**, 854-861, doi:10.1097/01.TP.0000438205.04348.69 (2014).
- 23 Sayegh, M. H. & Carpenter, C. B. Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises. *N Engl J Med* **351**, 2761-2766, doi:10.1056/NEJMon043418 (2004).
- 24 Kaplan, B. & Meier-Kriesche, H. U. Renal transplantation: a half century of success and the long road ahead. *J Am Soc Nephrol* **15**, 3270-3271, doi:10.1097/01.ASN.0000146569.59482.8C (2004).
- 25 Bowman, L. J. & Brennan, D. C. The role of tacrolimus in renal transplantation. *Expert Opin Pharmacother* **9**, 635-643, doi:10.1517/14656566.9.4.635 (2008).
- 26 Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* **9 Suppl 3**, S1-155, doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02834.x (2009).
- 27 Axelrod, D. A., Naik, A. S., Schnitzler, M. A., Segev, D. L., Dharnidharka, V. R., Brennan, D. C., Bae, S., Chen, J., Massie, A. & Lentine, K. L. National Variation in Use of Immunosuppression for Kidney Transplantation: A Call for Evidence-Based Regimen Selection. *Am J Transplant* **16**, 2453-2462, doi:10.1111/ajt.13758 (2016).
- 28 Jurgensen, J. S., Arns, W. & Hass, B. Cost-effectiveness of immunosuppressive regimens in renal transplant recipients in Germany: a model approach. *Eur J Health Econ* **11**, 15-25, doi:10.1007/s10198-009-0148-3 (2010).
- 29 Hariharan, S., Johnson, C. P., Bresnahan, B. A., Taranto, S. E., McIntosh, M. J. & Stablein, D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* **342**, 605-612, doi:10.1056/NEJM200003023420901 (2000).
- 30 Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D. & Kaplan, B. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *Am J Transplant* **4**, 1289-1295, doi:10.1111/j.1600-6143.2004.00515.x (2004).
- 31 Marcen, R. & Teruel, J. L. Patient outcomes after kidney allograft loss. *Transplant Rev (Orlando)* **22**, 62-72, doi:10.1016/j.ttre.2007.09.005 (2008).
- 32 Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R. & Kaplan, B. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. *Am J Transplant* **4**, 378-383 (2004).
- 33 Hart, A., Smith, J. M., Skeans, M. A., Gustafson, S. K., Wilk, A. R., Castro, S., Robinson, A., Wainright, J. L., Snyder, J. J., Kasiske, B. L. & Israni, A. K. OPTN/SRTR 2017 Annual Data Report: Kidney. *Am J Transplant* **19 Suppl 2**, 19-123, doi:10.1111/ajt.15274 (2019).
- 34 Schaefer, H. M. Long-term management of the kidney transplant recipient. *Blood Purif* **33**, 205-211, doi:10.1159/000334158 (2012).
- 35 Kabbalo, M. A., Canney, M., O'Kelly, P., Williams, Y., O'Seaghda, C. M. & Conlon, P. J. A comparative analysis of survival of patients on dialysis and after kidney transplantation. *Clin Kidney J* **11**, 389-393, doi:10.1093/ckj/sfx117 (2018).
- 36 Fiebiger, W., Mitterbauer, C. & Oberbauer, R. Health-related quality of life outcomes after kidney transplantation. *Health Qual Life Outcomes* **2**, 2, doi:10.1186/1477-7525-2-2 (2004).
- 37 Wolfe, R. A., Ashby, V. B., Milford, E. L., Ojo, A. O., Ettenger, R. E., Agodoa, L. Y., Held, P. J. & Port, F. K. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis

- awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* **341**, 1725-1730, doi:10.1056/NEJM199912023412303 (1999).
- 38 Frei, U., Schober-Halstenberg, H.-J. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007 [online] https://www.bundesverband-niere.de/wp/wp-content/uploads/2019/02/QuaSi-Niere-Bericht_2006-2007.pdf (2008). (accessed 17.04.2019)
- 39 DSO. Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2019 [online] https://www.dso.de/SiteCollectionDocuments/DSO-Jahresbericht_2019.pdf (2020). (accessed 13.02.2021)
- 40 Halloran, P. F. Call for revolution: a new approach to describing allograft deterioration. *Am J Transplant* **2**, 195-200 (2002).
- 41 Prommool, S., Jhangri, G. S., Cockfield, S. M. & Halloran, P. F. Time dependency of factors affecting renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* **11**, 565-573 (2000).
- 42 Nankivell, B. J. & Alexander, S. I. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* **363**, 1451-1462, doi:10.1056/NEJMra0902927 (2010).
- 43 Solez, K., Axelsen, R. A., Benediktsson, H., Burdick, J. F., Cohen, A. H., Colvin, R. B., Croker, B. P., Droz, D., Dunnill, M. S., Halloran, P. F., Häyry, P., Jennette, J. C., Keown, P. A., Marcussen, N., Mihatsch, M. J., Morozumi, K., Myers, B. D., Nast, C. C., Olsen, S., Racusen, L. C., Ramos, E. L., Rosen, S., Sachs, D. H., Salomon, D. R., Sanfilippo, F., Verani, R., von Willebrand, E. & Yamaguchi, Y. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int* **44**, 411-422 (1993).
- 44 Waiser, J., Schreiber, M., Budde, K., Bohler, T., Kraus, W., Hauser, I., Riess, R. & Neumayer, H. H. Prognostic value of the Banff classification. *Transpl Int* **13 Suppl 1**, S106-111 (2000).
- 45 Racusen, L. C., Solez, K., Colvin, R. B., Bonsib, S. M., Castro, M. C., Cavallo, T., Croker, B. P., Demetris, A. J., Drachenberg, C. B., Fogo, A. B., Furness, P., Gaber, L. W., Gibson, I. W., Glotz, D., Goldberg, J. C., Grande, J., Halloran, P. F., Hansen, H. E., Hartley, B., Hayry, P. J., Hill, C. M., Hoffman, E. O., Hunsicker, L. G., Lindblad, A. S., Marcussen, N., Mihatsch, M. J., Nadasdy, T., Nickerson, P., Olsen, T. S., Papadimitriou, J. C., Randhawa, P. S., Rayner, D. C., Roberts, I., Rose, S., Rush, D., Salinas-Madrigal, L., Salomon, D. R., Sund, S., Taskinen, E., Trpkov, K. & Yamaguchi, Y. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* **55**, 713-723, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00299.x (1999).
- 46 Rodriguez Cubillo, B., Perez Flores, I., Calvo, N., Pascual, A., Cortes, J. A., Moreno, M. A., Blanco, J. & Sanchez Fructuoso, A. Antibody-Mediated Acute Vascular Rejection of Kidney Allografts: Fifteen-Year Follow-up. *Transplant Proc* **48**, 2917-2919, doi:10.1016/j.transproceed.2016.09.015 (2016).
- 47 Lefaucheur, C., Loupy, A., Vernerey, D., Duong-Van-Huyen, J. P., Suberbielle, C., Anglicheau, D., Verine, J., Beuscart, T., Nochy, D., Bruneval, P., Charron, D., Delahousse, M., Empana, J. P., Hill, G. S., Glotz, D., Legendre, C. & Jouven, X. Antibody-mediated vascular rejection of kidney allografts: a population-based study. *Lancet* **381**, 313-319, doi:10.1016/S0140-6736(12)61265-3 (2013).
- 48 Loupy, A. & Lefaucheur, C. Antibody-Mediated Rejection of Solid-Organ Allografts. *N Engl J Med* **379**, 1150-1160, doi:10.1056/NEJMra1802677 (2018).
- 49 Gubensek, J., Buturovic-Ponikvar, J., Kandus, A., Arnol, M., Lindic, J., Kovac, D., Rigler, A. A., Romozi, K. & Ponikvar, R. Treatment of Antibody-Mediated Rejection After Kidney Transplantation - 10 Years' Experience With Apheresis at a Single Center. *Ther Apher Dial* **20**, 240-245, doi:10.1111/1744-9987.12430 (2016).
- 50 Pascual, M., Saidman, S., Tolkoff-Rubin, N., Williams, W. W., Mauiyyedi, S., Duan, J. M., Farrell, M. L., Colvin, R. B., Cosimi, A. B. & Delmonico, F. L. Plasma exchange and tacrolimus-mycophenolate rescue for acute humoral rejection in kidney transplantation. *Transplantation* **66**, 1460-1464, doi:10.1097/00007890-199812150-00008 (1998).
- 51 Bohmig, G. A., Wahrmann, M., Regele, H., Exner, M., Robl, B., Derfler, K., Soliman, T., Bauer, P., Mullner, M. & Druml, W. Immunoabsorption in severe C4d-positive acute

- kidney allograft rejection: a randomized controlled trial. *Am J Transplant* **7**, 117-121, doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01613.x (2007).
- 52 Colvin, R. B. Antibody-mediated renal allograft rejection: diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* **18**, 1046-1056, doi:10.1681/ASN.2007010073 (2007).
- 53 Himmelfarb J, Ikizler TA Chronic Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation 2019 Elsevier Philadelphia 605-620
- 54 Mauiyyedi, S., Crespo, M., Collins, A. B., Schneeberger, E. E., Pascual, M. A., Saidman, S. L., Tolkoff-Rubin, N. E., Williams, W. W., Delmonico, F. L., Cosimi, A. B. & Colvin, R. B. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* **13**, 779-787 (2002).
- 55 Nicleleit, V., Zeiler, M., Gudat, F., Thiel, G. & Mihatsch, M. J. Detection of the complement degradation product C4d in renal allografts: diagnostic and therapeutic implications. *J Am Soc Nephrol* **13**, 242-251 (2002).
- 56 Regele, H., Exner, M., Watschinger, B., Wenter, C., Wahrmann, M., Osterreicher, C., Saemann, M. D., Mersich, N., Horl, W. H., Zlabinger, G. J. & Bohmig, G. A. Endothelial C4d deposition is associated with inferior kidney allograft outcome independently of cellular rejection. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 2058-2066, doi:10.1093/ndt/16.10.2058 (2001).
- 57 Lederer, S. R., Kluth-Pepper, B., Schneeberger, H., Albert, E., Land, W. & Feucht, H. E. Impact of humoral alloreactivity early after transplantation on the long-term survival of renal allografts. *Kidney Int* **59**, 334-341, doi:10.1046/j.1523-1755.2001.00495.x (2001).
- 58 Haas, M., Loupy, A., Lefaucheur, C., Roufosse, C., Glotz, D., Seron, D., Nankivell, B. J., Halloran, P. F., Colvin, R. B., Akalin, E., Alachkar, N., Bagnasco, S., Bouatou, Y., Becker, J. U., Cornell, L. D., van Huyen, J. P. D., Gibson, I. W., Kraus, E. S., Mannon, R. B., Naesens, M., Nicleleit, V., Nickerson, P., Segev, D. L., Singh, H. K., Stegall, M., Randhawa, P., Racusen, L., Solez, K. & Mengel, M. The Banff 2017 Kidney Meeting Report: Revised diagnostic criteria for chronic active T cell-mediated rejection, antibody-mediated rejection, and prospects for integrative endpoints for next-generation clinical trials. *Am J Transplant* **18**, 293-307, doi:10.1111/ajt.14625 (2018).
- 59 Rush, D., Nickerson, P., Gough, J., McKenna, R., Grimm, P., Cheang, M., Trpkov, K., Solez, K. & Jeffery, J. Beneficial effects of treatment of early subclinical rejection: a randomized study. *J Am Soc Nephrol* **9**, 2129-2134 (1998).
- 60 de Fijter, J. W. Rejection and function and chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl*, S38-41, doi:10.1038/ki.2010.421 (2010).
- 61 Paul, L. C. Chronic allograft nephropathy: An update. *Kidney Int* **56**, 783-793, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00611.x (1999).
- 62 Terasaki, P. I. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* **3**, 665-673 (2003).
- 63 Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* **401**, 921-923, doi:10.1038/44853 (1999).
- 64 Sheldon, S. & Poulton, K. HLA typing and its influence on organ transplantation. *Methods Mol Biol* **333**, 157-174, doi:10.1385/1-59745-049-9:157 (2006).
- 65 Ascher, N. L., Simmons, R. L., Noreen, H., VanHook, J., Howard, R. J., Sutherland, D. E. & Najarian, J. S. 100 HLA-identical sibling transplants. Prognostic factors other than histocompatibility. *Ann Surg* **189**, 209-216, doi:10.1097/00000658-197902000-00013 (1979).
- 66 Williams, R. C., Opelz, G., McGarvey, C. J., Weil, E. J. & Chakkera, H. A. The Risk of Transplant Failure With HLA Mismatch in First Adult Kidney Allografts From Deceased Donors. *Transplantation* **100**, 1094-1102, doi:10.1097/TP.0000000000001115 (2016).
- 67 Montgomery, R. A., Tatapudi, V. S., Leffell, M. S. & Zachary, A. A. HLA in transplantation. *Nat Rev Nephrol* **14**, 558-570, doi:10.1038/s41581-018-0039-x (2018).
- 68 Tambur, A. R. & Claas, F. H. HLA epitopes as viewed by antibodies: what is it all about? *Am J Transplant* **15**, 1148-1154, doi:10.1111/ajt.13192 (2015).
- 69 Lopes, D., Barra, T., Malheiro, J., Tafulo, S., Martins, L., Almeida, M., Pedroso, S., Dias, L., Castro Henriques, A. & Cabrita, A. Effect of Different Sensitization Events on HLA

- Alloimmunization in Kidney Transplantation Candidates. *Transplant Proc* **47**, 894-897, doi:10.1016/j.transproceed.2015.03.014 (2015).
- 70 Grafft, C. A., Cornell, L. D., Gloor, J. M., Cosio, F. G., Gandhi, M. J., Dean, P. G., Stegall, M. D. & Amer, H. Antibody-mediated rejection following transplantation from an HLA-identical sibling. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 307-310, doi:10.1093/ndt/gfp526 (2010).
- 71 Collins, A. B., Chicano, S. L., Cornell, L. D., Tolkoff-Rubin, N., Goes, N. B., Saidman, S. L., Farrell, M. L., Cosimi, A. B. & Colvin, R. B. Putative antibody-mediated rejection with C4d deposition in HLA-identical, ABO-compatible renal allografts. *Transplant Proc* **38**, 3427-3429, doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.159 (2006).
- 72 Opelz, G. & Collaborative Transplant, S. Non-HLA transplantation immunity revealed by lymphocytotoxic antibodies. *Lancet* **365**, 1570-1576, doi:10.1016/S0140-6736(05)66458-6 (2005).
- 73 Dragun, D., Philippe, A. & Catar, R. Role of non-HLA antibodies in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* **17**, 440-445, doi:10.1097/MOT.0b013e328355f12b (2012).
- 74 Dragun, D., Muller, D. N., Brasen, J. H., Fritsche, L., Nieminen-Kelha, M., Dechend, R., Kintscher, U., Rudolph, B., Hoebeke, J., Eckert, D., Mazak, I., Plehm, R., Schonemann, C., Unger, T., Budde, K., Neumayer, H. H., Luft, F. C. & Wallukat, G. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. *N Engl J Med* **352**, 558-569, doi:10.1056/NEJMoa035717 (2005).
- 75 Dragun, D., Catar, R. & Philippe, A. Non-HLA antibodies against endothelial targets bridging allo- and autoimmunity. *Kidney Int* **90**, 280-288, doi:10.1016/j.kint.2016.03.019 (2016).
- 76 Coughlin, S. R. Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**, 258-264, doi:10.1038/35025229 (2000).
- 77 Ma, L. & Dorling, A. The roles of thrombin and protease-activated receptors in inflammation. *Semin Immunopathol* **34**, 63-72, doi:10.1007/s00281-011-0281-9 (2012).
- 78 Qu, Z. & Chaikof, E. L. Interface between hemostasis and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* **22**, 634-642, doi:10.1016/j.coi.2010.08.017 (2010).
- 79 Hu, L., Roth, J. M., Brooks, P., Luty, J. & Karpatkin, S. Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis. *Cancer Res* **68**, 4666-4673, doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6276 (2008).
- 80 Furie, B. & Furie, B. C. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med* **359**, 938-949, doi:10.1056/NEJMra0801082 (2008).
- 81 Rondeau, E., Vigneau, C. & Berrou, J. Role of thrombin receptors in the kidney: lessons from PAR1 knock-out mice. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 1529-1531, doi:10.1093/ndt/16.8.1529 (2001).
- 82 Cirino, G., Napoli, C., Bucci, M. & Cicala, C. Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *Trends Pharmacol Sci* **21**, 170-172 (2000).
- 83 Coughlin, S. R. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11023-11027, doi:10.1073/pnas.96.20.11023 (1999).
- 84 Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D. H., Fung, J. J., Palmer, D., Zheng, Y., Green, H. F., Pandey, A., Dror, R. O., Shaw, D. E., Weis, W. I., Coughlin, S. R. & Kobilka, B. K. High-resolution crystal structure of human protease-activated receptor 1. *Nature* **492**, 387-392, doi:10.1038/nature11701 (2012).
- 85 Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356-363, doi:10.1038/nature08144 (2009).
- 86 Venkatakrisnan, A. J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C. G., Schertler, G. F. & Babu, M. M. Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185-194, doi:10.1038/nature11896 (2013).
- 87 Fredriksson, R., Lagerstrom, M. C., Lundin, L. G. & Schioth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256-1272, doi:10.1124/mol.63.6.1256 (2003).

- 88 Vu, T. K., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057-1068 (1991).
- 89 Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B. & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors. *Br J Pharmacol* **160**, 191-203, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00705.x (2010).
- 90 Oldham, W. M. & Hamm, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 60-71, doi:10.1038/nrm2299 (2008).
- 91 Russo, A., Soh, U. J. & Trejo, J. Proteases display biased agonism at protease-activated receptors: location matters! *Mol Interv* **9**, 87-96, doi:10.1124/mi.9.2.8 (2009).
- 92 Traynelis, S. F. & Trejo, J. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol* **14**, 230-235, doi:10.1097/MOH.0b013e3280dce568 (2007).
- 93 Ramachandran, R., Noorbakhsh, F., Defea, K. & Hollenberg, M. D. Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 69-86, doi:10.1038/nrd3615 (2012).
- 94 Kreienbring, K., Franz, A., Richter, R., Dragun, D., Heidecke, H., Muller, D., Mentze, M., Dechend, R., Sehoul, J. & Braicu, E. I. The Role of PAR1 Autoantibodies in Patients with Primary Epithelial Ovarian Cancer. *Anticancer Res* **38**, 3619-3625, doi:10.21873/anticancer.12636 (2018).
- 95 Kishimoto, T., Kang, S. & Tanaka, T. in *Innovative Medicine: Basic Research and Development* (eds K. Nakao, N. Minato, & S. Uemoto) 131-147 (2015).
- 96 Muraguchi, A., Kishimoto, T., Miki, Y., Kuritani, T., Kaieda, T., Yoshizaki, K. & Yamamura, Y. T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J Immunol* **127**, 412-416 (1981).
- 97 Yoshizaki, K., Nakagawa, T., Kaieda, T., Muraguchi, A., Yamamura, Y. & Kishimoto, T. Induction of proliferation and Ig production in human B leukemic cells by anti-immunoglobulins and T cell factors. *J Immunol* **128**, 1296-1301 (1982).
- 98 Kishimoto, T., Akira, S. & Taga, T. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines. *Science* **258**, 593-597, doi:10.1126/science.1411569 (1992).
- 99 Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. & Kishimoto, T. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* **241**, 825-828, doi:10.1126/science.3136546 (1988).
- 100 Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157 (1990).
- 101 Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. & Kishimoto, T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* **260**, 1808-1810, doi:10.1126/science.8511589 (1993).
- 102 Taga, T. & Kishimoto, T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**, 797-819, doi:10.1146/annurev.immunol.15.1.797 (1997).
- 103 Hirano, T., Akira, S., Taga, T. & Kishimoto, T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* **11**, 443-449 (1990).
- 104 Neumann, F. J., Ott, I., Marx, N., Luther, T., Kenngott, S., Gawaz, M., Kotzsch, M. & Schomig, A. Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**, 3399-3405 (1997).
- 105 Narazaki, M. & Kishimoto, T. The Two-Faced Cytokine IL-6 in Host Defense and Diseases. *Int J Mol Sci* **19**, doi:10.3390/ijms19113528 (2018).
- 106 Stouthard, J. M., Levi, M., Hack, C. E., Veenhof, C. H., Romijn, H. A., Sauerwein, H. P. & van der Poll, T. Interleukin-6 stimulates coagulation, not fibrinolysis, in humans. *Thromb Haemost* **76**, 738-742 (1996).
- 107 de Jonge, E., Friederich, P. W., Vlasuk, G. P., Rote, W. E., Vroom, M. B., Levi, M. & van der Poll, T. Activation of coagulation by administration of recombinant factor VIIa elicits interleukin 6 (IL-6) and IL-8 release in healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**, 495-497, doi:10.1128/cdli.10.3.495-497.2003 (2003).

- 108 Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J. & Hennekens, C. H. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* **101**, 1767-1772, doi:10.1161/01.cir.101.15.1767 (2000).
- 109 Held, C., White, H. D., Stewart, R. A. H., Budaj, A., Cannon, C. P., Hochman, J. S., Koenig, W., Siegbahn, A., Steg, P. G., Soffer, J., Weaver, W. D., Ostlund, O., Wallentin, L. & Investigators, S. Inflammatory Biomarkers Interleukin-6 and C-Reactive Protein and Outcomes in Stable Coronary Heart Disease: Experiences From the STABILITY (Stabilization of Atherosclerotic Plaque by Initiation of Darapladib Therapy) Trial. *J Am Heart Assoc* **6**, doi:10.1161/JAHA.116.005077 (2017).
- 110 Fukatsu, A., Matsuo, S., Yuzawa, Y., Miyai, H., Futenma, A. & Kato, K. Expression of interleukin 6 and major histocompatibility complex molecules in tubular epithelial cells of diseased human kidneys. *Lab Invest* **69**, 58-67 (1993).
- 111 Ray, A. & Sehgal, P. B. Cytokines and their receptors: molecular mechanism of interleukin-6 gene repression by glucocorticoids. *J Am Soc Nephrol* **2**, S214-221 (1992).
- 112 Yoshimura, N., Kahan, B. D. & Oka, T. The in vivo effect of cyclosporine on interleukin-6 gene expression in renal transplant recipients. *Transplant Proc* **23**, 958-960 (1991).
- 113 Vandembroecke, C., Caillat-Zucman, S., Legendre, C., Noel, L. H., Kreis, H., Woodrow, D., Bach, J. F. & Tovey, M. G. Differential in situ expression of cytokines in renal allograft rejection. *Transplantation* **51**, 602-609, doi:10.1097/00007890-199103000-00012 (1991).
- 114 Raasveld, M. H., Weening, J. J., Kerst, J. M., Surachno, S. & ten Berge, R. J. Local production of interleukin-6 during acute rejection in human renal allografts. *Nephrol Dial Transplant* **8**, 75-78, doi:10.1093/oxfordjournals.ndt.a092278 (1993).
- 115 Waiser, J., Budde, K., Katalinic, A., Kuerzdorfer, M., Riess, R. & Neumayer, H. H. Interleukin-6 expression after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* **12**, 753-759, doi:10.1093/ndt/12.4.753 (1997).
- 116 Yoshimura, N., Oka, T. & Kahan, B. D. Sequential determinations of serum interleukin 6 levels as an immunodiagnostic tool to differentiate rejection from nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Transplantation* **51**, 172-176, doi:10.1097/00007890-199101000-00026 (1991).
- 117 Daniel, V., Pasker, S., Reiss, U., Weimer, R., Wiesel, M., Pomer, S., Staehler, G. & Opelz, G. Plasma GM-CSF, IL-6, and IL-3 monitoring allows differentiation between infection and rejection in some renal transplant recipients: preliminary results of a retrospective study. *Transplant Proc* **25**, 893-896 (1993).
- 118 Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C. & Lawley, T. J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* **99**, 683-690 (1992).
- 119 Bargonetti, J., Reynisdottir, I., Friedman, P. N. & Prives, C. Site-specific binding of wild-type p53 to cellular DNA is inhibited by SV40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev* **6**, 1886-1898 (1992).
- 120 DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J. Y., Huang, C. M., Lee, W. H., Marsilio, E., Paucha, E. & Livingston, D. M. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* **54**, 275-283 (1988).
- 121 Ribeiro, M. J., Phillips, D. J., Benson, J. M., Evatt, B. L., Ades, E. W. & Hooper, W. C. Hemostatic properties of the SV-40 transfected human microvascular endothelial cell line (HMEC-1). A representative in vitro model for microvascular endothelium. *Thromb Res* **79**, 153-161, doi:10.1016/0049-3848(95)00101-v (1995).
- 122 Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol Appendix 3*, Appendix 3B, doi:10.1002/0471142735.ima03bs21 (2001).
- 123 Uphoff, C. C. & Drexler, H. G. Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **38**, 79-85, doi:10.1290/1071-2690(2002)038<0079:CPAFDO>2.0.CO;2 (2002).
- 124 Arora, S., Saxena, V. & Ayyar, B. V. Affinity chromatography: A versatile technique for antibody purification. *Methods* **116**, 84-94, doi:10.1016/j.ymeth.2016.12.010 (2017).

- 125 Paradina Fernandez, L., Calvo, L. & Vina, L. Development and Validation of an Affinity Chromatography-Protein G Method for IgG Quantification. *Int Sch Res Notices* **2014**, 487101, doi:10.1155/2014/487101 (2014).
- 126 Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275 (1951).
- 127 Peterson, G. L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* **100**, 201-220 (1979).
- 128 Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
- 129 Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V., Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 815-820 (1967).
- 130 Ogden, R. C. & Adams, D. A. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. *Methods Enzymol* **152**, 61-87 (1987).
- 131 Ni, D., Xu, P. & Gallagher, S. Immunoblotting and Immunodetection. *Curr Protoc Protein Sci* **88**, 10.10.11-10.10.37, doi:10.1002/cpps.32 (2017).
- 132 Stochaj, W. R., Berkelman, T. & Laird, N. Staining membrane-bound proteins with ponceau s. *CSH Protoc* **2006**, doi:10.1101/pdb.prot4543 (2006).
- 133 Engvall, E. The ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Chem* **56**, 319-320, doi:10.1373/clinchem.2009.127803 (2010).
- 134 van Weemen, B. K. The rise of EIA/ELISA. *Clin Chem* **51**, 2226, doi:10.1373/clinchem.2005.059626 (2005).
- 135 Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871-874 (1971).
- 136 Engvall, E., Jonsson, K. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim Biophys Acta* **251**, 427-434 (1971).
- 137 Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* **109**, 129-135 (1972).
- 138 Van Weemen, B. K. & Schuurs, A. H. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* **15**, 232-236 (1971).
- 139 Lequin, R. M. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem* **51**, 2415-2418, doi:10.1373/clinchem.2005.051532 (2005).
- 140 Wilkerson, M. J. Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **42**, 53-71, doi:10.1016/j.cvsm.2011.09.012 (2012).
- 141 Hulett, H. R., Bonner, W. A., Barrett, J. & Herzenberg, L. A. Cell sorting: automated separation of mammalian cells as a function of intracellular fluorescence. *Science* **166**, 747-749 (1969).
- 142 McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* **120**, 5.1.1-5.1.11, doi:10.1002/cpim.40 (2018).
- 143 Tung, J. W., Heydari, K., Tirouvanziam, R., Sahaf, B., Parks, D. R., Herzenberg, L. A. & Herzenberg, L. A. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med* **27**, 453-468, v, doi:10.1016/j.cll.2007.05.001 (2007).
- 144 Roederer, M. Multiparameter FACS analysis. *Curr Protoc Immunol* **Chapter 5**, Unit 5.8, doi:10.1002/0471142735.im0508s49 (2002).
- 145 Roederer, M. Compensation in flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 1**, Unit 1.14, doi:10.1002/0471142956.cy0114s22 (2002).
- 146 Wood, J. C. Principles of gating. *Curr Protoc Cytom* **Chapter 1**, Unit 1.8, doi:10.1002/0471142956.cy0108s03 (2001).
- 147 LES LABORATOIRES SERVIER. smart SERVIER MEDICAL ART 3000 Free medical images [online]. <https://smart.servier.com/> (2020). (accessed 05.01.2021)

- 148 Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* **22**, 153-183, doi:10.1210/edrv.22.2.0428 (2001).
- 149 Cuarental, L., Sucunza-Saenz, D., Valino-Rivas, L., Fernandez-Fernandez, B., Sanz, A. B., Ortiz, A., Vaquero, J. J. & Sanchez-Nino, M. D. MAP3K kinases and kidney injury. *Nefrologia* **39**, 568-580, doi:10.1016/j.nefro.2019.03.004 (2019).
- 150 Ramos, J. W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 2707-2719, doi:10.1016/j.biocel.2008.04.009 (2008).
- 151 Lloyd, A. C. Distinct functions for ERKs? *J Biol* **5**, 13, doi:10.1186/jbiol46 (2006).
- 152 Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci* **122**, 3589-3594, doi:10.1242/jcs.051011 (2009).
- 153 Cohen, M. M., Jr. The AKT genes and their roles in various disorders. *Am J Med Genet A* **161A**, 2931-2937, doi:10.1002/ajmg.a.36101 (2013).
- 154 Hemmings, B. A. Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science* **275**, 628-630, doi:10.1126/science.275.5300.628 (1997).
- 155 Franke, T. F., Kaplan, D. R., Cantley, L. C. & Toker, A. Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **275**, 665-668, doi:10.1126/science.275.5300.665 (1997).
- 156 Shelton, J. G., Steelman, L. S., Lee, J. T., Knapp, S. L., Blalock, W. L., Moye, P. W., Franklin, R. A., Pohnert, S. C., Mirza, A. M., McMahon, M. & McCubrey, J. A. Effects of the RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signal transduction pathways on the abrogation of cytokine-dependence and prevention of apoptosis in hematopoietic cells. *Oncogene* **22**, 2478-2492, doi:10.1038/sj.onc.1206321 (2003).
- 157 Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M. & Fry, M. J. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* **116**, 3037-3040, doi:10.1242/jcs.00609 (2003).
- 158 Rameh, L. E. & Cantley, L. C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* **274**, 8347-8350, doi:10.1074/jbc.274.13.8347 (1999).
- 159 Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **307**, 1098-1101, doi:10.1126/science.1106148 (2005).
- 160 Fenton, T. R. & Gout, I. T. Functions and regulation of the 70kDa ribosomal S6 kinases. *Int J Biochem Cell Biol* **43**, 47-59, doi:10.1016/j.biocel.2010.09.018 (2011).
- 161 Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* **12**, 9-22, doi:10.1016/j.ccr.2007.05.008 (2007).
- 162 Pullen, N. & Thomas, G. The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett* **410**, 78-82, doi:10.1016/s0014-5793(97)00323-2 (1997).
- 163 Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R. & Blenis, J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* **69**, 1227-1236, doi:10.1016/0092-8674(92)90643-q (1992).
- 164 Lieberthal, W. & Levine, J. S. Mammalian target of rapamycin and the kidney. I. The signaling pathway. *Am J Physiol Renal Physiol* **303**, F1-10, doi:10.1152/ajprenal.00014.2012 (2012).
- 165 European Medicines Agency. Anhang 1 Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels [online] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/refludan-epar-product-information_de.pdf (2007). (accessed 12.02.2020)
- 166 Di Nisio, M., Middeldorp, S. & Buller, H. R. Direct thrombin inhibitors. *N Engl J Med* **353**, 1028-1040, doi:10.1056/NEJMra044440 (2005).
- 167 Hollenberg, M. D. & Compton, S. J. International Union of Pharmacology. XXVIII. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev* **54**, 203-217, doi:10.1124/pr.54.2.203 (2002).
- 168 Hedin, K. E., Bell, M. P., Huntoon, C. J., Karnitz, L. M. & McKean, D. J. Gi proteins use a novel beta gamma- and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes. *J Biol Chem* **274**, 19992-20001, doi:10.1074/jbc.274.28.19992 (1999).

- 169 McCoy, K. L., Gyoneva, S., Vellano, C. P., Smrcka, A. V., Traynelis, S. F. & Hepler, J. R. Protease-activated receptor 1 (PAR1) coupling to G(q/11) but not to G(i/o) or G(12/13) is mediated by discrete amino acids within the receptor second intracellular loop. *Cell Signal* **24**, 1351-1360, doi:10.1016/j.celsig.2012.01.011 (2012).
- 170 Soto, A. G. & Trejo, J. N-linked glycosylation of protease-activated receptor-1 second extracellular loop: a critical determinant for ligand-induced receptor activation and internalization. *J Biol Chem* **285**, 18781-18793, doi:10.1074/jbc.M110.111088 (2010).
- 171 Gerszten, R. E., Chen, J., Ishii, M., Ishii, K., Wang, L., Nanevicz, T., Turck, C. W., Vu, T. K. & Coughlin, S. R. Specificity of the thrombin receptor for agonist peptide is defined by its extracellular surface. *Nature* **368**, 648-651, doi:10.1038/368648a0 (1994).
- 172 Nanevicz, T., Ishii, M., Wang, L., Chen, M., Chen, J., Turck, C. W., Cohen, F. E. & Coughlin, S. R. Mechanisms of thrombin receptor agonist specificity. Chimeric receptors and complementary mutations identify an agonist recognition site. *J Biol Chem* **270**, 21619-21625, doi:10.1074/jbc.270.37.21619 (1995).
- 173 Allen, L. F., Sebolt-Leopold, J. & Meyer, M. B. CI-1040 (PD184352), a targeted signal transduction inhibitor of MEK (MAPKK). *Semin Oncol* **30**, 105-116, doi:10.1053/j.seminoncol.2003.08.012 (2003).
- 174 Ou, D. L., Shen, Y. C., Liang, J. D., Liou, J. Y., Yu, S. L., Fan, H. H., Wang, D. S., Lu, Y. S., Hsu, C. & Cheng, A. L. Induction of Bim expression contributes to the antitumor synergy between sorafenib and mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase inhibitor CI-1040 in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* **15**, 5820-5828, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3294 (2009).
- 175 Donato, A. J., Morgan, R. G., Walker, A. E. & Lesniewski, L. A. Cellular and molecular biology of aging endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* **89**, 122-135, doi:10.1016/j.yjmcc.2015.01.021 (2015).
- 176 Bouis, D., Hospers, G. A., Meijer, C., Molema, G. & Mulder, N. H. Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* **4**, 91-102 (2001).
- 177 Xu, Y., Swerlick, R. A., Sepp, N., Bosse, D., Ades, E. W. & Lawley, T. J. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* **102**, 833-837, doi:10.1111/1523-1747.ep12382086 (1994).
- 178 McLaughlin, J. N., Mazzoni, M. R., Cleator, J. H., Earls, L., Perdigoto, A. L., Brooks, J. D., Muldowney, J. A., 3rd, Vaughan, D. E. & Hamm, H. E. Thrombin modulates the expression of a set of genes including thrombospondin-1 in human microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* **280**, 22172-22180, doi:10.1074/jbc.M500721200 (2005).
- 179 Etulain, J., Mena, H. A., Negrotto, S. & Schattner, M. Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets. *Platelets* **26**, 799-804, doi:10.3109/09537104.2015.1051953 (2015).
- 180 Lidington, E. A., Moyes, D. L., McCormack, A. M. & Rose, M. L. A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol* **7**, 239-246 (1999).
- 181 Augustin, H. G. & Koh, G. Y. Organotypic vasculature: From descriptive heterogeneity to functional pathophysiology. *Science* **357**, doi:10.1126/science.aal2379 (2017).
- 182 Ruoslahti, E. & Rajotte, D. An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol* **18**, 813-827, doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.813 (2000).
- 183 Ngian, G. S., Sahhar, J., Wicks, I. P. & Van Doornum, S. Cardiovascular disease in systemic sclerosis--an emerging association? *Arthritis Res Ther* **13**, 237, doi:10.1186/ar3445 (2011).
- 184 Morozumi, K., Takeda, A., Otsuka, Y., Horike, K., Gotoh, N., Narumi, S., Watarai, Y. & Kobayashi, T. Reviewing the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. *Nephrology (Carlton)* **21 Suppl 1**, 4-8, doi:10.1111/nep.12777 (2016).

- 185 Grandaliano, G., Di Paolo, S., Monno, R., Stallone, G., Ranieri, E., Pontrelli, P., Gesualdo, L. & Schena, F. P. Protease-activated receptor 1 and plasminogen activator inhibitor 1 expression in chronic allograft nephropathy: the role of coagulation and fibrinolysis in renal graft fibrosis. *Transplantation* **72**, 1437-1443, doi:10.1097/00007890-200110270-00018 (2001).
- 186 Kill, A., Tabeling, C., Undeutsch, R., Kuhl, A. A., Gunther, J., Radic, M., Becker, M. O., Heidecke, H., Worm, M., Witzernath, M., Burmester, G. R., Dragun, D. & Riemekasten, G. Autoantibodies to angiotensin and endothelin receptors in systemic sclerosis induce cellular and systemic events associated with disease pathogenesis. *Arthritis Res Ther* **16**, R29, doi:10.1186/ar4457 (2014).
- 187 Bae, J. S., Kim, Y. U., Park, M. K. & Rezaie, A. R. Concentration dependent dual effect of thrombin in endothelial cells via Par-1 and Pi3 Kinase. *J Cell Physiol* **219**, 744-751, doi:10.1002/jcp.21718 (2009).
- 188 Chiu, Y. C., Fong, Y. C., Lai, C. H., Hung, C. H., Hsu, H. C., Lee, T. S., Yang, R. S., Fu, W. M. & Tang, C. H. Thrombin-induced IL-6 production in human synovial fibroblasts is mediated by PAR1, phospholipase C, protein kinase C alpha, c-Src, NF-kappa B and p300 pathway. *Mol Immunol* **45**, 1587-1599, doi:10.1016/j.molimm.2007.10.004 (2008).
- 189 Reiter, N., Eichelberger, B., Kaider, A. & Panzer, S. Thrombin-inducible platelet adhesion and regulation of the platelet seven-transmembrane thrombin receptor-1 (PAR-1): effects of unfractionated heparin and lepirudin. *Platelets* **20**, 582-587, doi:10.3109/09537100903247782 (2009).
- 190 Thuillier, R., Favreau, F., Celhay, O., Macchi, L., Milin, S. & Hauet, T. Thrombin inhibition during kidney ischemia-reperfusion reduces chronic graft inflammation and tubular atrophy. *Transplantation* **90**, 612-621, doi:10.1097/tp.0b013e3181d72117 (2010).
- 191 Chrysanthopoulou, A., Mitroulis, I., Kambas, K., Skendros, P., Kourtzelis, I., Vradelis, S., Kolios, G., Aslanidis, S., Doumas, M. & Ritis, K. Tissue factor-thrombin signaling enhances the fibrotic activity of myofibroblasts in systemic sclerosis through up-regulation of endothelin receptor A. *Arthritis Rheum* **63**, 3586-3597, doi:10.1002/art.30586 (2011).
- 192 Bogatkevich, G. S., Ludwicka-Bradley, A., Nietert, P. J., Akter, T., van Ryn, J. & Silver, R. M. Antiinflammatory and antifibrotic effects of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in a murine model of interstitial lung disease. *Arthritis Rheum* **63**, 1416-1425, doi:10.1002/art.30255 (2011).
- 193 Ludwicka-Bradley, A., Bogatkevich, G. & Silver, R. M. Thrombin-mediated cellular events in pulmonary fibrosis associated with systemic sclerosis (scleroderma). *Clin Exp Rheumatol* **22**, S38-46 (2004).
- 194 Lidington, E. A., Steinberg, R., Kinderlerer, A. R., Landis, R. C., Ohba, M., Samarel, A., Haskard, D. O. & Mason, J. C. A role for proteinase-activated receptor 2 and PKC-epsilon in thrombin-mediated induction of decay-accelerating factor on human endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1437-1447, doi:10.1152/ajpcell.00502.2004 (2005).
- 195 Ossovskaya, V. S. & Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol Rev* **84**, 579-621, doi:10.1152/physrev.00028.2003 (2004).
- 196 Fujiwara, M., Jin, E., Ghazizadeh, M. & Kawanami, O. Differential expression of protease-activated receptors 1, 2, and 4 on human endothelial cells from different vascular sites. *Pathobiology* **71**, 52-58, doi:10.1159/000072962 (2004).
- 197 Lin, H. & Trejo, J. Transactivation of the PAR1-PAR2 heterodimer by thrombin elicits beta-arrestin-mediated endosomal signaling. *J Biol Chem* **288**, 11203-11215, doi:10.1074/jbc.M112.439950 (2013).
- 198 Nakanishi-Matsui, M., Zheng, Y. W., Sulciner, D. J., Weiss, E. J., Ludeman, M. J. & Coughlin, S. R. PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* **404**, 609-613, doi:10.1038/35007085 (2000).

- 199 Andrikopoulos, P., Kieswich, J., Harwood, S. M., Baba, A., Matsuda, T., Barbeau, O., Jones, K., Eccles, S. A. & Yaqoob, M. M. Endothelial Angiogenesis and Barrier Function in Response to Thrombin Require Ca^{2+} Influx through the Na^{+}/Ca^{2+} Exchanger. *J Biol Chem* **290**, 18412-18428, doi:10.1074/jbc.M114.628156 (2015).
- 200 Nakayama, T., Hirano, K., Hirano, M., Nishimura, J., Kuga, H., Nakamura, K., Takahashi, S. & Kanaide, H. Inactivation of protease-activated receptor-1 by proteolytic removal of the ligand region in vascular endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **68**, 23-32, doi:10.1016/j.bcp.2004.03.005 (2004).
- 201 Vega-Ostertag, M., Harris, E. N. & Pierangeli, S. S. Intracellular events in platelet activation induced by antiphospholipid antibodies in the presence of low doses of thrombin. *Arthritis Rheum* **50**, 2911-2919, doi:10.1002/art.20434 (2004).
- 202 Wang, L., Gout, I. & Proud, C. G. Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **276**, 32670-32677, doi:10.1074/jbc.M102776200 (2001).
- 203 Lee, K. H., Cho, H. J., Kim, H. S., Lee, W. J., Lee, S. & Bang, D. Activation of extracellular signal regulated kinase 1/2 in human dermal microvascular endothelial cells stimulated by anti-endothelial cell antibodies in sera of patients with Behcet's disease. *J Dermatol Sci* **30**, 63-72, doi:10.1016/s0923-1811(02)00062-2 (2002).
- 204 Zhang, G., Kernan, K. A., Collins, S. J., Cai, X., Lopez-Guisa, J. M., Degen, J. L., Shvil, Y. & Eddy, A. A. Plasmin(ogen) promotes renal interstitial fibrosis by promoting epithelial-to-mesenchymal transition: role of plasmin-activated signals. *J Am Soc Nephrol* **18**, 846-859, doi:10.1681/ASN.2006080886 (2007).
- 205 Tanaka, M., Arai, H., Liu, N., Nogaki, F., Nomura, K., Kasuno, K., Oida, E., Kita, T. & Ono, T. Role of coagulation factor Xa and protease-activated receptor 2 in human mesangial cell proliferation. *Kidney Int* **67**, 2123-2133, doi:10.1111/j.1523-1755.2005.00317.x (2005).
- 206 Takayama, Y., Ando, T., Ichikawa, J. & Haro, H. Effect of Thrombin-Induced MCP-1 and MMP-3 Production Via PAR1 Expression in Murine Intervertebral Discs. *Sci Rep* **8**, 11320, doi:10.1038/s41598-018-29669-z (2018).
- 207 Iwasaki, K., Miwa, Y., Uchida, K., Koderu, Y. & Kobayashi, T. Negative regulation of HLA-DR expression on endothelial cells by anti-blood group A/B antibody ligation and mTOR inhibition. *Transpl Immunol* **40**, 22-30, doi:10.1016/j.trim.2016.12.004 (2017).
- 208 Lion, J., Taflin, C., Cross, A. R., Robledo-Sarmiento, M., Mariotto, E., Savenay, A., Carmagnat, M., Suberbielle, C., Charron, D., Haziot, A., Glotz, D. & Mooney, N. HLA Class II Antibody Activation of Endothelial Cells Promotes Th17 and Disrupts Regulatory T Lymphocyte Expansion. *Am J Transplant* **16**, 1408-1420, doi:10.1111/ajt.13644 (2016).
- 209 Fineschi, S., Goffin, L., Rezzonico, R., Cozzi, F., Dayer, J. M., Meroni, P. L. & Chizzolini, C. Antifibroblast antibodies in systemic sclerosis induce fibroblasts to produce profibrotic chemokines, with partial exploitation of toll-like receptor 4. *Arthritis Rheum* **58**, 3913-3923, doi:10.1002/art.24049 (2008).
- 210 Zhang, C., Chan, C. C. Y., Cheung, K. F., Chau, M. K. M., Yap, D. Y. H., Ma, M. K. M., Chan, K. W., Yung, S. & Chan, T. M. Effect of mycophenolate and rapamycin on renal fibrosis in lupus nephritis. *Clin Sci (Lond)* **133**, 1721-1744, doi:10.1042/CS20190536 (2019).
- 211 Akhmetshina, A., Dees, C., Pileckyte, M., Szucs, G., Spriewald, B. M., Zwerina, J., Distler, O., Schett, G. & Distler, J. H. Rho-associated kinases are crucial for myofibroblast differentiation and production of extracellular matrix in scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum* **58**, 2553-2564, doi:10.1002/art.23677 (2008).
- 212 Ahmed, S., Misra, D. P. & Agarwal, V. Interleukin-17 pathways in systemic sclerosis-associated fibrosis. *Rheumatol Int* **39**, 1135-1143, doi:10.1007/s00296-019-04317-5 (2019).
- 213 Freier, J. Charakterisierung von Autoantikörpern gegen Protease-aktivierte Rezeptoren 1 und 2 und gegen Endothelin-Rezeptor ET (A). Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (2007)

- 214 Abdelkrim, M. A., Leonetti, D., Montaudon, E., Chatagnon, G., Gogny, M., Desfontis, J. C., Noireaud, J. & Mallem, M. Y. Antibodies against the second extracellular loop of beta(1)-adrenergic receptors induce endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries of the Wistar rat. *Int Immunopharmacol* **19**, 308-316, doi:10.1016/j.intimp.2014.01.029 (2014).
- 215 Cavill, D., Waterman, S. A. & Gordon, T. P. Antibodies raised against the second extracellular loop of the human muscarinic M3 receptor mimic functional autoantibodies in Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* **59**, 261-266, doi:10.1111/j.0300-9475.2004.01395.x (2004).
- 216 Verdot, L., Ferrer-di-Martino, M., Bertin, B., Strosberg, A. D. & Hoebeke, J. Production of anti-peptide antibodies directed against the first and the second extracellular loop of the human serotonin 5-HT1A receptor. *Biochimie* **76**, 165-170, doi:10.1016/0300-9084(94)90009-4 (1994).
- 217 Junemann, A., Hohberger, B., Rech, J., Sheriff, A., Fu, Q., Schlotzer-Schrehardt, U., Voll, R. E., Bartel, S., Kalbacher, H., Hoebeke, J., Rejdak, R., Horn, F., Wallukat, G., Kunze, R. & Herrmann, M. Agonistic Autoantibodies to the beta2-Adrenergic Receptor Involved in the Pathogenesis of Open-Angle Glaucoma. *Front Immunol* **9**, 145, doi:10.3389/fimmu.2018.00145 (2018).
- 218 Dechend, R., Muller, D. N., Wallukat, G., Homuth, V., Krause, M., Dudenhausen, J. & Luft, F. C. AT1 receptor agonistic antibodies, hypertension, and preeclampsia. *Semin Nephrol* **24**, 571-579, doi:10.1016/s0270-9295(04)00128-7 (2004).
- 219 Wallukat, G., Jandrig, B., Kunze, R., Wendler, J. J., Muller, J., Schostak, M. & Schimke, I. Autoantibodies Directed Against the Endothelin A Receptor in Patients With Benign Prostatic Hyperplasia. *Prostate* **77**, 458-465, doi:10.1002/pros.23284 (2017).
- 220 Kogan, A. E. & Strukova, S. M. [Protein C: mechanisms of activation and anticoagulant effect]. *Biokhimiia* **58**, 827-844 (1993).
- 221 Shin, S. Y., Rath, O., Choo, S. M., Fee, F., McFerran, B., Kolch, W. & Cho, K. H. Positive- and negative-feedback regulations coordinate the dynamic behavior of the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway. *J Cell Sci* **122**, 425-435, doi:10.1242/jcs.036319 (2009).
- 222 Shankar, H., Garcia, A., Prabhakar, J., Kim, S. & Kunapuli, S. P. P2Y12 receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A2 generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *J Thromb Haemost* **4**, 638-647, doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01789.x (2006).
- 223 Liu, J., Hong, J., Ahn, K. S., Go, J., Han, H., Park, J., Kim, D., Park, H., Koh, Y., Shin, D. Y. & Yoon, S. S. ERK-dependent IL-6 positive feedback loop mediates resistance against a combined treatment using danusertib and BKM120 in Burkitt lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma* **60**, 2532-2540, doi:10.1080/10428194.2019.1594211 (2019).
- 224 Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 827-837, doi:10.1038/nrm1743 (2005).
- 225 Gordon, J. R., Zhang, X., Stevenson, K. & Cosford, K. Thrombin induces IL-6 but not TNFalpha secretion by mouse mast cells: threshold-level thrombin receptor and very low level FcepsilonRI signaling synergistically enhance IL-6 secretion. *Cell Immunol* **205**, 128-135, doi:10.1006/cimm.2000.1714 (2000).
- 226 Wang, H., Ubl, J. J., Stricker, R. & Reiser, G. Thrombin (PAR-1)-induced proliferation in astrocytes via MAPK involves multiple signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1351-1364, doi:10.1152/ajpcell.00001.2002 (2002).
- 227 Minhajuddin, M., Bijli, K. M., Fazal, F., Sassano, A., Nakayama, K. I., Hay, N., Plataniias, L. C. & Rahman, A. Protein kinase C-delta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activate mammalian target of rapamycin to modulate NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in endothelial cells. *J Biol Chem* **284**, 4052-4061, doi:10.1074/jbc.M805032200 (2009).
- 228 Li, Z., Yang, Z., Passaniti, A., Lapidus, R. G., Liu, X., Cullen, K. J. & Dan, H. C. A positive feedback loop involving EGFR/Akt/mTORC1 and IKK/NF-kB regulates head and

- neck squamous cell carcinoma proliferation. *Oncotarget* **7**, 31892-31906, doi:10.18632/oncotarget.7441 (2016).
- 229 Yan, Q., Luo, H., Wang, B., Sui, W., Zou, G., Chen, H. & Zou, H. Correlation between PKB/Akt, GSK-3beta expression and tubular epithelial-mesenchymal transition in renal allografts with chronic active antibody-mediated rejection. *Exp Ther Med* **13**, 2217-2224, doi:10.3892/etm.2017.4261 (2017).
- 230 Hosp, I. Wirkung von Autoantikörpern gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf die Sekretion von VEGF-A in HMECs. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin (2020).
- 231 Arts, M. R., Baron, M., Chokr, N., Fritzler, M. J., Canadian Scleroderma Research, G. & Servant, M. J. Systemic sclerosis immunoglobulin induces growth and a pro-fibrotic state in vascular smooth muscle cells through the epidermal growth factor receptor. *PLoS One* **9**, e100035, doi:10.1371/journal.pone.0100035 (2014).
- 232 Yanaba, K., Asano, Y., Noda, S., Akamata, K., Aozasa, N., Taniguchi, T., Takahashi, T., Ichimura, Y., Toyama, T., Sumida, H., Kuwano, Y., Tada, Y., Sugaya, M., Kadono, T. & Sato, S. Increased circulating fibrinogen-like protein 2 in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol* **32**, 43-47, doi:10.1007/s10067-012-2089-y (2013).
- 233 Loverre, A., Ditunno, P., Crovace, A., Gesualdo, L., Ranieri, E., Pontrelli, P., Stallone, G., Infante, B., Schena, A., Di Paolo, S., Capobianco, C., Ursi, M., Palazzo, S., Battaglia, M., Selvaggi, F. P., Schena, F. P. & Grandaliano, G. Ischemia-reperfusion induces glomerular and tubular activation of proinflammatory and antiapoptotic pathways: differential modulation by rapamycin. *J Am Soc Nephrol* **15**, 2675-2686, doi:10.1097/01.ASN.0000139932.00971.E4 (2004).
- 234 Hu, H., Yamashita, S., Hua, Y., Keep, R. F., Liu, W. & Xi, G. Thrombin-induced neuronal protection: role of the mitogen activated protein kinase/ribosomal protein S6 kinase pathway. *Brain Res* **1361**, 93-101, doi:10.1016/j.brainres.2010.09.025 (2010).
- 235 Tamura, K., Takashima, H., Fumoto, K., Kajihara, T., Uchino, S., Ishihara, O., Yoshie, M., Kusama, K. & Tachikawa, E. Possible Role of alpha1-Antitrypsin in Endometriosis-Like Grafts From a Mouse Model of Endometriosis. *Reprod Sci* **22**, 1088-1097, doi:10.1177/1933719115570901 (2015).
- 236 Morshed, S. A., Ando, T., Latif, R. & Davies, T. F. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology* **151**, 5537-5549, doi:10.1210/en.2010-0424 (2010).
- 237 Chi, L., Li, Y., Stehno-Bittel, L., Gao, J., Morrison, D. C., Stechschulte, D. J. & Dileepan, K. N. Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res* **21**, 231-240, doi:10.1089/107999001750169871 (2001).
- 238 Zhou, C. C., Irani, R. A., Dai, Y., Blackwell, S. C., Hicks, M. J., Ramin, S. M., Kellems, R. E. & Xia, Y. Autoantibody-mediated IL-6-dependent endothelin-1 elevation underlies pathogenesis in a mouse model of preeclampsia. *J Immunol* **186**, 6024-6034, doi:10.4049/jimmunol.1004026 (2011).
- 239 Leonard, M., Ryan, M. P., Watson, A. J., Schramek, H. & Healy, E. Role of MAP kinase pathways in mediating IL-6 production in human primary mesangial and proximal tubular cells. *Kidney Int* **56**, 1366-1377, doi:10.1046/j.1523-1755.1999.00664.x (1999).
- 240 Khan, K., Xu, S., Nihtyanova, S., Derrett-Smith, E., Abraham, D., Denton, C. P. & Ong, V. H. Clinical and pathological significance of interleukin 6 overexpression in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* **71**, 1235-1242, doi:10.1136/annrheumdis-2011-200955 (2012).
- 241 Asokanathan, N., Graham, P. T., Fink, J., Knight, D. A., Bakker, A. J., McWilliam, A. S., Thompson, P. J. & Stewart, G. A. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol* **168**, 3577-3585, doi:10.4049/jimmunol.168.7.3577 (2002).
- 242 Li, B., Zou, Z., Meng, F., Raz, E., Huang, Y., Tao, A. & Ai, Y. Dust mite-derived Der f 3 activates a pro-inflammatory program in airway epithelial cells via PAR-1 and PAR-2. *Mol Immunol* **109**, 1-11, doi:10.1016/j.molimm.2019.02.018 (2019).

- 243 Zhang, H., Yang, X., Yang, H., Zhang, Z., Lin, Q., Zheng, Y., Chen, S., Yang, P. & He, S. Modulation of mast cell proteinase-activated receptor expression and IL-4 release by IL-12. *Immunol Cell Biol* **85**, 558-566, doi:10.1038/sj.icb.7100085 (2007).
- 244 Yang, K., Fan, B., Zhao, Q., Ji, Y., Liu, P., Gao, S., Ren, T., Dou, Y., Pei, M. & Yang, H. Hirudin Ameliorates Renal Interstitial Fibrosis via Regulating TGF-beta1/Smad and NF-kappaB Signaling in UUO Rat Model. *Evid Based Complement Alternat Med* **2020**, 7291075, doi:10.1155/2020/7291075 (2020).
- 245 Pontrelli, P., Cariello, M., Rascio, F., Gigante, M., Verrienti, R., Tataranni, T., Castellano, G., Divella, C., Ranieri, E., Stallone, G., Gesualdo, L. & Grandaliano, G. Thrombin may modulate dendritic cell activation in kidney transplant recipients with delayed graft function. *Nephrol Dial Transplant* **30**, 1480-1487, doi:10.1093/ndt/gfv129 (2015).
- 246 Choi, J., Aubert, O., Vo, A., Loupy, A., Haas, M., Puliyananda, D., Kim, I., Louie, S., Kang, A., Peng, A., Kahwaji, J., Reinsmoen, N., Toyoda, M. & Jordan, S. C. Assessment of Tocilizumab (Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal) as a Potential Treatment for Chronic Antibody-Mediated Rejection and Transplant Glomerulopathy in HLA-Sensitized Renal Allograft Recipients. *Am J Transplant* **17**, 2381-2389, doi:10.1111/ajt.14228 (2017).
- 247 Doberer, K., Duerr, M., Halloran, P. F., Eskandary, F., Budde, K., Regele, H., Reeve, J., Borski, A., Kozakowski, N., Reindl-Schwaighofer, R., Waiser, J., Lachmann, N., Schranz, S., Firbas, C., Muhlbacher, J., Gelbenegger, G., Perkmann, T., Wahrmann, M., Kainz, A., Ristl, R., Halleck, F., Bond, G., Chong, E., Jilma, B. & Bohmig, G. A. A Randomized Clinical Trial of Anti-IL-6 Antibody Clazakizumab in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol*, doi:10.1681/ASN.2020071106 (2020).
- 248 Cabral-Marques, O., Marques, A., Giil, L. M., De Vito, R., Rademacher, J., Gunther, J., Lange, T., Humrich, J. Y., Klapa, S., Schinke, S., Schimke, L. F., Marschner, G., Pitann, S., Adler, S., Dechend, R., Muller, D. N., Braicu, I., Sehouli, J., Schulze-Forster, K., Trippel, T., Scheibenbogen, C., Staff, A., Mertens, P. R., Lobel, M., Mastroianni, J., Plattfaut, C., Gieseler, F., Dragun, D., Engelhardt, B. E., Fernandez-Cabezudo, M. J., Ochs, H. D., Al-Ramadi, B. K., Lamprecht, P., Mueller, A., Heidecke, H. & Riemekasten, G. GPCR-specific autoantibody signatures are associated with physiological and pathological immune homeostasis. *Nat Commun* **9**, 5224, doi:10.1038/s41467-018-07598-9 (2018).
- 249 Hansen, M. B., Svenson, M., Abell, K., Yasukawa, K., Diamant, M. & Bendtzen, K. Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur J Immunol* **25**, 348-354, doi:10.1002/eji.1830250207 (1995).
- 250 Kiessling, M. K. & Rogler, G. Targeting the RAS pathway by mitogen-activated protein kinase inhibitors. *Swiss Med Wkly* **145**, w14207, doi:10.4414/smw.2015.14207 (2015).
- 251 Gryka, R. J., Buckley, L. F. & Anderson, S. M. Vorapaxar: The Current Role and Future Directions of a Novel Protease-Activated Receptor Antagonist for Risk Reduction in Atherosclerotic Disease. *Drugs R D* **17**, 65-72, doi:10.1007/s40268-016-0158-4 (2017).
- 252 Morrow, D. A., Braunwald, E., Bonaca, M. P., Ameriso, S. F., Dalby, A. J., Fish, M. P., Fox, K. A., Lipka, L. J., Liu, X., Nicolau, J. C., Ophuis, A. J., Paolasso, E., Scirica, B. M., Spinar, J., Theroux, P., Wiviott, S. D., Strony, J., Murphy, S. A., Committee, T. P. T. S. & Investigators. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* **366**, 1404-1413, doi:10.1056/NEJMoa1200933 (2012).

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Michèle Simon, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Wirkung von Antikörpern gegen den Protease-aktivierten Rezeptor-1 auf molekulare Pathomechanismen bei der Abstoßung von Transplantatnieren“ 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

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. med. Duska Dragun für die Möglichkeit bedanken diese Arbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. med. Klemens Budde danke ich herzlich, dass er mir die Beendigung ermöglicht hat.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. rer. nat. Rusan A. Catar für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit. Herzlichen Dank. Auch Frau Dr. med. Angelika Kusch möchte ich für Ihre hilfreichen Anmerkungen zur Fertigstellung dieser Arbeit herzlich danken.

Besonderer Dank gilt zudem auch allen Wegbegleitern während meines experimentellen Wirkens, insbesondere Frau Dr. rer. nat. Diana Freitag, für den beständigen fruchtbaren Diskurs meiner Ideen sowie der entgegenbrachten Unterstützung in deren Umsetzung.

Dank gebührt insbesondere aber auch meinen Freunden ohne deren tatkräftige Unterstützung diese Arbeit nicht möglich geworden wäre.

Dir lieber Joseph danke ich für die beständige Freude, die Du in mein Leben gebracht hast in diesen turbulenten Jahren. Und auch euch Eltern, Großeltern, Michael und Sebastian, danke ich für eure Unterstützung.

Herzlichen Dank!