Charakterisierung der autoimmun-vermittelten Signaltransduktion über Angiotensin II Typ 1-und Endothelin-1 Typ A Rezeptoren in systemischer Sklerose

vorgelegt von
Diplom-Chemikerin
Melanie Näther
geboren in Wolmirstedt

Von der Fakultät II - Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr.rer.nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Friedrich
Berichter/Gutachter: Prof. Dr. Duska Dragun
Berichter/Gutachter: Prof. Dr. Roderich Süssmuth

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05.03.2010

Berlin 2010

D 83

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 5

2 ZUSAMMENFASSUNG 8

3 EINLEITUNG 9

3.1 Sklerodermie 9
3.1.1 Systemische Sklerose 10

3.2 Angiotensin II 12
3.2.1 Biosynthese von Angiotensin II 13

3.3 Das Endothelin-System 14

3.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren 16
3.4.1 Die Angiotensin II- und Endothelin-1 Rezeptoren 17

3.5 Hypertonie 18
3.5.1 Autoimmune Pathomechanismen kardiovaskulärer Veränderungen 20

3.6 Fragestellung 23

4 MATERIAL 24

4.1 Zelllinie 24

4.2 Material 24

4.3 Stimulanzien (Agonisten/Antagonisten/Inhibitoren) 24

3.4 Kommerzielle Kits 25

4.5 Chemikalien 25

4.6 Lösungen und Puffer 26

4.7 Geräte 28

5 METHODEN 29

5.1 Zellkultur 29
5.1.1 Kultivierung 29
5.1.2 Lagerung der Zellen 29

5.2 IgG-Isolation 29
5.2.1 Patientenmaterial 30
5.2.2 Probenvorbereitung 30
5.2.3 Säulenvorbereitung und IgG-Isolation 30
5.2.4 Lagerung und Reinigung der Säulen 31

5.3 Genexpressionsanalyse 31
5.3.1 RNA-Isolation 31
5.3.2 Messung der Extinktion der RNA 32

5.3.3 Qualitätsprüfung der RNA durch Gelelektrophorese 32
5.3.4 Reverse Transkription 32
5.3.5 Konventionelle PCR 33
5.3.6 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR) 33

5.4 Zytotoxizitätstest 34
5.4.1 MTT-Test 34

5.5 Proteinanalysen 35
5.5.1 Proteinextraktionen 35
5.5.2 Proteinbestimmung 36
5.5.3 Western Blot Analyse 37
5.5.4 Gelretardationsexperiment (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA) 38

5.6 Funktionelle Tests 40
5.6.1 BrdU-ELISA 40
5.6.2 Konfokale Mikroskopie/Fluoreszensmikroskopie 41

5.7 Statistik 41

6 ERGEBNISSE 42

6.1 Versuchsübersicht 42

6.2 Vorversuche 43
6.2.1 Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorexpression 43
6.2.2 Vitalität der HMEC-1 43

6.3 ERK1/2-Signaltransduktionsweg 45
6.3.1 Untersuchung von Mitogen- aktiviertem Proteinkinase Signalwegen (MAPK) 45
6.3.2 Dosis- und Zeitverläufe 45
6.3.3 Einfluss der natürlichen Liganden (Ang II, ET-1) und Patienten-IgG auf ERK1/2-Phosphorylierung 47
6.3.4 Einfluss eines MEK1/2-Inhibitors auf die AT_1-und ET_AR-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung 49

6.4 Untersuchung des Transkriptionsfaktors Ets-1 und Tissue Factor 50
6.4.1 Tissue Factor 50
6.4.2 Genexpressionsanalyse 51
6.4.3 Lokalisation von Ets-1 und phosphoryliertem Ets-1 51
6.4.4 Einfluss der natürlichen Liganden (Ang II und ET-1) und Patienten-IgG auf die Phosphorylierung von Ets-1 54
6.4.5 Nachweis von Tissue Factor in Proteinextrakten 56
6.4.6 Aktivierung des TF-Promotors durch Ets-1 Expression 57

6.5 Proliferationsexperimente mittels BrdU-Einbau 58

7 DISKUSSION 62

8 LITERATURVERZEICHNIS 68

9 ANHANG 73

9.1 Angiotensin II Rezeptorblocker 73

9.2 Endothelin-1 Rezeptorblocker 74

9.3 Raf-Inhibitor 75

9.4 MEK1/2-Inhibitor 76

10 DANKSAGUNG 76

11 VERÖFFENTLICHUNGEN 77

11.1 Publikation 77

11.2 Kongressbeiträge 77

1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
Ang II	Angiotensin II
Ang III	Angiotensin 2-8
Ang IV	Angiotensin 1-7, Angiotensin 3-8
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AT_1R	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT_2R	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
AT_1RAA	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor Autoantikörper
ADCC	Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Zytoxität
AECA	anti-Endothelzell-Antikörper
BrdU	5-Brom-2`-desoxy-uridin
BSA	Bovines Serumalbumin
c	konstant
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid*)
CTP	C-terminalen Peptids
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
DTT	Dithiothreitol
Ets-1	E26 Erythroblastomavirus transformationsspezifisch
ET-1	Endothelin-1
ET-2	Endothelin-2
ET-3	Endothelin-3
ET_AR	Endothelin-1 Typ A Rezeptor
ET_BR	Endothelin-1 Typ B Rezeptor
E. coli	Escherichia coli
ECE-1	Endothelin-converting-enzymes-1
EDRF	Endothelin-derived relaxing factor

EGF	*epidermal-growth-factor*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxy-bis(ethylennitrilo)-tetraessigsäure
ERK1/2	extracellular regulated kinase
EL	extrazelluläre Schleife
FACS-Puffer	*fluorescence activated cell sorting*-Puffer
FCS	Fötales Kälberserum
GapdH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GW5074	3-(3,5-Dibrom-4-hydroxybenzyliden)-5-iod-1,3-dihydroindol-2-on
h	heavy
HMEC-1	human microvascular endothelial cell
l	light
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	intrazelluläre Schleife
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilodalton
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK1/2	MAPK/ERK-Kinase
mRNA	*messenger RNA*
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaH_2PO_4	Natriumhydrogendiphosphat
PFA	Paraformaldehyd
PBS	*phosphate buffered saline*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD98059	2´-Amino-3´-methoxyflavon
PD184352	2-(2-Chlor-4-iod-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluor-benzamid
PD123319	S-(+)-1-[(4-(Dimethylamino)-3-methylphenyl)methyl]-5 (diphenylacetyl)-4,5,6,7-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-c]pyridine-6-carbonsäure
PI	Propidiumiodid
25xcomplets	Protease Inhibitor Cocktail

PAH	pulmonaler arterieller Hypertonie
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
Raf-1	rapidly growing fibrosarcoma
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
RAS	Renin Angiotensin System
HCl	Salzsäure
Scl-70	Antikörper gegen Topoisomerase I
SLE	systemischer Lupus erythematodes
Ssc	systemische Sklerose
dc Ssc	diffuse systemische Sklerose
lc Ssc	limitierte systemische Sklerose
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TEMED	*N*,*N*,*N'*,*N'*-Tetramethylethan-1,2-diamin
TF	Tissue Factor
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
TM	Transmembrandomainen
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung *(tris buffered saline)*
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
v	variabel

2 Zusammenfassung

Die systemische Sklerose ist eine seltene und komplexe Multisystemerkrankung, charakterisiert durch Vaskulopathie (Gefäßveränderungen), Gewebefibrose und der Bildung von Autoantikörpern gegen verschiedene Antigene. Im fortschreitenden Verlauf der Erkrankung können Dysfunktionen und Ausfälle verschiedener Organe auftreten. Pathogenetisch stehen funktionelle Veränderungen der Endothelzellen im Vordergrund. Durch gestörte Vasodilatation (verminderte NO-Produktion) und gesteigerte Vasokonstriktion (vermehrte Bildung von Endothelin-1 (ET-1) und Angiotensin II (Ang II) kommt es zu Störungen in der Gewebeperfusion. Ang II und ET-1 vermitteln ihre physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen über vier Rezeptoren (AT_1,-AT_2,-ET_A-und ET_B-Rezeptor). Die direkte pharmakologische Blockade der Rezeptoren mit spezifischen Anatagonisten wird teilweise erfolgreich bei der Behandlung der systemischen Sklerose eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es autoimmun-vermittelte Änderungen an Rezeptoren über die Signaltransduktion an einer mikrovaskulären endothelialen Zelllinie der Haut (HMEC-1) zu untersuchen. Es wurden die Effekte der natürlichen Liganden Ang II und ET-1 mit immunologisch bedingten Mechanismen durch isoliertes IgG von Patienten mit systemischer Sklerose auf die Aktivierung des Signaltransduktionsweges ERK1/2/Ets-1 verglichen. Sowohl die Liganden als auch IgG von erkrankten Patienten führten zu einer gesteigerten Phosphorylierung. Darüber hinaus wurde ausschließlich durch Stimulation mit Patienten-IgG eine Zunahme der Endothelzellproliferation beobachtet. Spezifische Blockade von AT_1R und ET_AR reduzierte die ERK1/2/Ets-1 Aktivierung deutlich. AT_2R- und ET_BR-Antagonisten zeigten dagegen keinen inhibierbaren Effekt. In weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Inhibition der ERK1/2-Vorläuferkinasen Raf-1 und MEK1/2 die aktivierenden Effekte durch Patienten-IgG sowie die natürlichen Liganden verhindert wurden. Ein häufiges pathomorphologisches Korrelat der Gefäßveränderungen bei Patienten mit systemischer Sklerose sind Mikrothrombosen. Deshalb wurden Unterschiede in der Regulation und Expression des prokoagulatorischen und prothrombotischen Proteins Tissue Factor untersucht. Auf Ebene der Gen- und der Proteinexpression konnte eine gesteigerte Aktivierung von Tissue Factor nach Stimulation mit Patienten-IgG nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Bindung zwischen Ets-1 und dem Tissue Factor Promotor observiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das IgG von Patienten mit systemischer Sklerose proliferationssteigernde Signalwege in Endothelzellen aktiviert. Damit konnte eine immunologisch bedingte Rezeptoraktivierung als möglicher Pathomechanismus identifiziert werden. Hieraus ergeben sich neue therapeutische Optionen durch Immunmodulation und Rezeptorblockade in der Behandlung von Patienten mit systemischer Sklerose.

3 Einleitung

Die systemische Sklerose ist eine verheerende Multiorgankrankheit, die charakterisiert ist durch Autoimmunität, Fibrosierung der Haut und innerer Organe, durch vermehrte Ablagerung von Matrixproteinen wie Kollagen, sowie eine schwere obliterative Vaskulopathie (verengende Gefäßerkrankung). Der Verlauf ist häufig sehr schwer mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 54-66%.[1]

Diagnose und Behandlung der systemischen Sklerose (SSc) sind anspruchsvoll, nicht zuletzt aufgrund der Vielzahl der betroffenen Organsysteme wie Gastrointestinaltrakt, Lunge, Herz und Nieren, die abhängig vom Subtyp der Erkrankung sehr unterschiedlich sein können. Pharmakologische Strategien zielen einerseits auf eine Unterdrückung der Autoimmunität durch Immunsuppressiva und andererseits auf eine Inhibierung vasokonstriktiver Systeme ab. Durch direkte Blockade spezifischer Rezeptoren der zwei hauptverantwortlichen Systeme, nämlich des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Endothelin-Systems, kann eine Vasodilatation (Gefäßerweiterung) und damit eine Verringerung der Folgen der Vaskulopathie erreicht werden.[2, 3]

Bis heute gibt es aber noch keine zugelassene spezifische Therapie, die das Fortschreiten der Krankheit verhindern oder auch nur verlangsamen kann. Insbesondere sind immunsuppressive Strategien trotz der immer vorhandenen Autoimmunität häufig wirkungslos. Dies zeigt, dass die pathophysiologischen Zusammenhänge von Immunsystem und Gefäßsystem noch immer nicht verstanden sind.

3.1 Sklerodermie

Der Begriff Sklerodermie wurde aus dem Griechischen hergeleitet und bedeutet übersetzt „harte Haut“. Maßgebliche Faktoren für die Erkrankung sind: Vaskulopathie (Veränderungen im Gefäßsystem), Autoantikörper gegen verschiedenste zelluläre Antigene und großflächige Fibrosierung. Die Prävalenz (Häufigkeit) der Krankheit liegt bei 50-300 Fällen pro einer Millionen Menschen und die Anzahl der Inzidenz (Neuerkrankungen) liegt bei 2.3-22.8 Fällen pro eine Millionen Menschen.[4]

Unterteilt wird die Sklerodermie in zirkumskripte (lokalisierte) Sklerodermie, systemische Sklerose sowie das Overlap-Syndrom, wobei die zikumskripte Sklerodermie unterschieden werden kann in: herdförmige zirkumskripte Sklerodermie, Morphea und lineare Sklerodermie. (Abbildung 1) Im Vergleich zur systemischen Sklerose handelt es sich bei der zirkumskripten

Variante um eine rein kutane Verlaufsform ohne Beteiligung innerer Organe, die auf Gesicht und Akren beschränkt ist und nicht lebensbedrohlich ist. Beim Overlap-Syndrom handelt es sich um eine Überlappung von verschiedenen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Lupus erythematodes, Rheumatoider Arthritis, Dermatomyositis und Polymyositis. Hierzu gehört auch die sogenannte Mischkollagenose (SHARP-Syndrom). Im Folgenden wird lediglich auf die systemische Sklerose näher eingegangen.[5]

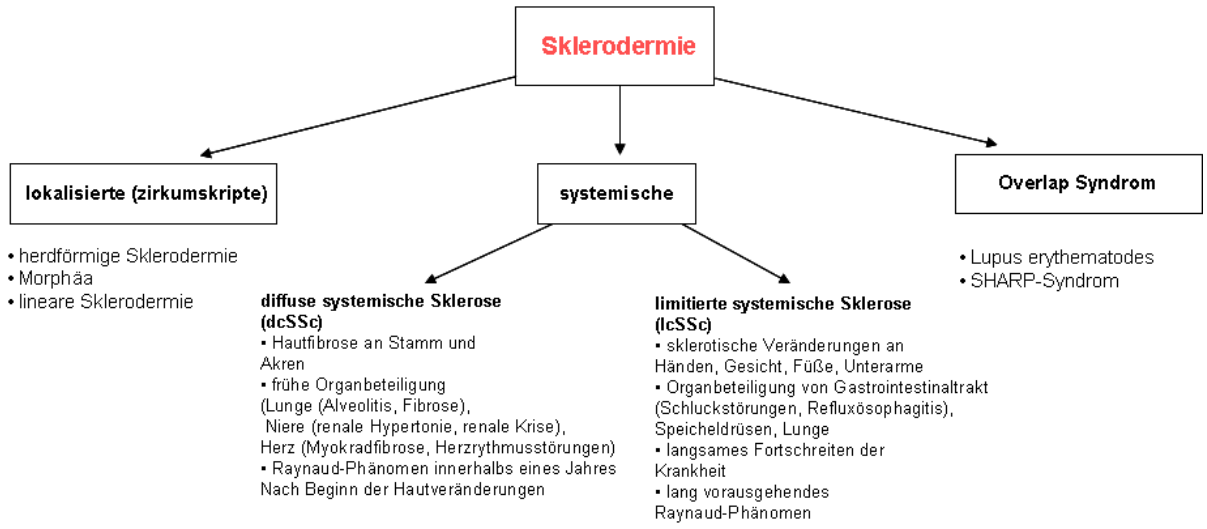


Abbildung 1: Einteilung der verschiedenen Sklerodermieerkrankungen mit lokalisierter Sklerodermie, Overlap-Syndrom und systemischer Sklerose, die unterteilt ist in: diffuse systemische Sklerose und limitierte systemische Sklerose.

3.1.1 Systemische Sklerose

Die systemische Sklerose (SSc) ist eine generalisierte Erkrankung aus dem Gebiet der Kollagenosen, bei der neben der Haut verschiedene innere Organe wie z.B. Lunge, Herz, Nieren und Gastrointestinaltrakt betroffen sind.

Durch das Ausmaß der Organbeteiligung wird die Schwere der Krankheit bestimmt. Wenn z.B. die Nieren involviert sind, wird eine erhöhte Eiweißausscheidung, Hypertonie (Bluthochdruck), sowie eine zunehmende Nierenfunktionsstörung verzeichnet, die in Nierenversagen und Dialysepflichtigkeit enden kann.[6] Bei einer Lungenbeteiligung kommt es durch die fortschreitende Fibrose (Vermehrung des Bindegewebes) des Lungengewebes zu Atemnot.[7]

Als erstes zeigen sich morphologische Veränderungen an den Blutgefäßen, noch bevor es zu klinischen Symptomen der Krankheit kommt. Die Krankheit ist durch Autoantikörperproduktion und Inflammation (Entzündung) aber auch durch ein

pathologisches Zusammenspiel von Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblasten gekennzeichnet, was in Gefäßobliteration und Gewebsfibrosierung resultiert.[8]

Man unterteilt die systemische Sklerose in eine diffuse und eine limitierte Form. (Abbildung 1) Der limitierten SSc geht meist ein langjähriges Raynaud-Phänomen voraus. Hierbei handelt es sich um eine Dysfunktion der Vasomotorik (Fehlregulation der Gefäßmuskulatur), bei dem plötzliche Vasospasmen (Gefäßkrämpfe) der kleinen arteriellen Gefäße vorwiegend an Händen und/oder Füßen auftreten und zu einem Abblassen der Akren (Finger, Zehen) führen, gefolgt von Zyanose (bläuliche Verfärbung der Haut) und schmerzhaft reaktiver Hyperämie (überschießende Durchblutung). Häufige Auslöser sind Kältereize, aber auch emotionale Anspannung und Stress. Das Raynaud-Phänomen ist nicht spezifisch für die SSc, lediglich das sekundäre Raynaud-Phänomen wird mit Kollagenosen wie der SSc assoziiert und tritt hier in ca. 90% der Fälle auf.

Die Vaskulopathie tritt in der SSc bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt auf und ist mit einer Endothelzellschädigung assoziiert. Es kommt zu einer Hochregulierung von vasokonstriktiven, thrombogenen und proinflammatorischen Faktoren einerseits und zu einer Herunterregulierung von vasodilatatorischen (gefäßerweiternden) und anti-thrombotischen Faktoren andererseits. Durch dieses Ungleichgewicht kommt es zu Vasokonstriktion, intimaler Proliferation und Thrombose. Die Gefäße verlieren an Elastizität, werden enger und können schließlich vollständig obliteriert (verschlossen) sein. In Abbildung 2 ist schematisch die Entwicklung der Vaskulopathie (Obliteration und Thrombose) dargestellt. Die Obliteration beginnt in der Media (Gefäßmitte mit glatten Muskelzellen) und dehnt sich auf die Intima (Gefäßinnenschicht mit Endothelzellen) und die Adventitia (Gefäßaußenschicht) aus, wodurch die Gefäße ihre Elastizität verlieren.[9]

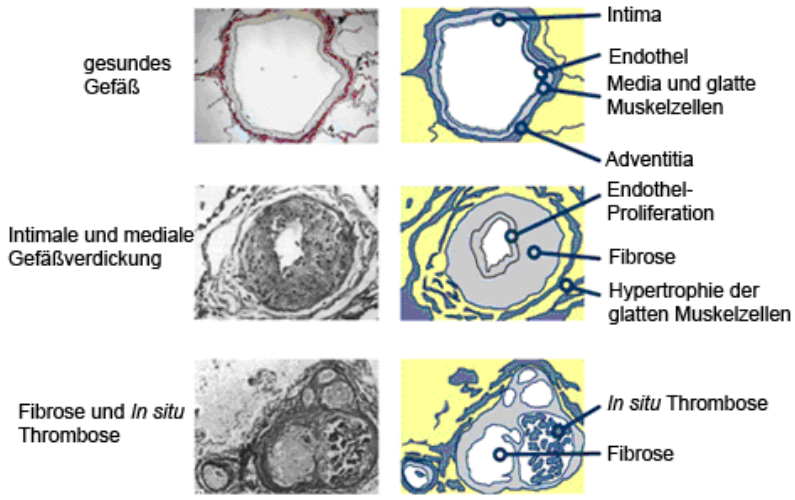


Abbildung 2: Vaskulopathie in der SSc: dargestellt sind Aufnahmen von Gefäßen auf der linken Seite (gesund bis zur Vaskulopathie), schematische Darstellung der Erkrankung auf der rechten Seite [100]

Wichtige Mediatoren für die systemische Sklerose sind Wachstumsfaktoren und Zytokine (Regulatoren von Wachstum und Differenzierung von Zellen), sowie Autoantikörper. Ein potentes profibrotisches Zytokin ist Transforming Growth Factor beta (TGF-ß). In einer Studie von Whitfield et al. wurde eine erhöhte Expression von TGF-β in Hautproben von SSc-Patienten gefunden.[10] Shephard et al. veröffentlichten 2004, dass TGF-ß in Verbund mit der biologisch aktiven Substanz Endothelin-1 (ET-1) Fibroblasten in Myofibroblasten umwandeln kann. Myofibroblasten sind eine spezielle Untergruppe von Fibroblasten, die unter anderem an der Wundheilung beteiligt sind.[11] Die Inhibierung von Endothelin-1-Rezeptoren hatte einen positiven Einfluss auf die pulmonale Hypertonie bei SSc-Patienten. Eine Überexpression von TGF-ß kann in Lungenfibroblasten durch ET-1 Inhibierung unterbunden werden.[12] Durch diese Daten wird deutlich, dass ET-1 eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der SSc spielt.
Die SSc wird des Weiteren mit verschiedenen Autoantikörpern assoziiert. Deren Detektion kann nicht nur für die Diagnose der Krankheit hilfreich sein, sondern auch für die Abschätzung der Schwere und des Risikos von Organkomplikationen und für eine Prognose herangezogen werden. Zu den bisher nachgewiesenen Autoantikörpern zählen unter anderem Antikörper gegen Topoisomerase I (Scl-70) und Zentromer-assoziierte Proteine. Anti-Scl-70-Antikörper treten vor allem bei der diffusen Form und anti-Zentromer-Antikörper bei der limitierten Form der SSc auf.[5]

3.2 Angiotensin II

1940 berichtete Braun-Menendez erstmalig von einer vasokonstriktorischen (gefäßverengenden) Substanz, die aus Nierenblut eines hypertensiven Hundes isoliert wurde.[13] Diese Substanz wurde „Hypertensin“ in Argentinien und „Angiotonin“ in den USA genannt, noch bevor sie isoliert und charakterisiert wurde.[14, 15] Später stellte sich heraus, dass es um ein und dasselbe Peptid handelte. 1958 bekam das Peptid dann seinen endgültigen Namen von Braun-Menedez und Page: „Angiotensin“. Die Sequenz von Angiotensin II in Mensch, Pferd und Schwein ist: **H_2N-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH**.[16] 1987 bekam Angiotensin die Abkürzung Ang von der American Heart Association und wurde als Kürzel für alle Angiotensin-Peptide benutzt.[17]
Angiotensin II (Ang II) spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der kardiovaskulären Homöostase. Es kann als Peptidhormon angesehen werden, das den Gefäßwiderstand und somit den Blutdruck reguliert. Das Spektrum von Ang II umfasst unterschiedliche Zielgewebe. Hierzu zählen neben glatten Gefäßmuskelzellen unter anderem auch Niere und

Gehirn. Angiotensin wird nicht nur im Blutkreislauf gebildet, sondern kann auch lokal in zahlreichen Geweben wie dem Gehirn, den Nieren, aber auch in den Gefäßwänden selbst synthetisiert werden. Somit zählt Angiotensin II zu den autokrinen und parakrinen Hormonen, die Zellwachstum und Proliferation induzieren, aber auch extrazelluläre Matrixformation kontrollieren.[18] Andere Angiotensin-Metabolite mit biologischer Aktivität sind Angiotensin 2-8 (Ang III), Angiotensin 1-7 und Angiotensin 3-8 (Ang IV).[19, 20]

3.2.1 Biosynthese von Angiotensin II

Angiotensin II wird nicht nur systemisch gebildet und wirksam, sondern auch lokal. Somit wird zwischen systemischem und lokalem Renin-Angiotensin-System unterschieden (Abbildung 3).

Angiotensin II entsteht in mehreren Schritten aus Angiotensinogen, welches aus der Leber stammt. In einer ersten Reaktion wird Angiotensinogen von Renin zu Angiotensin I umgesetzt. Renin ist ein Glykoprotein und wird in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildet. Im Blut hat es die Funktion einer Protease, die von Angiotensinogen das aktivierte Dekapeptid Angiotensin I abspaltet. Durch das **A**ngiotensin **C**onverting **E**nzyme (ACE) wird ein Dipeptid von Ang I abgespalten, wodurch aus diesem Ang II entsteht.

Beim lokalen RAS werden die biochemischen Komponenten, die zur Bildung von Ang II erforderlich sind, von ortständigen Zellen gebildet. Diese Systeme sind daher unabhängig von den zirkulienden Faktoren und können sehr effektiv in einzelnen Gewebskompartimenten Ang II bereitstellen, das ausgeprägte lokale Effekte hervorruft, ohne systemisch zu wirken. Die Existenz lokaler RAS wurde in vielen Organen belegt, mit besonders starkem Auftreten in Blutgefäßen, Herz, Niere und Immunsystem.[21, 22]

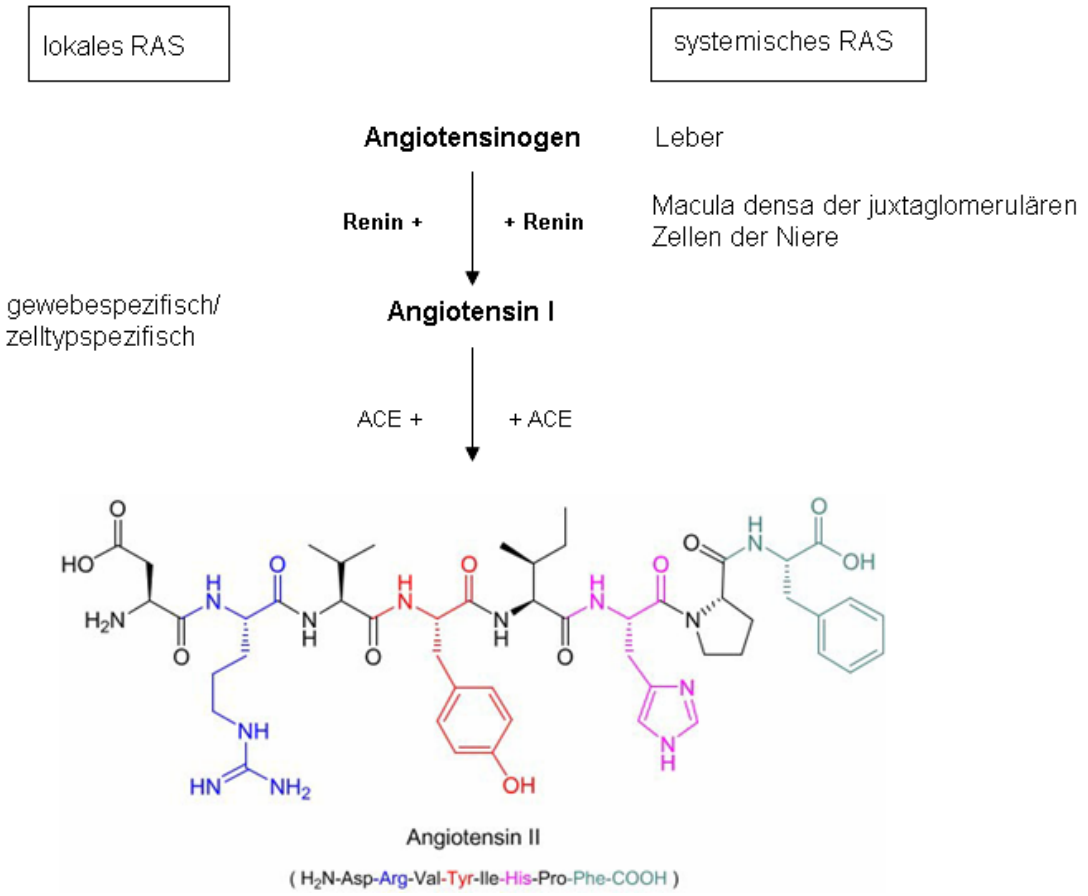


Abbildung 3: Renin-Angiotensin-System (RAS) mit Unterteilung in lokales und systemisches RAS und Struktur des Octapeptids Angiotensin II

3.3 Das Endothelin-System

1980 berichteten erstmalig Furchgott und Zwadzki von einer Endothel-abhängigen Vasodilatation. Das Endothel ist eine wichtige Einheit bei der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur.[23] Es wurde beschrieben, dass bei Stimulation von Endothelzellen mit vasoaktiven Substanzen, wie z.B. Acetylcholin, kurzlebige Produkte exprimiert werden, die **E**ndothelin-**d**erived **r**elaxing **f**actor (EDRF) genannt wurden. Einer dieser Faktoren wurde als Stickstoffmonoxid identifiziert.[24] Hickey, Gillespie und O'Brien berichteten von einer vasokonstriktiven Aktivität in Überständen von Endothelzellkulturen.[25-27] Yanagisawa et al. isolierten 1988 aus Überständen von Schweineaortenendothelzellen ein Peptid von 21 Aminosäuren, welches Endothelin genannt wurde und starke vasokonstriktorische Fähigkeiten aufwies.[28] Später wurde gefunden, dass Endothelin ein Spektrum an biologischen Aktivitäten zeigt, wie z.B. regionale vasodilatatorische Effekte *in vivo* oder auch

Stimulation und Proliferation glatter Muskelzellen und Fibroblasten.[29,30, 31] Endothelin existiert in drei Isoformen, das „klassische“ Endothelin-1 (ET-1), Endothelin-2 (ET-2) und Endothelin-3 (ET-3). Alle Isoformen besitzen zwei Disulfidbrücken, die durch 4 Cysteinreste gebildet werden und eine carboxyterminale Sequenz, die für die Aktivität verantwortlich ist.[32] Die dominierende Form der Endothelin-Peptide ist Endothelin-1. Die Regulation der Endothelin-1 Synthese ist ein sehr komplexer Prozess, der nicht nur das Endothel und andere Zellen als Ort einschließt, sondern auch z.B. Wachstumsfaktoren beinhaltet.[33,34] In Abbildung 4 ist schematisch die Synthese von Endothelin-1 dargestellt. Vorrangig wird ET-1 in den Endothelzellen der Blutgefäße und *in vitro* in glatten Muskelzellen gebildet. [28,35] ET-2 wird in den Epithelzellen der Niere, Kardiomyozyten und Endothelzellen gebildet. ET-3 wurde im endokrinen System, im ZNS und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen.[33]

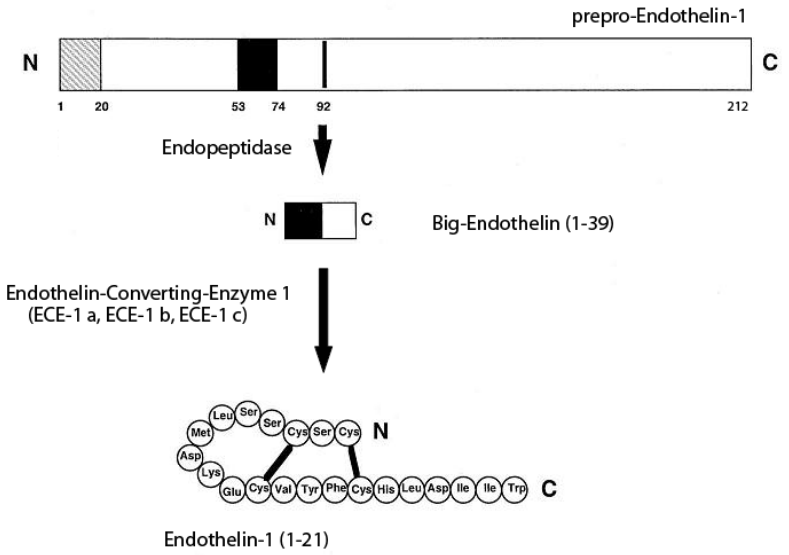


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Biosynthese von Endothelin-1 aus prepro-Endothelin [101]

Die Biosynthese von Endothelin-1 beinhaltet eine Reihe proteolytischer Schritte. Abgeleitet ist ET-1 von einem 212 Aminosäuren großem Precursorprotein, dem prepro-Endothelin-1. Durch eine neutrale Endopeptidase wird das prepro-Endothelin-1 in das aktive big-Endothelin-1 (pro-Endothelin-1) umgewandelt. In einem nächsten Schritt, einer weiteren Proteolyse, wird das pro-Endothelin durch Abspaltung eines C-terminalen Peptids (CTP), mittels substratspezifischen **E**ndothelin-**c**onverting-**e**nzymes-1 (ECE-1), in Endothelin-1 umgewandelt. Die ECEs gehören zur Familie der Zinkfinger-Metalloproteinasen

(Matrix-Metalloproteinasen). Durch alternatives Splicing entstehen drei ECE-1 Isoformen, wobei ECE-1 a und c auf der Zelloberfläche und ECE-1 b intrazellulär lokalisiert sind. Die extrazellulären Formen von ECE-1 können das big-ET-1 außerhalb der Zelle spalten. Endogen produziertes big-ET-1 wird durch das intrazellulär lokalisierte ECE-1 b zum aktiven Peptid ET-1 umgewandelt. [36]

3.4 G-Protein gekoppelte Rezeptoren

G-Protein gekoppelte Rezeptoren (**G**-**P**rotein **c**oupled **r**eceptors, **GPCR**) stellen mit ca. 2000 verschiedenen Formen die größte Familie membranständiger Rezeptoren im Genom dar. Sie vermitteln physiologische Antworten auf eine Vielzahl von Stimulantien, wie z. B. Hormone, Peptide oder auch Proteine.

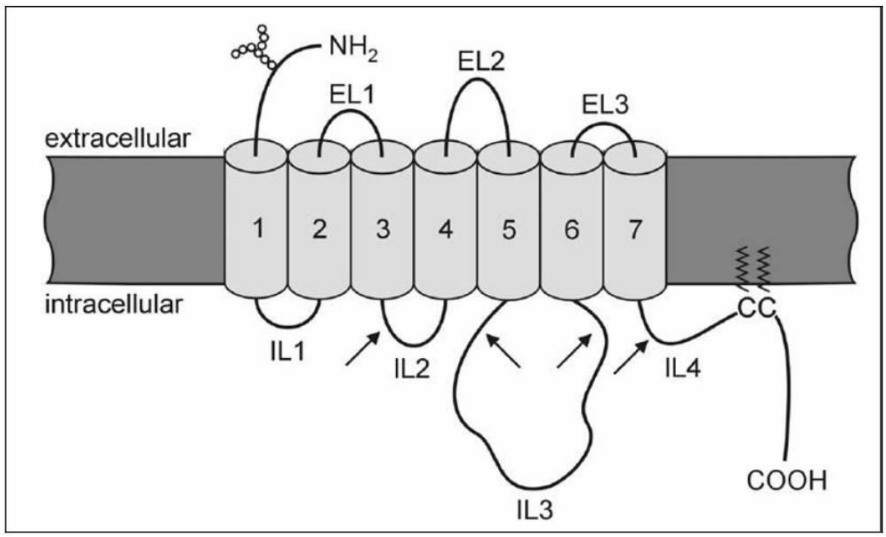


Abbildung 5: G-Protein gekoppelter Rezeptor (-NH_2 = Aminoterminus, -COOH = Carboxyterminus, EL1-3 = extrazelluläre Schleifen und IL1-4 = intrazelluläre Schleifen)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bestehen aus sieben hydrophoben α-helikalen **T**rans**m**embrandomainen (7-**TM**-Rezeptoren), die alternierend durch drei intrazelluläre (IL1-IL3) und drei extrazelluläre (EL1-EL3) Schleifen miteinander verbunden sind. Sie besitzen extrazelluläre oder transmembrane Bindungsdomäne für Liganden, sowie einen intrazellulären C-Terminus. Die sieben Transmembrandomainen sind für die Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran verantwortlich. Der NH_2-Terminus und die extrazellulären Domänen des Rezeptors sind häufig glykosyliert. In der zweiten extrazellulären Schleife

(EL 2) und am Anfang der dritten transmembranären Domäne des Rezeptors befinden sich zwei konservierte, zur Disulfidbrückenbildung befähigte Cysteine, welche die Struktur des Rezeptors stabilisieren, indem sie die Transmembrandomänen III bis V aneinander binden. Die intrazelluläre Seite des Rezeptors ist mit Bindungsstellen für G-Proteine und andere Signalmoleküle ausgestattet. An der Bindung von G-Proteinen sind insbesondere die Transmembrandomänen nahen Aminosäuren der zweiten (IL2) und dritten intrazellulären Schleife (IL 3) sowie der sich an die 7. Transmembrandomäne anschließende COOH-terminale Rest, beteiligt. Der intrazelluläre COOH-terminale Anteil ist in der Regel sehr kurz (meist unter 50 Aminosäuren). In Abbildung 6 ist der Mechanismus der Aktivierung von G-Protein schematisch dargestellt.

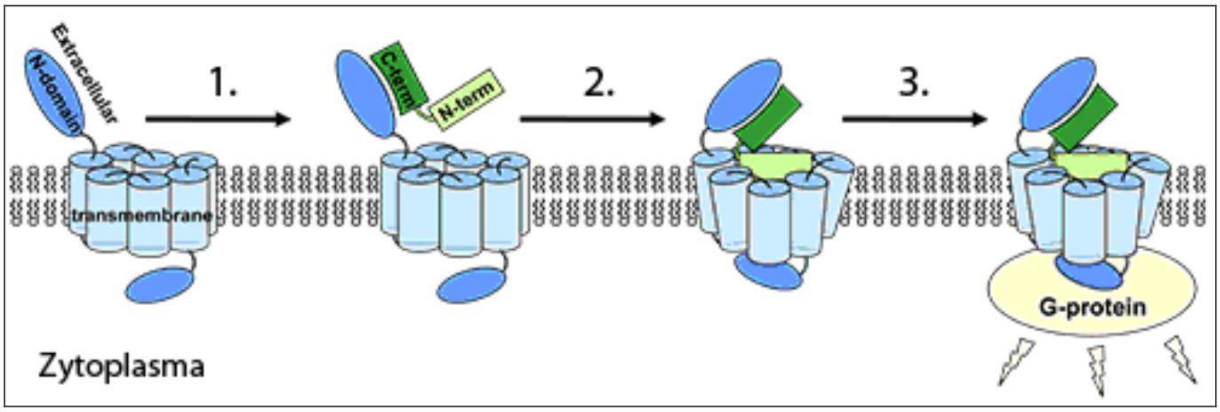


Abbildung 6: Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der Mechanismus der Rezeptoraktivierung unterliegt drei Schritten: 1. Signalinduzierung, 2. transmembranäre Signalweiterleitung und Bindung des G-Proteins, 3. Signaltransfer zu zytoplasmatischen Signalmolekülen.[37]

Wird der Rezeptor durch Ligandenbindung aktiviert, so führt dies zu Änderungen in der relativen Orientierung der Transmembranhelices, wodurch Bindungsstellen für G-Proteine freigelegt werden. Alle G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einem größeren α-Teil mit variablem Molekulargewicht und aus je einem β-und einem γ-Teil, die zwei kleinere aneinander gekoppelte Untereinheiten darstellen.[38, 39]

3.4.1 Die Angiotensin II- und Endothelin-1 Rezeptoren

Angiotensin II vermittelt seine Effekte über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, den Angiotensin II Typ 1 (AT_1R) und den Angiotensin II Typ 2 (AT_2R) Rezeptor. Des Weiteren

existieren zwei andere Rezeptoren, der AT_3R, exprimiert in Zelllinien und AT_4R, exprimiert in Herz, Lunge, Niere, Gehirn und Leber. Da aber beide Rezeptoren nicht komplett charakterisiert sind, sind sie nicht in der definierten Klassifizierung der „Säugetier"-AT Rezeptoren enthalten.[40] Der AT_1-Rezeptor besitzt im kardiovaskulären System die größte Bedeutung, denn über ihn werden die weithin bekannten Angiotensin II-Wirkungen wie Vasokonstriktion, Produktion von Wachstumsfaktoren, Hypertrophie der glatten Muskulatur und der Kardiomyozyten sowie Proliferationsreize vermittelt.[16]

Der AT_2-Rezeptor zeigt am Ende der Embryonalentwicklung seine stärkste Expression, was den Schluss nahe legt, dass er an embryonalen Entwicklungsprozessen maßgeblich beteiligt ist.[41] Im adulten Organismus wird er dagegen z.B. im Uterus, in bestimmten Hirnarealen, im Herz, in den Nieren, im Gefäßsystem, aber auch bei Reparaturprozessen der Haut exprimiert.[42] Im Gefäßsystem wurde der AT_2R in der Adventitia und in der Media gefunden, wohingegen der AT_1R stark in glatten Muskelzellen exprimiert ist.[43] In einigen Fällen scheint dem AT_2R die Rolle eines Gegenspielers zum AT_1R zuzukommen, denn AT_2-Rezeptoren können *in vitro* die proliferativen Effekte von AT_1-Rezeptoren antagonisieren.[44] Der AT_2-Rezeptor weist nur eine Homologie zu 34 % zum AT_1-Rezeptor auf.

Endothelin-1 vermittelt seine Effekte ebenfalls über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren den Endothelin-1 Typ A und Endothelin-1 Typ B-Rezeptor (ET_AR und ET_BR). Die strukturelle Analogie der beiden Endothelin-Rezeptoren auf Proteinebene ist sehr hoch, aber doch gehen sie unterschiedliche physiologische Reaktionen ein, resultierend in intrazelluläre Signalwege nach Agoniststimulation.[45]

Der ET_AR ist voranging auf glatten Muskelzellen exprimiert, wo er für eine lang anhaltende Vasokonstriktion nach Stimulation sorgt, wohingegen der ET_B-Rezeptor vermehrt auf vaskulären Endothelzellen lokalisiert ist und nach Aktivierung für eine kurze Vasodilatation verantwortlich ist.[46, 47] Es existiert aber auch eine Subpopulation von ET_BR mit vasokonstriktorischen Eigenschaften, die ebenfalls auf glatten Muskelzellen exprimiert sind.[48-50]

3.5 Hypertonie

Als manifeste Hypertonie gilt ein Blutdruck von >140 mmHg systolisch und/oder >90 mmHg diastolisch bei mindestens zwei Messungen an unterschiedlichen Tagen. Eingeteilt wird die Hypertonie in primär und sekundär, wobei Systemerkrankungen mit renaler Beteiligung zu den sekundären Ursachen zählen. [102]

Erstmalig wurde der Blutdruck 1733 von Strephen Hales bei einem Pferd bestimmt. Die Technik der modernen Messung mit einem Stethoskop und einer Druckmanschette wurde durch Nicolai Korotkov 1905 eingeführt.

Auslöser für einen erhöhten Blutdruck, können unter anderem ein erhöhter arterieller Gefäßtonus oder Umbauvorgänge in der Gefäßwand sein. Die arterielle Hypertonie ist ein unabhängiger Risikofaktor für Myokardinfarkt und Schlaganfall sowie für die Entstehung der linksventrikulären Hypertrophie.[51] Durch seine vasokonstriktorischen Eigenschaften könnte Endothelin-1 (ET-1) an der Entstehung sekundärer Hypertonieformen, die mit erhöhtem Gefäßtonus einhergehen, beteiligt sein.[52] Bei *in vitro* Experimenten mit glatten Muskelzellen von Bluthochdruckpatienten konnten Rossi et al. erhöhte ET-1 mRNA und Proteinkonzentrationen detektieren.[53]

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) nimmt eine zentrale Stellung bei physiologischen und pathologischen Adaptionsmechanismen im kardiovaskulären und renalen System ein. Dabei hat Angiotensin II als potenter Vasokonstriktor oftmals eine Schlüsselrolle bei der Blutdruckregulation. Die blutdrucksteigernden Effekte von Angiotensin II werden über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT_1R) vermittelt. Deshalb wurden spezifische AT_1-Rezeptorblocker entwickelt, um die Wirkung von Angiotensin II zu hemmen. Einige Beispiele für spezifische Antagonisten ohne agonistische Aktivität am AT_1R sind Valsartan, Losartan oder auch Irbesartan.

Einen bedeutenden Einflussfaktor bei der Entstehung und dem Schweregrad auf pulmonale arterielle Hypertonie, eine Bluthochdruckform, hat Endothelin-1. In Patienten mit idopatischer pulmonaler arterieller Hypertonie (PAH) konnten erhöhte Plasma ET-1 Spiegel nachgewiesen werden.[54] PAH findet sich in Assoziation mit pulmonalem Gefäßumbau und Thrombosen mit konsekutiver Gefäßverengung und ist einer der wichtigsten Mortalitätsgründe in der systemischen Sklerose.[55] 10-12 % der SSc-Patienten entwickeln eine PAH, die im Verläuf einen unabhängigen Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität darstellt.[56] Pathogenetisch ist unter anderem eine verstärkte Aktivierung von ET_A-und ET_B-Rezeptoren bedeutend. Durch rezeptorvermittelte Wirkung von Endothelin-1 kommt es zu erhöhter Vasokonstriktion und gesteigerter Proliferation von Gefäßzellen.[57] Um diese Mechanismen zu unterdrücken, wurden pharmakologische Rezeptorblocker entwickelt. Das Vorläufermolekül eines selektiven ET_AR-Antagonisten wurde aus Streptomyces Misakiensis, einer Mikrobenart, gewonnen. Daraus abgeleitet ergab sich das cyclische Pentapeptid BQ123.[58] ET_BR-Blocker, wie BQ788 wurden erstmalig durch Ishikawa et al 1994 publiziert.[59] Ein Beispiel für einen unselektiven ET_A/ET_B-Rezeptorblocker stellt Bosentan dar. Bosentan ist einer von drei zugelassenen ET-Rezeptor-Antagonisten in der Behandlung von pulmonaler arterieller Hypertonie. Bei oraler Gabe von Bosentan wurde jedoch als pathogenetisch ungünstige Nebenwirkung eine Erhöhung der ET-1 Plasmaspiegel

beobachtet.[60] Besser ist hier der neue hochselektive ET_A-Rezeptor Antagonist Sitaxsentan, der den ET-1 Spiegel nicht beeinflusst.[61]

3.5.1 Autoimmune Pathomechanismen kardiovaskulärer Veränderungen

3.5.1.1 Immunglobuline (Ig)

Der Oberbegriff Immunglobuline (Ig) umfasst sämtliche Subklassen von Antikörpern (IgA, IgE, IgG, IgM). Die einzelnen Ig-Subklassen sind bei verschiedenen spezifischen humoralen und Effektormolekül-vermittelten Immunantworten teilweise gewebespezifisch beteiligt. Die Erkennung von Fremdantigenen durch Ig wird dabei über den Amino-terminalen Anteil (F_{AB}) vermittelt. Dabei erkennt und bindet beispielsweise ein Molekül IgG jeweils zwei identische Antigene über seinen F_{AB}-Teil. Über den carboxy-terminalen Teil (F_C) wird die Immunantwort des Organismus durch Interaktion mit weiteren Molekülen und Zellen des Immunsystems vermittelt.
Die Grundstruktur der IgG-Subklasse entspricht einem Tetramer aus je zwei identischen Paaren von schweren (H; heavy) und leichten (L; light) Polypeptidketten. Die einzelnen Ketten werden durch kovalente und nichtkovalente Bindungen (Disulfid-Brücken) zusammengehalten. Jede einzelne Kette besteht aus einem variablen (V) und einem konstanten (C)- bzw. einem polymorphen Abschnitt. Die beiden Amino-terminalen Enden, der vollständigen Immunglobuline werden von V-Regionen der L- und H-Ketten gemeinsam gebildet und erkennen identische Antigenstrukturen.
Durch Pepsin oder Papain (Enzyme) können Immunglobuline in die einzelnen Abschnitte gespalten werden. Dabei bildet der Amino-terminale Abschnitt das F_{ab}-Fragment (antigenbindenes Fragment). Der übrige Anteil des Immunglobulins, wird auf Grund seiner leichten Kristallisierbarkeit, als F_c-Fragment bezeichnet wird. (Abbildung 7)
Immunglobuline der Klasse G (IgG) entsprechen dem Hauptteil der zirkulierenden Immunglobuline (70-75 %). IgG's haben die Möglichkeit über ihren Fc-Teil an Rezeptoren auf verschiedenen Zellen (z.B. T-und B-Lymphozyten) zu binden. Durch diese Interaktion tragen sie zur Phagozytose und zur Antikörper-abhängigen, zellvermittelten Zytoxität (ADCC) bei.

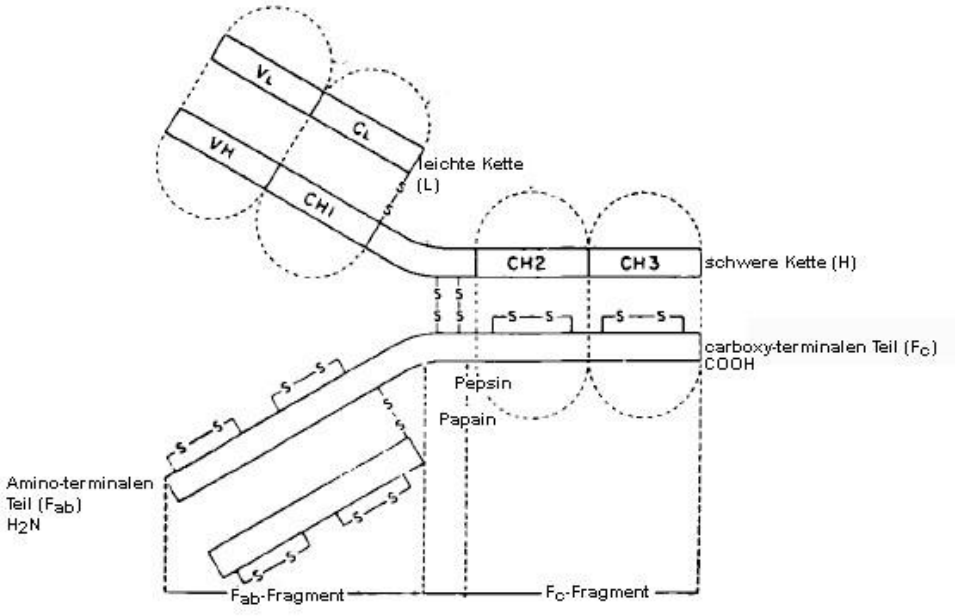


Abbildung 7: Strukur eines Immunglobulins Klasse G mit F_c = carboxyterminaler Teil, F_{ab} = aminoterminaler Teil, H = schwere Kette, L = leichte Kette, V = variable Region, C = konstante Region .[modifiziert nach [62]]

3.5.1.2 Bedeutung von Autoantikörpern bei Vaskulopathien

Autoimmune Aktivierungen innerhalb des Immunsystems werden über Bildung von Autoantikörpern vermittelt. Auch bei der Entstehung von Vaskulopathien können Autoantikörper involviert sein. Hierzu publizierten erstmalig Wallukat et al. 1999. In einem neonatalen Rattenkardiomyzyten-Modell konnten die Untersucher Angiotensin II Typ 1-Rezeptor Autoantikörper (AT_1RAA) über eine Steigerung der Kontraktionsfrequenz detektieren. Hierbei wurden die Kardiomyzyten mit isoliertem IgG aus dem Serum von präeklamptischen und gesunden Frauen stimuliert. Lediglich IgG aus dem Serum von Präeklampsie-Patientinnen führte zu einer Steigerung der Kontraktionsrate. Dieser Effekt konnte durch spezifische AT_1-Rezeptorblockage inhibiert werden.[63]

Die Präeklampsie ist eine spezielle Hypertonieform in der Schwangerschaft, die nach der 20.-sten Schwangerschaftswoche auftreten kann und neben einem erhöhten Blutdruck (>140/90 mmHg) mit Proteinurie und vaskulären Veränderungen in der Plazenta assoziiert ist.[64, 65]

Im Jahr 2000 berichteten Mellor et al. von immunologischen Parallelen zwischen dem Verlust von transplantatierten Organen und dem fetalen Überleben bei Schwangeren in Präeklampsie.[66]

Dragun et al. veröffentlichten im Jahr 2005 einen direkten Zusammenhang zwischen dem Auftreten von AT_1R-Autoantikörpern und dem Verlust von Nierentransplantaten durch eine akute, therapierefraktäre, vaskuläre Abstoßung. Für den Nachweis der Autoantikörper dienten auch hier neonatale Rattenkardiomyozyten, die den AT_1-Rezeptor expremieren. Durch Zugabe von IgG betroffener Patienten erhöhte sich die Kontraktionsrate der Kardiomyozyten, welche sich selektiv durch AT_1-Rezeptorblockade inhibieren ließ.[67]

Die Forschung nach Autoantikörpern, die an die Endothelin-Rezeptoren binden können, ist bis zum heutigen Zeitpunkt wenig fortgeschritten. Es wurden natürliche anti-Endothelzell-Antikörper (AECA) nachgewiesen, die auch basal bei gesunden Menschen exprimiert werden. In Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass bei Stimulation mit IgG-AECA Endothelin-1 freigesetzt wird. Dieser Effekt wurde auch im Zusammenhang mit renalen Begleiterkrankungen bei Präeklampsie gesehen.[68] Yoshio et al. konnten bei Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (SLE) in einer weiteren Studie zeigen, dass das Serum von SLE-Patienten im Vergleich zum Kontrollserum eine erhöhte Freisetzung von ET-1 aus humanen Nabelschnurendothelzellen bewirkt. Die ET-1 Freisetzung korreliert dabei mit dem TiterfürIgM-AECA.[69]

3.6 Fragestellung

Die klinischen Veränderungen der systemischen Sklerose sind gekennzeichnet von fortschreitender Haut- und Viszeralfibrose, welche den Krankheitsverlauf und die Mortalität entscheidend bestimmen. Pathogenetisch lassen sich diese Veränderungen in erster Linie auf obliterative Gefäßveränderungen zurückführen gefolgt von endothelialer Dysfunktion und progredienter Organfibrose. Im Erkrankungsverlauf wurden Ungleichgewichte im Verhältnis zwischen Vasokonstriktion und Dilatation, vermittelt durch physiologische und pathophysiologische Effekte von Angiotensin II und Endothelin-1, beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass eine endotheliale Dysfunktion zu einer Aktivierung des RAS-Systems verbunden mit erhöhten Angiotensin II Plasmaspiegeln führt. Parallel wurden außerdem steigende Plasmaspiegel des vasokonstriktorischen Peptids Endothelin-1 mit Zunahme der endothelialen Dysfunktion gemessen. Beschrieben wurden zudem auch humorale und zelluläre immunologische Veränderungen in Zusammenhang mit der systemischen Sklerose, deren pathogenetische Relevanz bisher jedoch nicht eindeutig geklärt ist. So konnten Autoantikörper gegen verschiedene Zielepitope im Serum erkrankter Patienten festgestellt werden. Unter anderem fanden sich in Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Patientenkohorten mit systemischer Sklerose Autoantikörper gegen den Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT_1R-AA) und gegen den Endothelin-1 Typ A Rezeptor (ET_AR-AA).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen autoimmun-vermittelte Effekte auf Änderungen in der Signaltransduktion an einer humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie der Haut (HMEC-1) untersucht werden. Verglichen werden Auswirkungen der natürlichen Liganden Endothelin-1 und Angiotensin II mit isoliertem IgG von Patienten mit systemischer Sklerose und Kontroll-IgG von Gesunden. Es soll getestet werden, welche Änderungen im ERK1/2/Ets-1-Signaltransduktionsweg auftreten. Als direkte funktionelle Folge der alterierten Signaltransduktion wird die Endothelzellproliferation bestimmt. Durch spezifische pharmakologische Rezeptorblockade soll überprüft werden, welcher Anteil der beobachteten Effekte über Angiotensin II- und Endothelin-1-Rezeptoren vermittelt wird. Im nächsten Schritt sollen die Kinasen Raf-1 und MEK1/2 oberhalb von ERK1/2 spezifisch blockiert werden.

Ein zusätzliches zentrales Problem der systemischen Sklerose stellen mikrothrombotische Gefäßverschlüsse dar. Da für Tissue Factor (TF) sowohl prothrombotische als auch proinflammatorische Effekte beschrieben wurden, soll in weiteren Experimenten die Expression und Regulation von diesem Faktor untersucht werden.

4 Material

4.1 Zelllinie

Alle Experimente erfolgten mit einer immortalisierten humanen Endothelzelllinie (HMEC-1).[70]

4.2 Material

Material	Bezugsquelle
Neubauer-Zählkammer	Optik Labor
Zellkulturschalen (100x20 mm; 60x15 mm)	TPP/BD Falcon
Zellkulturflaschen	BD Falcon
Falcons (50 ml, 15 ml)	BD Falcon
Pipetten, steril (25 ml; 10 ml; 5 ml)	BD Falcon
Mikropipetten-Tips (2 – 200 µl; 0.5 – 20 µl; 100 – 5000 µl)	Eppendorf
Tips (100–1000 µL)	Sarstedt
Safe Lock Tubes (2 ml; 1.5 ml; 0.5 ml)	Eppendorf
96-Well-Platten	BD Falcon
Zellschaber	Corning Incorporated
Insulinspritze	Becton Dickinson S.A.
Clear Blue X-Ray Film	Kodak
Protein G Sepharose 4 fast flow Säule	GE Healthcare
Filterflasche Nalgene	Nunc
Dialyseschläuche	Roth
Chamber Slides	Nunc
Microtitereinsätze	Nunc
Biodyne®Precut Nylon Membranes	Pierce

4.3 Stimulanzien (Agonisten/Antagonisten/Inhibitoren)

1. Agonisten

Material	Bezugsquelle
humanes Angiotensin II	Sigma-Aldrich
humanes Endothelin-1	Sigma-Aldrich
humanes IgG	Sigma-Aldrich

2. Antagonisten

Material	Bezugsquelle
Valsartan	Novartis
PD 123,319	Sigma-Aldrich
Sitaxsentan	Encysive Pharma. Inc.
BQ788	Alexis Biochemicals
Bosentan	Actelion

3. Inhibitoren

Material	Bezugsquelle
GW5074	Sigma-Aldrich
PD98059	Sigma-Aldrich
PD 184,352	axon MEDCHEM

3.4 Kommerzielle Kits

Material	Bezugsquelle
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche
D_C-Protein-Assay	Bio-Rad
RNA PCR Core Kit	Roche
In situ Cell Death Detection Kit, TMR red	Roche
Biotin 3´End DNA Labeling Kit	Thermo Scientific
Light Shift™ EMSA Optimization Kit	Thermo Scientific
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Pierce
GeneAmp RNA PCR Core Kit	Applied Biosystem
Pow Sybr® Green PCR Master Mix	Applied Biosystem

4.5 Chemikalien

Material	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid	Appli Chem
Endothelial Basal Medium	PAA
Fetales Kälberserum	PAA
L-Glutamin	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG
Hydrocortison	Sigma-Aldrich
EGF	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA	Biochrom AG
PBS, steril (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+})	PAA
Trypanblau	Sigma-Aldrich
3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich
Gel Blotting Papier	Schleicher&Schell

Blotmembran	PeqLab
Methanol	Merck
Detektionslösung 1+2	Thermo Science
Entwicklerlösung	Kodak
Fixierer	Kodak
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Agarose	Serva
Ethidiumbromid	Roth
Trizol	Invitrogen
Chloroform	Merck
Ethanol	J.T. Baker
Na_2HPO_4	Roth
Glycin-HCl	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
NaH_2PO_4	Roth
NaCl	Merck
EDTA	Roth
Propidiumiodid	Fluka
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Roth
DAPI	Roche
Aqua Poly Mount	Polyscience
DNase I	Stratagene
Protease Inhibitoren Complets	Roche
BSA	Serva
Acrylamid	Bio RAD Laboratories AG
TEMED	Sigma-Aldrich
APS	Roth
DTT	Roth
Magermilchpulver	AppliChem
Ponceau S	Sigma-Aldrich
Gelatine	AppliChem

4.6 Lösungen und Puffer

Couting-Lösung
- 2 % Gelatine in dd H_2O lösen
- autoklavieren
- 1:10 mit PBS vor Verwendung verdünnen

Endothel Basal 5% FCS-Kulturmedium:
- 500 ml Endothel Basal Medium
- 5% FCS
- 10 mmol/l L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin
- 100 µl Hydrocortison (50 µmol/l)
- 50 µl EGF (100 µg/ml)

Endothel Basal 1% FCS-Kulturmedium:
- 500 ml Endothel Basal Medium
- 1% FCS
- 10 mmol/l L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

Endothel Basal 0% FCS-Kulturmedium:
- 500 ml Endothel Basal Medium
- 10 mmol/l L-Glutamin
- 1% Penicillin/Streptomycin

Bindungspuffer (pH 7.0)
- 0.02 mol/l Na_2HPO_4

Elutionspuffer (pH 2.7)
- 0.1 mol/l Glycin-HCl

Neutralisationspuffer (pH 9.0)
- 1 mol/l Tris-HCl

Dialysepuffer (10fach)
- Lösung1: 8.9 g $Na_2HPO_4x2H_2O$ in 500 ml H_2O lösen
- Lösung2: 3.45 g $NaH_2PO_4x2H_2O$ in 250 ml H_2O lösen
- Lösung3: Lösung2 zu Lösung1 geben, bis pH 7.2 erreicht ist
- Lösung4: 45.0 g NaCl in 500 ml Lösung3 lösen

FACS-Puffer
- 5 mmol/l EDTA in PBS
- 5 % FCS

MTT-Lösung
- 5 mg/ml MTT in PBS

Fixierlösung
- 4 % PFA in PBS

Blocklösung
- 1xTBS
- 0.2 % Triton X-100
- 5 % BSA

Permeabilitätslösung
- 0.1 % Natrium-Citrat
- 0.1 % Triton X-100

Lysis-Puffer (pH 7.4)
- 50 mmol/l Tris-HCl
- 0.1 % SDS
- 0.5 % Triton X-100

auf 100 ml mit dd. H_2O auffüllen

50/O/5/2-Puffer (pH 7.4)

- 1 mol/l Tris (100 ml)
- 200 mmol/l EDTA (50 ml)
- 200 mmol/l EGTA (20 ml)

4.7 Geräte

Material	Bezugsquelle
Sterilbank	Thermo Scientific
Inkubator	Thermo Scientific
Mikroskop	Carl Zeiss AG
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG
Waage (5 g-6100 g; 10 mg-220 g)	Sartorius AG
Zentrifuge	Eppendorf
Megafuge	Thermo Scientific
Vortexer	VWR International
Heizblock	VWR International
Elektrophorese Mini Proten Tetra Cell	Bio RAD Laboratories AG
Western Blot Modul	Invitrogen
Rolltisch	Marienfeld
Schütteltisch	Heidolph
Peltier Thermal Cycler	Biozyme
Thermalcycler Px2	Thermo Scientific
Elisa-Reader	Thermo Scientific
Nano Drop	PeqLab
Konfokales Mikroskop	Biorad/Nikon
7500 Fast Real-Time PCR	Applied Biosystem

5 Methoden

5.1 Zellkultur

5.1.1 Kultivierung

Die Kultivierung erfolgte auf adhäsiven, zuvor mit 0.5 % Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen, -platten, bzw. -schalen bei CO_2 Begasung (5 %) und 100 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C im Wasserbad temperiert.
Zum Passagieren der Zellen wurde nach Mediumabnahme und einmaligem Waschen mit PBS eine Ablösung der Zellen durch Trypsinierung (5 ml Trypsin für 4 min bei 37 °C) durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen, für 3 min bei 1200 min^{-1} zentrifugiert und in 10 ml neuem Medium resuspendiert. Für die Weiterkultivierung wurden x Zellen/ cm^2 ausgesät.

5.1.2 Lagerung der Zellen

Zum Einfrieren kultivierter Zellen wurde zunächst, wie bei der Passagierung, nach Abnahme von Medium einmal mit PBS gewaschen, trypsiniert, in 5 ml Medium aufgenommen und pellettiert. Nach Resuspendierung in Vollmedium, wurden die Zellen gezählt und mit 10 % DMSO in einem 1 ml Schraubdeckelröhrchen versetzt, schrittweise um 10 °C auf -80 °C abgekühlt und in flüssigen Stickstoff überführt.

5.2 IgG-Isolation

Immunglobuline wurden mittels Affinitätschromatographie über Protein G HiTrap Säulen gewonnen. Die Säulen sind gepackt mit 5 ml Sepharose gekoppelt mit einem rekombinant hergestelltem Protein G., welches in *E. coli* gezüchtet wurde. Dieses ist ein bakterielles Protein mit hoher Affinität zum F_c-Teil der IgG-Isotypen ($IgG_{1, 2, 3, 4}$). Die Bindungsaffinität des

F_c-Teils zu Protein G nimmt mit sinkendem pH ab, d.h. gebundene Antikörper werden bei geringem pH eluiert.

5.2.1 Patientenmaterial

Die Isolation der Immunglobuline Klasse G erfolgte aus Serum oder Plasma von Patienten mit systemischer Sklerose. Die Patienten hatten verschiedene Organbeteiligungen, wobei hauptsächlich die Lunge in Form einer pulmonal arteriellen Hypertonie, betroffen war. Es wurden keine Einschränkungen aufgrund des Alters oder des Geschlechts gemacht.

5.2.2 Probenvorbereitung

Die Proben müssen sauber und frei von Rückständen sein, d.h. Serum und /oder Plasma wurden für 20 min bei 3000 min^{-1} zentrifugiert und danach filtriert mit einer Filtereinheit von 0.45 µm. Um Überladungen der Säulen zu vermeiden, wurden 20 ml Serum und/oder Plasma mit 20 ml Bindungspuffer verdünnt, denn die Bindungskapazität liegt bei 25 mg human IgG/ml.

5.2.3 Säulenvorbereitung und IgG-Isolation

Die 5 ml-Säule wurde mit 25 ml Bindungspuffer und einer Flußrate von 20 ml/min äquilibriert. Dann wurden 20 ml verdünntes Serum und/oder Plasma auf die Säule gegeben. Dieser Schritt wurde zwei-bis dreimal wiederholt, damit sich die Ausbeute an IgG vergrößert. Die ungebundenen Bestandteile wurden dann mit 25 ml Bindungspuffer von der Säule gewaschen. Eluiert wurde bei pH = 2.7 mit 20 ml Elutionspuffer, wobei in vier Fraktionen a' 5 ml unterteilt wurde und Fraktion 1 und 4 auf Grund der geringen IgG-Konzentration verworfen wurde. Die Fraktionen zwei und drei wurden nach jedem Schritt gepoolt und anschließend über 24-48 h dialysiert.
Nach Dialyse erfolgte die Konzentrationsbestimmung mittels Immunturbidimetrie im Zentrallabor der Charite Berlin (CVK) und die Bestimmung der Titer der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor Autoantikörper und der Endothelin-1 Typ A Rezeptor Autoantikörper (AT_1RAA, ET_ARAA) von der Firma Celltrend in Luckenwalde.

5.2.4 Lagerung und Reinigung der Säulen

Nach dem Elutionsschritt wurde mit 25 ml Bindungspuffer erneut äquilibriert. Die Säulen wurden bei +4 °C in 20 % Ethanol gelagert. Nach drei bis viermaliger Anwendung wurden die Säulen mit 5 mol/l Guanidin-Hydrochlorid gereinigt werden, um letzte Spuren von nicht eluierten Partikeln zu entfernen.

5.3 Genexpressionsanalyse

5.3.1 RNA-Isolation

In 60 mm Petrischalen wurden 250.000 Zellen gegeben und bis zum Erreichen der Konfluenz in 5 % FCS-haltigem Medium kultiviert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h der Zellen mit 1 % FCS-haltigem Medium erfolgte die Inkubation mit unterschiedlichen Stimulanzien für verschiedene Zeitpunkte.
Am Ende der Stimulationen wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen, in 1 ml Trizol lysiert, von der Platte gekratzt und das Lysat in Eppendorftubes überführt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden 200 µl Chloroform zugegen, 30 s kräftig am Vortexer geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 11200 min^{-1} für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Die wässrige Phase (ca. 400 µl) wurde in ein neues Eppendorftube überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt, ca. 10 s vorgetext, 10 min bei RT inkubieren lassen und bei 11200 min^{-1} bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das entstandene Pelltet in 1 ml Ethanol geschwenkt, 5 min bei 8900 min^{-1} zentrifugiert, der Überstand wieder abgenommen, nochmals in 1 ml Ethanol geschwenkt und wieder bei 8900 min^{-1} zentrifugiert.
Das gereinigte Pellet wurde dann bei 60 °C im Heizblock getrocknet und in 10-20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und bei -80 °C weggefroren.

5.3.2 Messung der Extinktion der RNA

Die Bestimmung der RNA erfolgte mittels photometrischer Messung am NanoDrop™. Die Reinheit der RNA wurde durch das Verhältnis von OD260/OD280 ermittelt. Reine DNA sollte ein Extinktionsverhältnis von r = 1.5-2.0 aufweisen.
Anschließend wurde die Konzentration der RNA rechnerisch auf 100 ng/µl eingestellt.

5.3.3 Qualitätsprüfung der RNA durch Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der Qualität der RNA wurden 500 ng gesamt RNA [RNA-Gel: 14 µl = 500 ng, $V_{(RNA)}$ = 4.5 µl, $V_{(DEPC)}$ = 7.2 µl, $V_{(Ladepuffer)}$ = 2.3 µl] in einem 1 %-igen Agarose-Gel mit Ethidiumbromid (50 ng/ml) in 1 x TBE-Puffer für 55 min bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

5.3.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT), d.h. das Umschreiben von RNA in cDNA mittels reverser Transkriptase wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

RT-Ansatz:

25 mM $MgCL_2$ (25 mmol/l)	4 µl
10x PCR Buffer II	2.5 µl
dGTP (100 mmol/l)	2 µl
dATP (100 mmol/l)	2 µl
dTTP (100 mmol/l)	2 µl
dCTP (100 mmol/l)	2 µl
RNase OUT™ Inhibitor (40U/µl)	1 µl
MuLV Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1 µl
Random Hexamers/Oligo $d(T)_{16}$ (50 µmol/l)	1 µl
500 ng RNA	7.5 µl
V (Gesamt):	**25 µl**

Die RT wurde wie folgt durchgeführt:

25 °C	10 min
42 °C	45 min
95 °C	5 min

Die auf 10 ng/µl verdünnte cDNA wurde für die anschließende PCR eingesetzt.

5.3.5 Konventionelle PCR

Die Amplifikation der cDNA erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Der PCR-Prozess besteht aus einer bestimmten Anzahl von Zyklen die in einem sogenannten Thermocycler durchgeführt werden. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten, wobei im ersten Schritt, der Denaturierung, die DNA-Doppelstränge des Templats erhitzt werden, um sie zu trennen. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung der sogenannten Primer an das Templat, das die Zielsequenz enthält. Länge und Sequenz der Primer bestimmen die genaue Temperatur, die im Thermocycler vorherrschen muss, damit sich die Primer an die komplementären DNA-Abschnitte des Templats anlagern können. Im dritten Schritt findet die Elongation statt, d.h. die DNA-Polymerase verlängert am angelagerten Primer den Einzelstrang und führt somit zur Bildung eines komplementären DNA-Stranges. Dieser Vorgang wird in Zyklen wiederholt, was zur Amplifikation der Einzelstränge führt. Die elektrophoretische Auftrennung der amplifizierten DNA erfolgte in einem 1 %-igen Agarosegel mit Ethidiumbromid (50 ng/ml) in 1xTBE-Puffer. Anhand parallel aufgetrennter DNA-Längenstandards, wurde die DNA-Fragmentgröße ermittelt. Es wurde abhängig von der Gelgröße, 90 V bis 130 V Spannung angelegt.

PCR-Ansatz:

10xPCR-Puffer II	2.5 µl
dNTP (100 µmol/l)	5 µl
vorwärts-Primer(10 pmol/l)	0.5 µl
rückwärts-Primer (10 pmol/l)	0.5 µl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0.3 µl
cDNA (10 ng/µl)	2 µl
ad 25 µl H_2O	

PCR-Protokoll:

Denaturierung	95 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	30 s
Annealing (Primerspez.)	T	30 s /xZyklen
Elongation	72 °C	30 s
Finale Elongation	72 °C	3 min
Pause	4 °C	

5.3.6 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die Echtzeit quantitative-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren die auf dem Prinzip der PCR beruht. Sie gestattet mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen die Quantifizierung der gewonnen DNA während der PCR-Zyklen. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die Quantifizierung wird in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen, da hier die optimalen Reaktionsbedingungen

vorliegen. Die real-time PCR wurde mit dem Power SYBR® Green PCR Master Mix von Applied Biosystems durchgeführt. Die qRT-PCR erfolgte mit Reaktionsvolumen von 20 µl, das je 2 µl cDNA und 0,5 µmol/l vorwärts und rückwärts primer und 10 µl des Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) enthielt.

qRT-PCR-Protokoll:

Initalisierungsschritt	50 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	10 min	
Annealing (Primerspez.)	T	15 s	/xZyklen
Elongation	60 °C	1 min	

Denaturierungskurven wurde nach jeder Serie von Proben angelegt, um die Spezifität der Reaktion nachzuprüfen. Die relative Menge Kopien wurde nach der *cycle threshold method*e (Applied Biosystems) mit der 7500 System Software (Version 1.2.3; Applied Biosystems) beschrieben, normalisiert und zur endogenen Referenz (GAPDH) berechnet.

Tabelle 1: Genspezifische Primersequenzen mit fw = forward (vorwärts) und rv = reverse (rückwärts)

Gen	Primer	5'-3'-Primersequenzen	Annealing-T in °C	Zyklen	Fragment (Basenpaare)
	fw	AGTCGGCACCAGGTGTATTT	36	59	211
AT_1R	rv	ATCACCACCAAGCTGTTTCC			
	fw	TTCCCTTCCATGTTCTGACC	38	64	191
AT_2R	rv	AAACACACTGCGGAGCTTCT			
	fw	GATAGCCAGTCTTGCCCTTG	34	64	177
ET_AR	rv	CAGAGGTTGAGGACGGTGAT			
	fw	GCGAAACGGTCCCAATATC	38	64	161
ET_BR	rv	CCACGGAGGCTTTCTGTATG			
	fw	ACCCAGCCTATCCAGAATCC	34	64	106
Ets-1	rv	ATGAAGCTGGGCTCTGAGAA			
	fw	TGAAGGATGTGAAGCAGACG	34	64	451
TF	rv	TTCTCCTGGCCCATACACTC			
	fw	CATCACCATCTTCCAGGAGCG	65	22	443
GAPDH	rv	TGACCTTGCCCACAGCCTTG			

5.4 Zytotoxizitätstest

5.4.1 MTT-Test

In einer 96-Well-Platte wurden 7000 Zellen/well bis zur Konfluenz zunächst in 5 %-FCS-Medium und danach für 24 h in 0 % oder 1 %-FCS Medium wachsen gelassen. Nach der Inkubation mit dem Stimulans wurden 10 µl der gelben Tetrazoliumsalz-Lösung (MTT) in jedes Well gegeben und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Stoffwechselaktive Zellen

reduzieren mit ihrer NADH-abhängigen Succinatdehydrogenase der Mitrochondrien den MTT-Farbstoff zu Formazon. Die violetten Formazonkristalle wurden in 100 µl 2-Propanol/0.04 N HCl gelöst. Die Quantifizierung erfolgte im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von λ = 570 nm.

5.5 Proteinanalysen

5.5.1 Proteinextraktionen

5.5.1.1 Gesamtprotein

In 60 mm Petrischalen oder 6-Loch-Platten wurden 250000 bzw. 200000 Zellen in 5 % FCS-Medium bis zur Konfluenz kultiviert, 24 h auf 1 % FCS gesetzt und teilweise mit Antagonisten, Blockern und Agonisten stimuliert. Am Ende wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Lysispuffer (mit Protease-und Phosphataseinhibitoren) lysiert, mittels eines Zellschabers abgeschabt, in ein Eppendorftube überführt und für 10 min bei 14000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand (Gesamtprotein) wurde in neues Eppendorftube überführt.

5.5.1.2 Kernprotein

In 100 mm Petrischalen wurden 1 Mio. Zellen in 5 % FCS-Medium bis zur Konfluenz kultiviert, dann für 24 h auf 1 % FCS-Medium gesetzt und mit unterschiedlichen Agonisten für 24 h stimuliert. Danach wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen, die Zellen mittels eines Zellschabers abgekratzt, in ein 1.5 ml Eppendorftube überführt und 3 min bei 800 min^{-1} zentrifugiert. Die Isolation der Kernproteine erfolgte mit dem NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit von Pierce. Für die verschiedenen Reagenzien im Kit wurde nach folgendem Schema gearbeitet:

Tabelle 2: Pipettierschema für Kernproteinisolation

Zellen	CER I [µl]	CER II [µl]	NER [µl]
10 µL (20 mg)	100	5.5	50
20 µL (40 mg)	200	11	100
50 µL (100 mg)	500	27.5	250
100 µL (200 mg)	1000	55	500

Der Überstand wurde vorsichtig aus dem Eppendorftube entfernt und das Zellpellet in 200 µl CER I Lösung, mit Protease Inhibitor Cocktail (25xcomplets) resuspendiert, 15 s am Vortexer geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 11 µl CERII Lösung zugegeben, die Lösung für 5 s kräftig vorgetext, für 1 min auf Eis inkubiert, wieder für 5 s am Vortexer geschüttelt und 5 min bei 14000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand (zytoplasmatische Fraktion) wurde in vorgekühlte Eppendorftubes überführt und bei -80 °C gelagert. Das verbleibende Zellpellet wurde in 50 µl NER-Lösung resuspendiert, für 15 s kräftig am Vortexer geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt und dann bei 14000 min^{-1} für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Kernproteine) wurde in vorgekühlte Eppendorftubes überführt und bei -80 °C gelagert.

5.5.1.3 Membranproteine

In 100 mm Petrischalen wurden 1 Mio. Zellen in 5 % FCS-Medium bis zur Konfluenz kultiviert, für 24 h unter Serumarrest in 1 %-FCS-Medium kultiviert und dann stimuliert. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, 150 µl 5/O2-Puffer auf die Platten gegeben, mittels einem Zellschaber abgeschabt und in ein 1 ml Eppendorftube überführt. Die Tubes wurden dann zum Zellaufschluss abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C im Heizblock aufgetaut. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, dann 5 min bei 14000 min^{-1} zentrifugiert, der Überstand (zytosolische Fraktion) abgenommen und/oder verworfen und das Pellet in ca. 100 µl 5/O2-Puffer mit (1 % SDS, Protese-und Phosphatase-Inhibitoren) resuspendiert, bei 14000 min^{-1} für 5 min zentrifugiert und der Überstand (Membranproteine) in ein neues Eppendorftube überführt.

5.5.2 Proteinbestimmung

Zur Ermittlung der Proteinkonzentration für die nachfolgende Gelelektrophorese wurde eine Proteinbestimmung nach Lowry mit dem D_C *Protein Assay* Kit durchgeführt. Die

entstehenden Farbtöne sowie die Farbintensität sind von der Proteinkonzentration abhängig und lassen sich photometrisch bestimmen.
Der Test wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Hierzu wurden als Hintergrundkontrolle 5 µl Lysispuffer, sowie jeweils 5 µl einer Standardreihe aus BSA-Lösung in den Konzentrationen 0.25; 0.5; 1.0; 1.5; 2.0 µg/ml und 5 µl Probe vorgelegt. In jedes Well wurden 25 µl Reagenz A', bestehend aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S, sowie 200 µl Reagenz B zugegeben. Nach ca. 15 min Schütteln erfolgte die Auswertung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von λ = 690 nm.

5.5.3 Western Blot Analyse

Die Proteine wurden mit 1x Lämmli-Puffer und 20 mmol/l DTT versetzt und für 5 min bei 95°C gekocht. Der Größenmarker Prestained Protein Marker wurde mitgekocht. Pro Gel wurden 5 µl Marker eingesetzt.
Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 10 %-igen und 1.5 mm breiten SDS-PAGE Gelen. Die Geltaschen wurden mit einer Proteinmenge von 20-30 µg beladen. Die Proteine liefen mit 90 V in das 5%-ige Sammelgel, während die Auftrennung der Proteine im 10%-igem Trenngel bei 150 V erfolgte. Im nächsten Schritt erfolgte der Transfer bei einer Spannung von 30 V innerhalb von 2 h auf eine Nitrozellulose-Membran. Nach dem Transfer wurden die Membranen für 1 h in 5 % Milchpulverlösung geblockt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Im Anschluss wurde über Nacht bei 4 °C mit den Primärantikörpern inkubiert, dann die Membran mit TBST drei Mal 5 min gewaschen und mit dem Sekundärantikörper in TBST 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend erneut drei Mal mit TBST 10 min gewaschen. Die Entwicklung des Western-Blots erfolgte auf Röntgenfilmen per Chemilumineszensverfahren (ECL-System).

Tabelle 3: Verwendete Antikörper im Western Blot

Antikörper	Spezies	Firma
phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Rabbit mAb	Cell Signaling
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Rabbit mAb	Cell Signaling
α-Tubulin		Sigma-Aldrich
Ets-1 [pT38]	Rabbit pAb	Invitrogen
Ets-1	Rabbit pAb	Santa Cruz
Ets-1 antibody	Rabbit pAb	Abcam
Tissue Factor	Mouse	American Diagnostica
donkey-anti rabbit Sekundärantikörper		Dianowa

5.5.4 Gelretardationsexperiment (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA)

Durch die EMSA-Methode können Protein-DNA Interaktionen nachgewiesen werden. Hierzu wird eine biotynilierte Promotersequenz, die ein spezifisches Kernmotiv für einen Transkriptionsfaktor aufweist, mit einem Kernproteinextrakt, welches den Transkriptionsfaktor exprimiert, inkubiert. Die gebildeten Protein-DNA Komplexe werden anschließend in einem nativen Polyacrylamidgel auf Grund ihrer verminderten Mobilität von ungebundener DNA abgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

5.5.4.1 *In silico* Analyse der DNA-Bindesequenz von Ets-1

Die Analyse erfolgte mit dem Softwareprogramm TESS. Im ersten Schritt wurde die gesamte Promotor-Sequenz in das Programm eingespeist, aus dem dann alle DNA-Nukleotidsequenzen (Kernmotiv) für Transkriptionsfaktoren angezeigt wurden. Anschließend wurde die DNA-Nukleotidsequenzen des entsprechenden Transkriptionsfaktors bestimmt. Diese besteht immer aus vier Nukleotiden. Für die Bindung zwischen Transkriptionsfaktor und Promotor sind auch die Nachbarsequenzen des Kernmotivs sehr wichtig. Wieviele Nukleotide dafür gewählt werden, ist subjektiv. Hinweise dafür sind aber in der Literatur gegeben. In dieser Arbeit wurde eine Sequenz von 24 Nukleotiden gewählt, d.h. die DNA-Bindesequenz in dieser Arbeit setzt sich zusammen aus: 10 Nukleotide-Kernmotiv-10 Nukleotide.

5.5.4.2 Biotin-Markierung von DNA

Für die Biotynilierung wurde das *Biotin 3´End Labeling Kit* von Pierce verwendet. Im ersten Schritt wurden die DNA der verwendeten Sequenzen auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt und dann 1:100 auf 1 pmol/µl verdünnt. Für die Reaktion wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 4: Pipettierschema für Biotynilierung

Komponente	**Forward [µl]**	**Reverse [µl]**
dd H_2O	25	25
5xTdT reaction buffer	10	10
Oligo [1 µmol/l]	5	5
Biotin-11-dUTP [5 µmol/l]	5	5
diluted TdT [2 U/µl]	5	5
gesamtes Volumen	**50**	**50**

Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert und nach 30 min mit 2.5 µl EDTA abgestoppt. In einem nächsten Schritt wurden 50 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben, kurz im Vortexer geschüttelt, 2 min bei 14000 min^{-1} zentrifugiert und der Überstand (wässrige Phase) in ein neues Eppendorftube überführt. Dann fand das „Oligoannealing“ statt. Hierfür wurde folgendes Pipettierschema verwendet:

Tabelle 5: Pipettierschema für „Oligoannealing“

Komponente	
Forward Primer	22.5 µl
Reverse Primer	22.5 µl
dd H_2O	2.5 µl
20xSSC	2.5 µl

Nach dem Zusammenpipettieren wurden die Eppendorftubes in den Thermocycler gestellt und unter folgendem Programm „**oligoannealiert“**:

90 °C Pause
90 °C 5 min
80 °C 1 min zu Schritt 3 bis 55 °C um jeweils 1 °C abkühlen
25 °C 1 h
4 °C Pause

Tabelle 6: Oligonukleotide für EMSA-Experimente mit fw = forward und rv = reverse

Oligonukleotid	**Primer**	**5’-3’-Primersequenzen**
Mutiertes Bindemotiv TF-Promotor	fw rv	TGGGCAAAGCATCCGGGAAATGCC GGCATTTCCCGGATGCTTTGCCCA
Bindemotiv TF-Promotor	fw rv	TGGGCAAAATGGAATTGAAATGCC GGCATTTCAATTCCATTTTGCCCA

5.5.4.2 LightShift™ Chemiluminescent EMSA Kit (Pierce)

Für die Auftrennung des Protein-DNA Komplexes wurde ein 5 % Polyacrylamidgel (0.75 mm) nach folgendem Schema gegossen:

5xTBE-Puffer	1.2 ml
Polyacrylamid	2 ml
dest. H_2O	8.8 ml
APS (10 %)	60 µl
TEMED	10 µl

Proben und Biotin-markierte DNA wurden in einem gepufferten Reaktionsansatz (100 mmol/l Tris, 500 mmol/l KCl, 10 mmol/l DTT) mit 1 µg/µl Poly (dI:dC) und dd. H_2O, von 20 µl für 20 min bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben auf das 5 % Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 100 V in 0.5xTBE-Puffer aufgetrennt. Währenddessen wurde die Nylonmembran in 0.5xTBE-Puffer inkubiert, worauf im nächsten Schritt die Proteine bei 380 mA für 1 h transferiert wurden. Dem Transfer folgte ein UV-Crosslink, um die DNA auf der Membran zu fixieren. Danach wurde die Membran für 20 min in Blocking Puffer inkubiert und dann nochmal 15 min mit Streptavidin-Horseradish-Peroxidase in 20 ml neuem Blocking Puffer. Nach verschiedenen Wasch- und Äquilibrierungsschritten wurden die DNA/bzw. DNA-Protein-Komplexe durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilmes sichtbar gemacht.

5.6 Funktionelle Tests

5.6.1 BrdU-ELISA

In eine 96-Well-Platte wurden 7000 Zellen pro Well gegeben und bis zur Konfluenz bei 37 °C und 5 % CO_2 mit 5 % FCS Medium zum Adhärieren kultiviert. Danach wurden die Zellen für 24 h in 1 % FCS-Medium unter gleichen Bedingungen kultiviert. Darauf erfolgte die Zugabe der Antagonisten bzw. der Stimulantien in verschiedenen Konzentrationen und Zeiten. Nach der jeweiligen Zeit wurde BrdU (5-Brom-2`-desoxy-uridin) in einer 1:100 Verdünnung/100 µl in 1 % FCS-Medium auf die Zellen gegeben und 2 h inkubiert. BrdU wird an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaut, und kann mit einem Peroxidase-gekoppelten Antikörper detektiert werden. Anti-BrdU wird ebenfalls in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Quantifizierung von eingebautem BrdU erfolgte durch eine nachgeschaltete Peroxidase-Farbreaktion im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von λ = 450 nm und einer Referenzwellenlänge von λ_{Ref} = 690 nm.

5.6.2 Konfokale Mikroskopie/Fluoreszensmikroskopie

In einem 8-Well Chamber Slide wurden 8000 Zellen/Well bis zur Konfluenz in 5 % FCS-Medium wachsen gelassen, 24 h in 1 % FCS-Medium kultiviert und für 24 h mit verschiedenen Agonisten stimuliert. Im nächsten Schritt wurde das Medium abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und mit eiskaltem Methanol für mindestens 24 h fixiert. Danach wurde in 5 % BSA für 30 min geblockt und der erste Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 1xTBS/5 % BSA für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1xTBS wurde der Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 1xTBS/5 % BSA für 45 min inkubiert, wieder dreimal mit 1xTBS gewaschen und mit Aqua-Poly/Mount eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C im Dunkeln. Die nachfolgende konfokale Mikroskopie erfolgte an einem Biorad MRC 1024 /Nikon DIAPHOT 300 Mikroskop, welches mit einem Argon/Krypton Laser versehen war.

5.7 Statistik

Die Ergebnisse der Experimente sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Mann-Whitney- Test. Ab einem Wert von $p<0,05$ wurden die zu vergleichenden Werte als statistisch signifikant angesehen.

6 Ergebnisse

6.1 Versuchsübersicht

In Abbildung 7 sind die durchgeführten Experimente in einer Übersicht zusammengefasst.

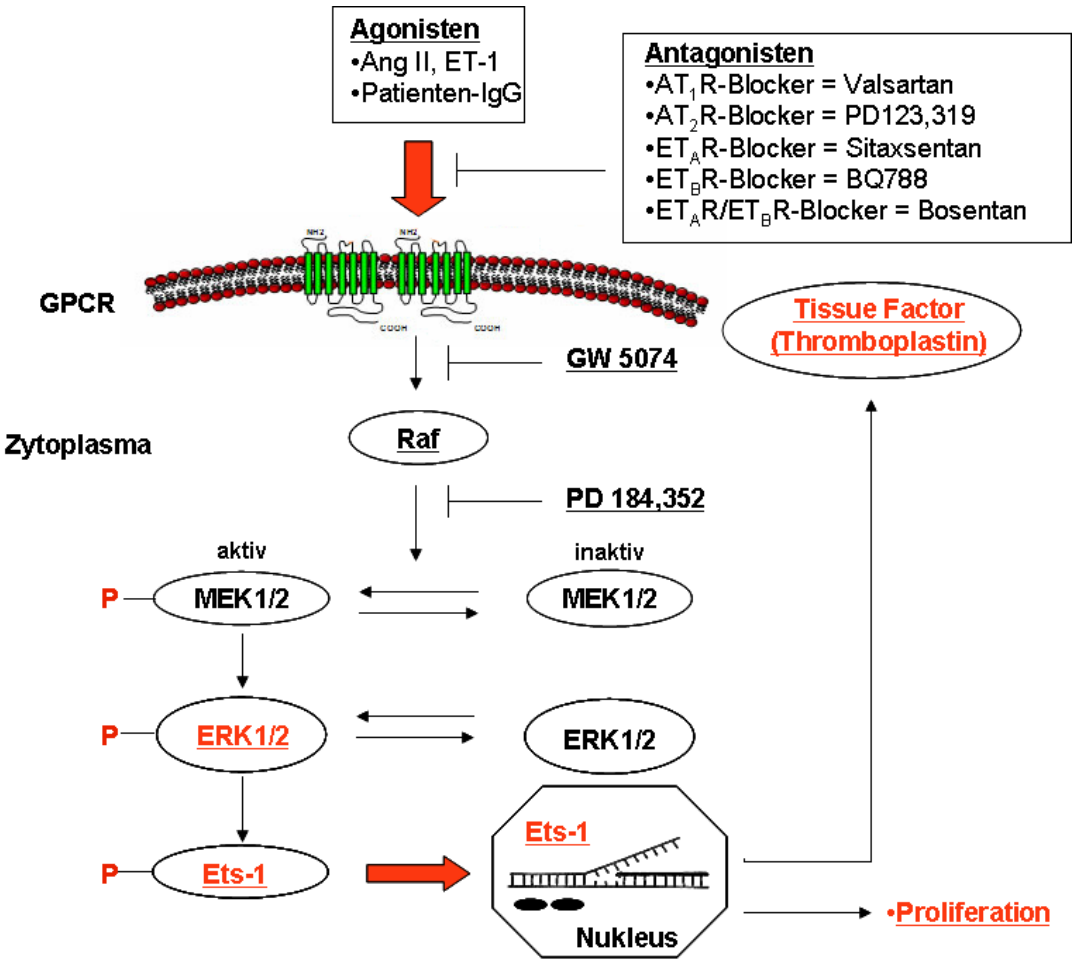


Abbildung 7: Darstellung des zu untersuchenden Signaltransduktionsweges.

Es wurde mit verschiedenen Rezeptoragonisten und mit Kontroll-IgG stimuliert. Desweiteren wurde mit Antagonisten (Strukturen siehe Anhang) gearbeitet, die sich aus einer pharmakologischen Inhibierung zum einen auf die Rezeptoren und zum anderen auf die ERK1/2-Vorläuferkinasen bezogen. Eine Folge der ERK1/2-Aktivierung ist die Phosphorylierung von Ets-1. Diese Aktivierung wurde im Hinblick auf die Stimulation mit den Agonisten und Kontroll-IgG, sowie nach Präinkubation mit Rezeptorantagonisten untersucht. Desweiteren wurde die Aktivierung und Inhibierung auf die funktionelle Aktivität der

Agonisten und Antagonisten, resultierend in Proliferation überprüft. Zusätzlich wurde die Bindung des Transkriptionsfaktors Ets-1 an den Tissue Factor Promotor überprüft.

6.2 Vorversuche

6.2.1 Angiotensin- und Endothelin-Rezeptorexpression

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression der Rezeptoren von Angiotensin II und Endothelin-1 in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1) untersucht. Hierfür wurden die HMEC-1 in 60 mm mit 0.2 % Gelatine beschichteten Petrischalen ausgesät. Am dritten Tag wurden die RNA isoliert. Die Expression der einzelnen Rezeptoren wurde durch konventionelle PCR bestimmt. Die Zellen exprimieren sowohl den AT_1-, AT_2- als auch ET_A- und ET_B-Rezeptor.
Auf Proteinebene wurden die AT_1R und ET_AR untersucht. Hier konnte ebenfalls ein positives Ergebnis bezüglich der Rezeptoren gefunden werden.

6.2.2 Vitalität der HMEC-1

In einem nächsten Experiment wurde die Vitalität der HMEC-1 nach Stimulation mit Ang II, ET-1 und Patienten-IgG in Abhängigkeit der Konzentration untersucht. Hierzu wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und am dritten Tag mit den Stimulantien konzentrationsabhängig für 24 h versetzt. In Abbildung 8 sind die Konzentrationsreihen für Ang II, ET-1 und P-IgG dargestellt.
Die Untersuchung ergab, dass sowohl Angiotensin II und Endothelin-1 als auch Patienten-IgG in dem verwendeten Konzentrationsprofil keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat.

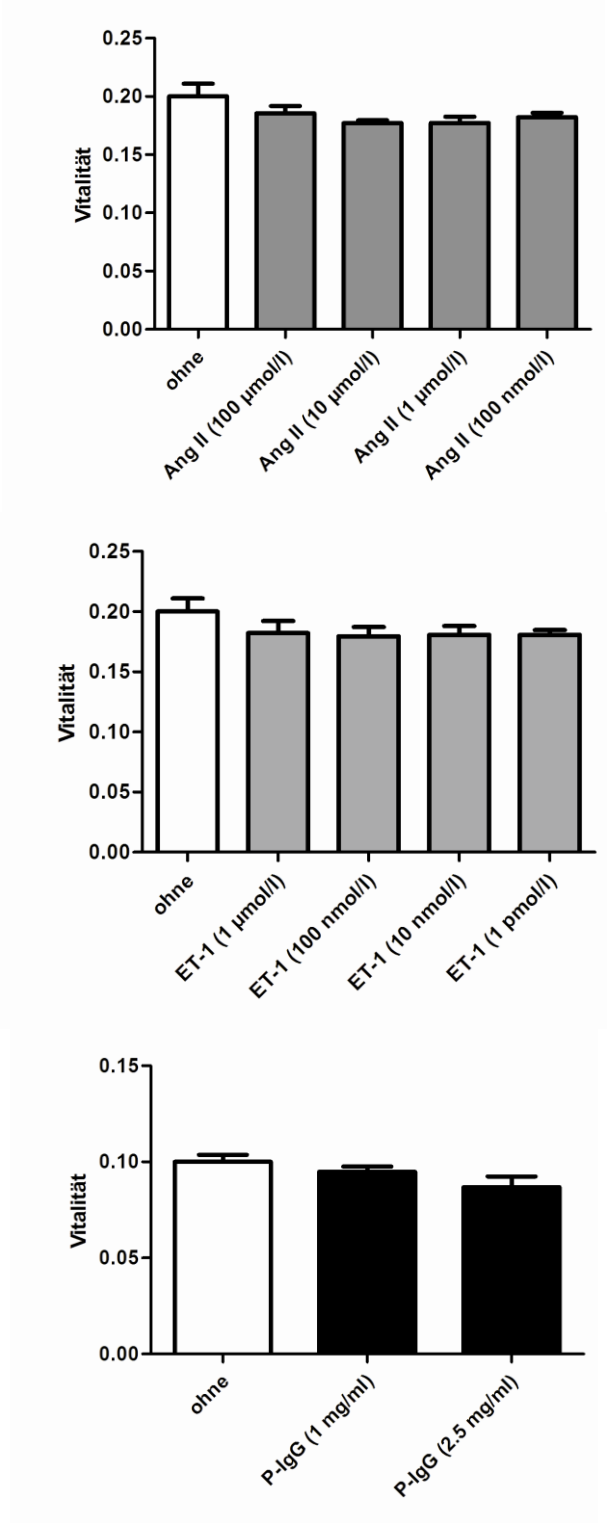


Abbildung 8: Zellvitalität Stimulation mit Angiotensin II, Endothelin-1 und Patienten-IgG in HMEC-1. Dargestellt ist der Einfluß von Ang II, ET-1 und P-IgG in einer Konzentrationsreihe auf das Überleben der HMEC-1. Es ist kein Einfluss der Stimulantien erkennbar.

6.3 ERK1/2-Signaltransduktionsweg

6.3.1 Untersuchung von Mitogen- aktiviertem Proteinkinase Signalwegen (MAPK)

Als MAP-Kinasen wird eine Familie von Serin/Threonin-Proteinkinasen bezeichnet, die an der Regulation von intrazellulären Signalwegen beteiligt sind.
Der ERK1/2-Signalweg wird, wie die MAPK-Signalwege, in eine Dreikomponenten Kaskade unterteilt. Der initiierende Schritt für die Aktivierung der Signaltransduktionskaskade ist die Ligandenbindung an den jeweiligen Rezeptor, gefolgt von Rezeptoraktivierung und Bindung von weiteren Proteinen. Mit diesem Schritt wird Raf-1, eine Vorläuferkinase, aktiviert und phosphoryliert und aktiviert wiederum eine bilokal wirkende Proteinkinase (MEK1/2), welche in einem dritten Schritt ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert wird.
ERK1/2 sind Serin/Threonin-Kinasen, die Signale durch Phosphorylierung von Proteinen an ihren Serin- oder Threoninresten, im Zellkern oder im Zytoplasma weiterleiten. Zu diesen Proteinen (Substraten) zählen unter anderem Transkriptionsfaktoren.[71]
Ein entscheidender Transkriptionsfaktor hinsichtlich der Bildung neuer Gefäße bzw. der Proliferation ist Ets-1, ein Mitglied der ETS-Transkriptionsfaktorenfamilie (E26 Erythroblastomavirus transformationsspezifisch). ETS-Faktoren können mit ihrer Ets-Domäne an eine hoch konservative Purin-reiche 5´-GGAA-3´-DNA-Bindungsstelle binden. Desweiteren besitzt das Ets-1 Protein zwei α-helikale inhibitorische Domainen. Die inhibitorische Aktivität kann durch Phosphorylierung oder Protein/Protein-Wechselwirkungen aufgehoben werden. Zwei weitere Domainen beinhalten die Transaktivierungsdomaine und die sogenannte „Pointed Domain“ (PNT), in der sich eine MAP-Kinase Phosphoakzeptorseite (T38) befindet. Die Phosphorylierung an Threonin 38 (Phosphorakzeptorseite) durch ERK2 erhöht die transkriptionelle Aktivität von Ets-1. [72]

6.3.2 Dosis- und Zeitverläufe

In initialen Dosis-und Zeitexperimenten wurde die Aktivität der natürlichen Liganden auf den ERK1/2-Signalweg untersucht. In Abbildung 9 sind die Dosis-und Zeitverläufe dargestellt. Für die stärkste Phosphorylierung von ERK1/2 wurde für Angiotensin II eine Stimulationsdauer von 10 min bei einer Konzentration von 1 µmol/l und für Endothelin-1 eine Stimulationsdauer von 10 min bei einer Konzentration von 100 nmol/l ermittelt.

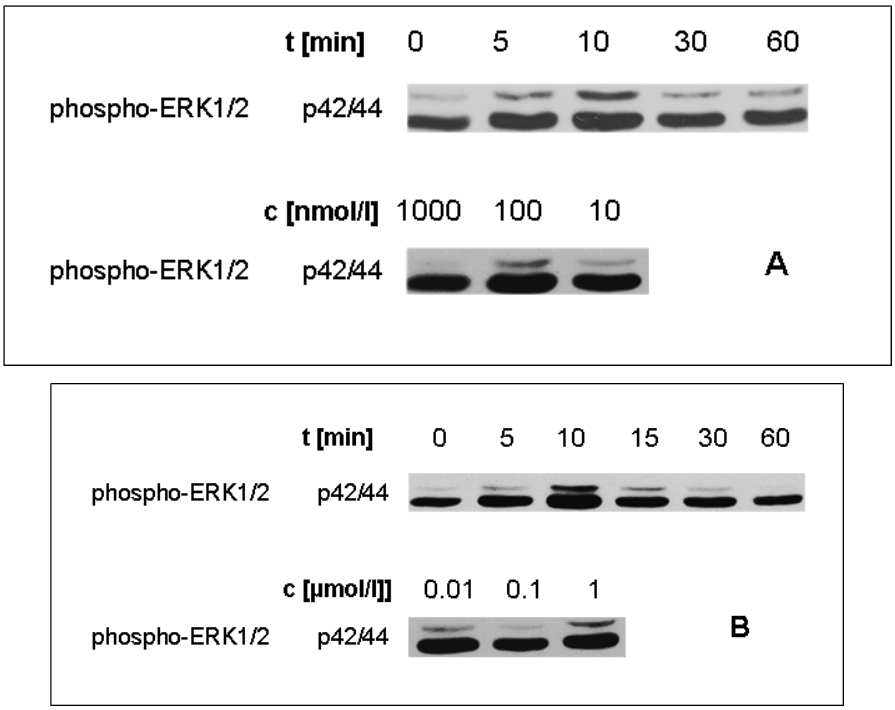


Abbildung 9: Dosis-und Zeitverlauf von Ang II (A) , ET-1 (B) auf ERK1/2 Phosphorylierung. Die Konzentrationen von Ang II sind 1 µmol/l und 100 nmol/l, 10 nmol/l, von Endothelin-1 100 nmol/l, 10 nmol/l und 1 pmol/l. Die Zeitreihe zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 30 und 60 min wurden mit einer Konzentration von 1 µmol/l für Ang II und 100 nmol/l für ET-1 generiert. Die höchsten Phosphorylierungsgrade sind sowohl für ET-1 und Ang II nach 10 min bei einer Ang II Konzentration von 1 mmol/l und einer Endothelin-1 Konzentration von 100 nmol/l.

Um den Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2 bezüglich der Dosis und Zeit für isoliertes Patienten-IgG zu ermitteln, wurde die Zeitreihe an die natürlichen Liganden angepasst. In Abbildung 10 ist erkennbar, dass auch Patienten-IgG nach einer Zeit von 10 min ERK1/2 am stärksten phosphoryliert. Die Dosisreihe wurde mit Konzentrationen von 0.1-2.5 mg/ml durchgeführt. Das Maximum für die stärkste Aktivierung liegt bei 1.0 bzw. 2.5 mg/ml.

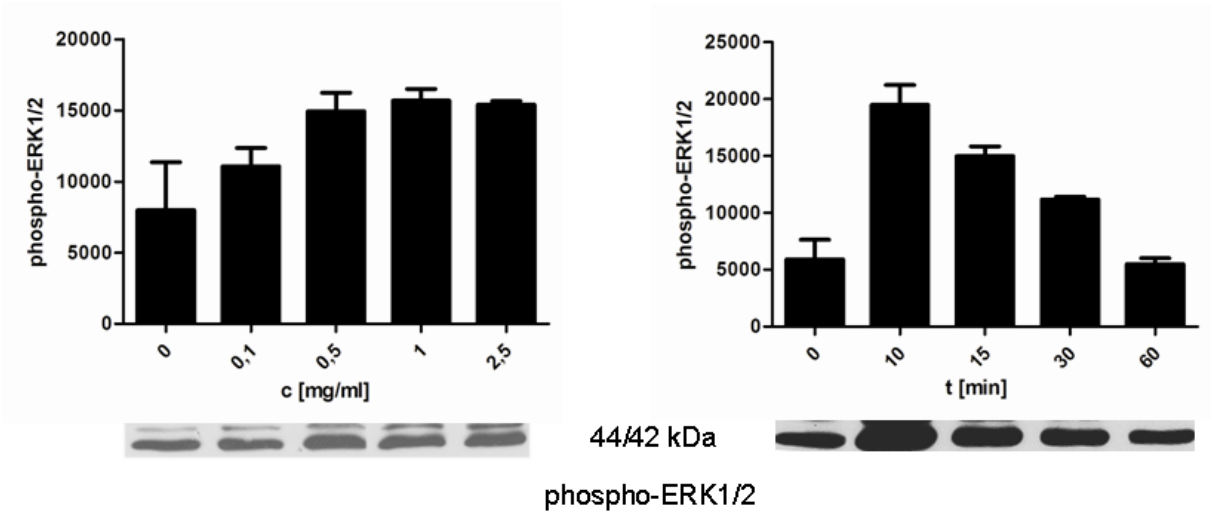


Abbildung 10: Dosis-und Zeitverlauf von Patienten-IgG (P-IgG) auf ERK1/2 Phosphorylierung. Die gewählten Konzentrationen sind von 0.1-2.5 mg/ml P-IgG. Die Zeitreihe zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 30 und 60 min wurden mit einer Konzentration von 2.5 mg/ml generiert. Höchste Phosphorylierungsgrade sind bei einer Konzentration von 2.5 mg/ml nach 10 min erkennbar.

Sowohl mit den natürlichen Liganden, als auch mit Patienten-IgG wurden Zeit- und Dosisreihen mit den Rezeptorblockern (Valsartan = AT_1R-Blocker, PD 123,319 = AT_2R-Blocker, Bosentan = ET_A/ET_BR-Blocker, Sitaxsentan = ET_AR-Blocker, BQ788 = ET_BR-Blocker) durchgeführt. Die effektivste und stärkste Blockade konnte mit allen Blockern bei einer Konzentration von 10 µmol/l bei einer Präinkubationsdauer von 2 h gezeigt werden.

6.3.3 Einfluss der natürlichen Liganden (Ang II, ET-1) und Patienten-IgG auf ERK1/2-Phosphorylierung

Im finalen Experiment wurden die Einflüsse der natürlichen Liganden und des Patienten-IgG's, bzw. die Blockade der Rezeptoren, auf den ERK1/2 Signalweg überprüft. Hierfür wurden HMEC-1 in 60 mm mit Gelatine beschichteten Petrischalen ausgesät und am dritten Tag stimuliert bzw. 2 h präinkubiert mit den spezifischen Rezeptorblockern.
In Abbildung 11 ist erkennbar, dass die Aktivierung von ERK1/2 nach Stimulation mit Patienten-IgG steigt um den Faktor 2 bei Stimulation mit Angiotensin II und mit Patienten-IgG an. Durch Präinkubation mit dem spezifischen AT_1R-Blocker Valsartan (V) kann die Phosphorylierung um mehr als die Hälfte reduziert werden. Der AT_2R-Blocker PD 123,319 (PD) hat keinen inhibierenden Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2. Es zeigt sich mit PD ein leichter aktivierender Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2.

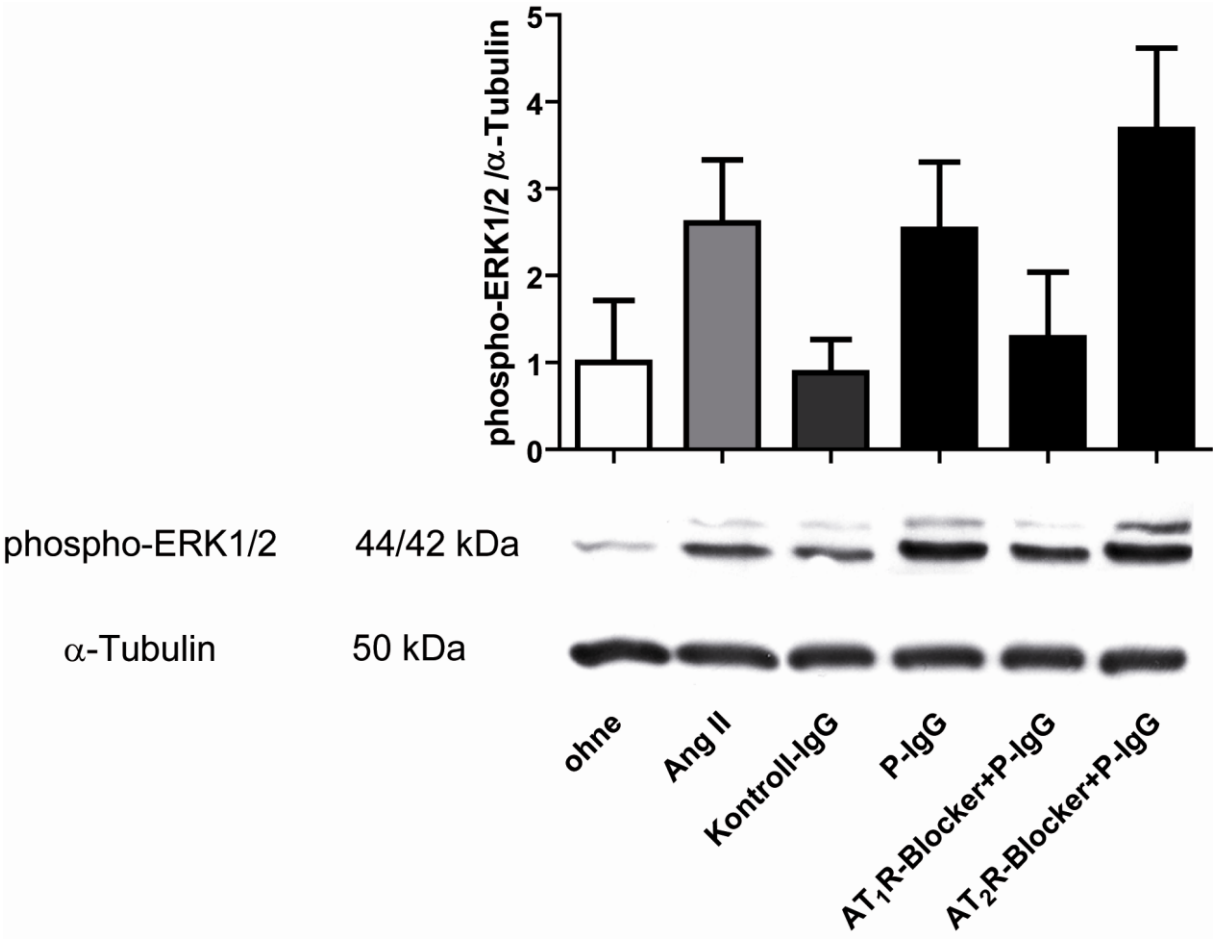


Abbildung 11: Induzierte ERK1/2 -Phosphorylierung durch Angiotensin II (Ang II) und Patienten-IgG. Konfluente HMEC-1 wurden stimuliert mit Ang II (1 µmol/l), Kontroll-IgG (2.5 mg/ml) und Patient-IgG (2.5 mg/ml) für 10 min, bzw. präinkubiert mit AT_1R-Blocker (V = Valsartan) (10 µmol/l) und AT_2R-Blocker (PD = PD 123,319) (10 µmol/l) für 2 h. Es ist eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 mit P-IgG und Ang II erkennbar, die partiell inhibierbar ist mit einem spezifischen AT_1R-Blocker.

In Abbildung 12 ist die Aktivierung von ERK1/2 über die Endothelin-Rezeptoren dargestellt. Es ist eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 mit Patienten-IgG und ET-1 erkennbar.Diese Phosphorylierung ist um die Hälfte reduzierbar bei Präinkubation mit dem ET_AR-Antagonisten Sitaxsentan aber auch mit dem ET_AR/ET_BR-Antagonisten Bosentan. Der ET_BR-Blocker BQ788 hat keinen reduzierenden Effekt auf die ERK1/2 Phosphorylierung.

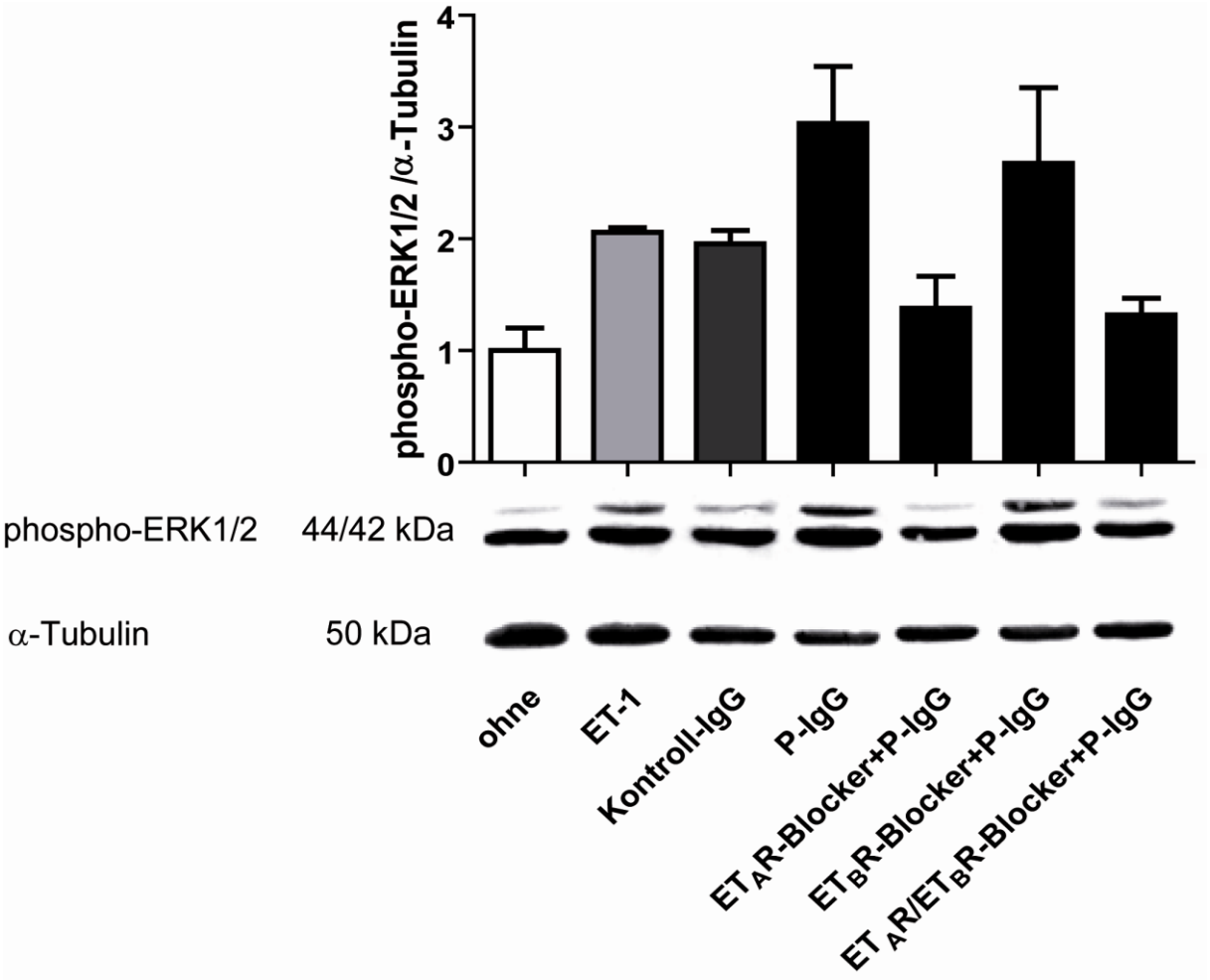


Abbildung 12: Induzierte ERK1/2 -Phosphorylierung durch Endothelin-1 (ET-1) und Patienten-IgG. Konfluente HMEC-1 wurden stimuliert mit ET-1 (100 nmol/l), Kontroll-IgG (2.5 mg/ml) und Patienten-IgG (2.5 mg/ml) für 10 min, bzw. präinkubiert mit ET_AR/ET_BR-Blocker (Bos = Bosentan) (10 µmol/l), ET_AR-Blocker (Sitax = Sitaxsentan) (10 µmol/l) und ET_BR-Blocker (BQ788) (10 µmol/l) für 2 h. Es ist eine deutliche Aktivierung von ERK1/2 mit P-IgG und ET-1 erkennbar, die partiell inhibierbar ist mit einem spezifischen ET_AR-Blocker (Sitaxsentan), bzw. ET_AR/ET_BR-Blocker (Bosentan).

6.3.4 Einfluss eines MEK1/2-Inhibitors auf die AT_1-und ET_AR-induzierte ERK1/2-Phosphorylierung

MEK1/2 sind die Vorläuferkinasen für die Aktivierung von ERK1/2. Um MEK1/2 zu inhibieren, wurde in dieser Arbeit PD184,352 verwendet. In den meisten veröffentlichten Studien über pharmakologische Inhibierung von MEK1/2 wird von PD98059, als potenter Blocker, berichtet. In dieser Arbeit lag in Vorversuchen die Inhibierung von ERK1/2 mit PD98059 bei ca. 20 %. PD184,352, ein neuer MEK1/2-Inhibitor wurde in dieser Arbeit verwendet. In Vorversuchen auf Zeit und Dosis zeigte sich, dass die beste Inhibierung mit 500 nmol/l bei einer Präinkubationszeit von 1 h erzielt werden kann.

In Abbildung 13 ist das finale Experiment dargestellt. Es ist erkennbar, dass die observierte Aktivierung durch Patienten-IgG mit PD184352 zu fast 100 % inhibierbar ist. Die gleiche Inhibierung ist auch für die natürlichen Liganden Ang II und ET-1 ersichtlich.

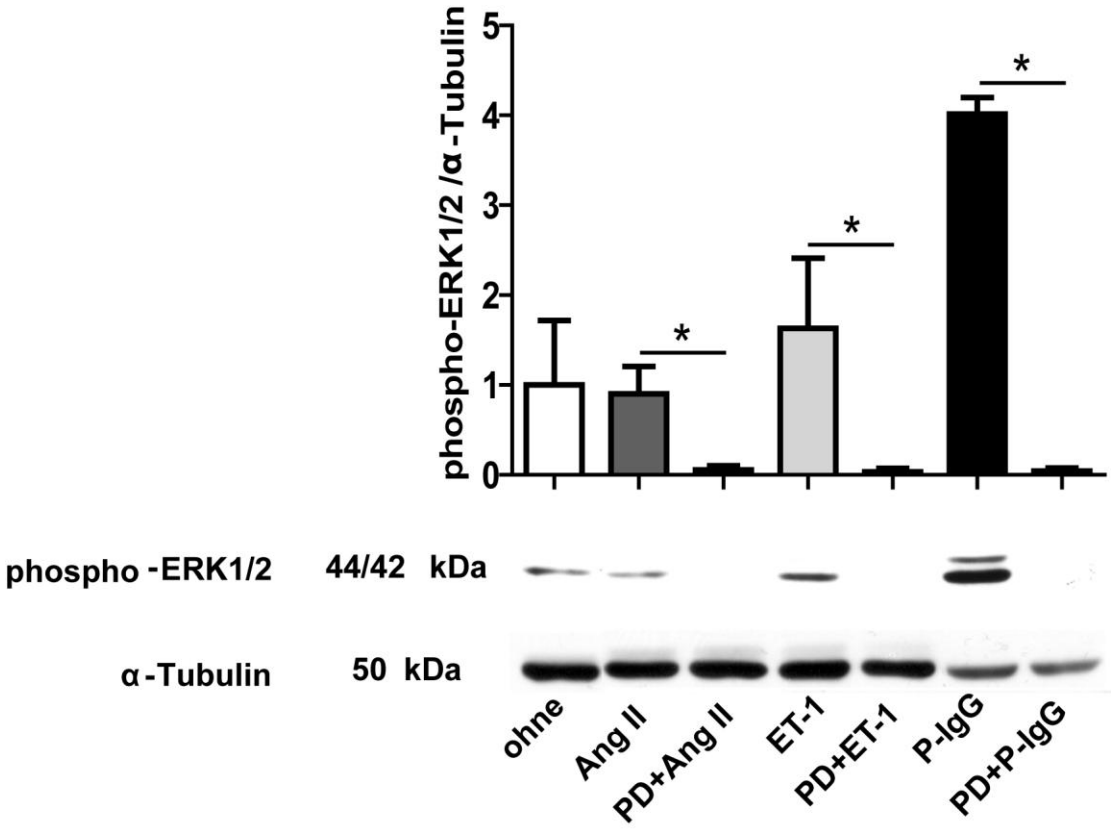


Abbildung 13: Inhibierung der ERK1/2-induzierten Phosphorylierung durch MEK1/2-Inhibitor PD184,352. Präinkubation von PD184,352 [500 nmol/l] für 1 h mit anschließender Stimulation von Ang II [1 µmol/l], ET-1 [100 nmol/l], Patienten-IgG [2.5 mg/ml] für 10 min. Es ist eine signifikante Reduktion von phospho-ERK1/2 nach Präinkubation mit PD184,352 erkennbar. (*p<0.05)

6.4 Untersuchung des Transkriptionsfaktors Ets-1 und Tissue Factor

6.4.1 Tissue Factor

Tissue Factor (Gewebe-Thromboplastin), ein transmembranes Glycoprotein, bestehend aus 263 Aminosäuren, fungiert als Oberflächenrezeptor und Kofaktor für den Blutgerinnungsfaktor VII und den im Blut bereits aktiviert vorliegenden Faktor VIIa. Es initiiert die extrinsiche Blutkoagulationskaskade.[73] Aber auch in anderen Zellen des Gefäßsystems (z.B. Endothelzellen) kann Tissue Factor durch Stimulation mit Entzündungsmediatoren induziert werden.[74]

6.4.2 Genexpressionsanalyse

Voraussetzung für die Untersuchung von Tissue Factor (TF) und des Transkriptionsfaktors Ets-1 war die Expression in HMEC-1. Hierzu wurde auf mRNA Ebene die Genexpression überprüft. Es zeigte sich eine deutliche Expression von beiden Genen bei Überprüfung mittels konventioneller PCR.

6.4.3 Lokalisation von Ets-1 und phosphoryliertem Ets-1

Um die Lokalisation von Ets-1 bzw. seiner aktivierten Form [pT38] Ets-1 zu überprüfen, wurden die Zellen Fluoreszenz gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Hierfür wurden die HMEC-1 für 24 h mit Angiotensin II bzw. Patienten-IgG stimuliert und auf Ets-1, bzw. Ets-1 [pT38] gefärbt.
Wie in Abbildung 14 und 15 erkennbar ist, ist Ets-1 und Ets-1 [pT38] basal (A) im Kern lokalisiert. Durch die Stimulantien Ang II (B) und Patient-IgG (C) verteilt sich die Detektion diffus auf das Zytoplasma bzw. im Kern. Am stärksten ist dieser Effekt in Abbildung 14 (C) visualisiert.
In Abbildung 15 (C) ist eine schwächere Expression im Kern von Ets-1 [pT38] erkennbar.

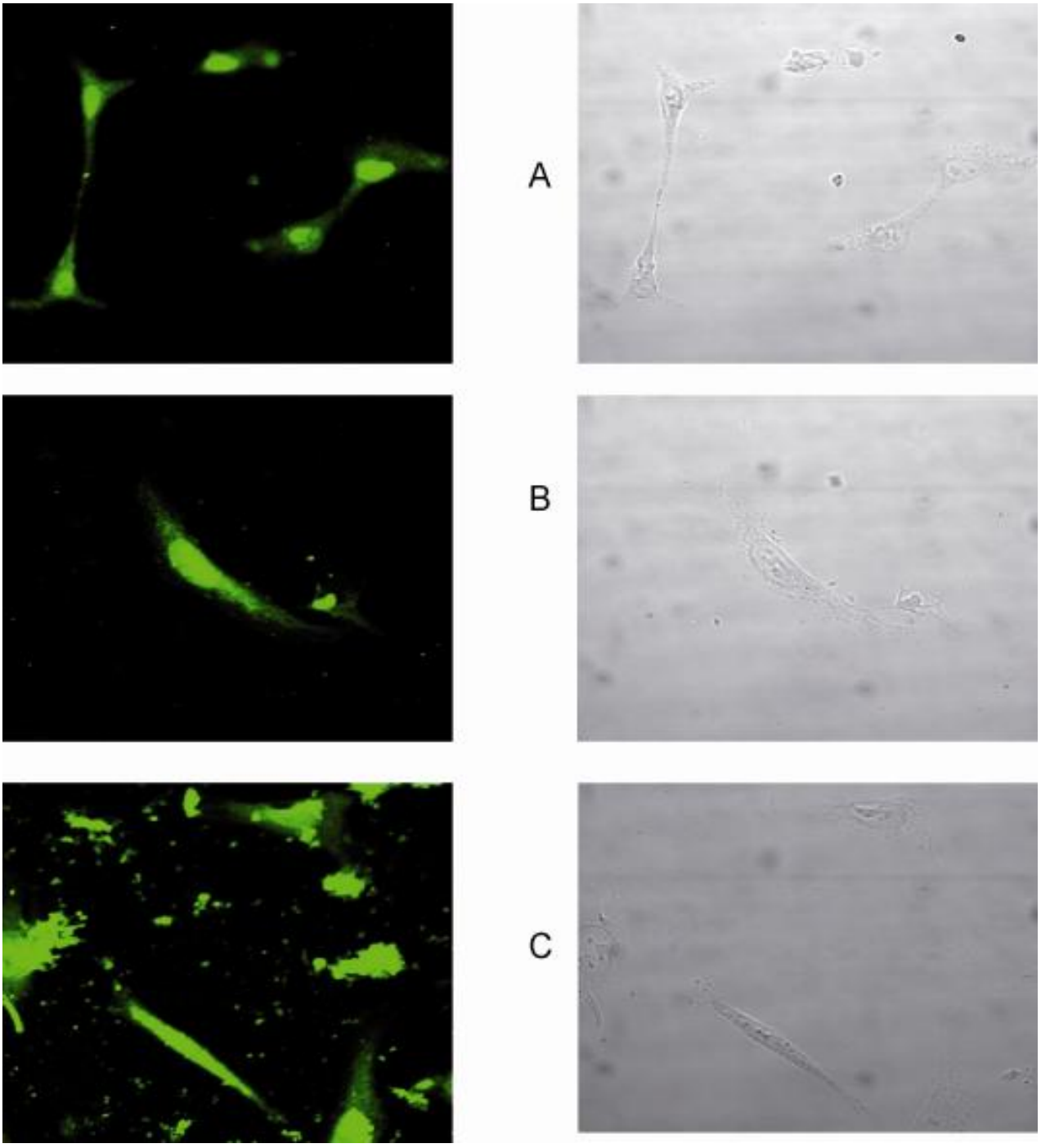


Abbildung 14: Nachweis von Ets-1 mittels konfokaler Mikroskopie. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen mit Kontrolle (A), Stimulation mit Angiotensin II (B) [1 µmol/l], Patienten-IgG (C) [2.5 mg/ml] für 24 h. Es ist eine Veränderung der Lokalisation von Ets-1 nach Stimulation mit P-IgG im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Die Lokalisation ist diffus in der Zelle verteilt.

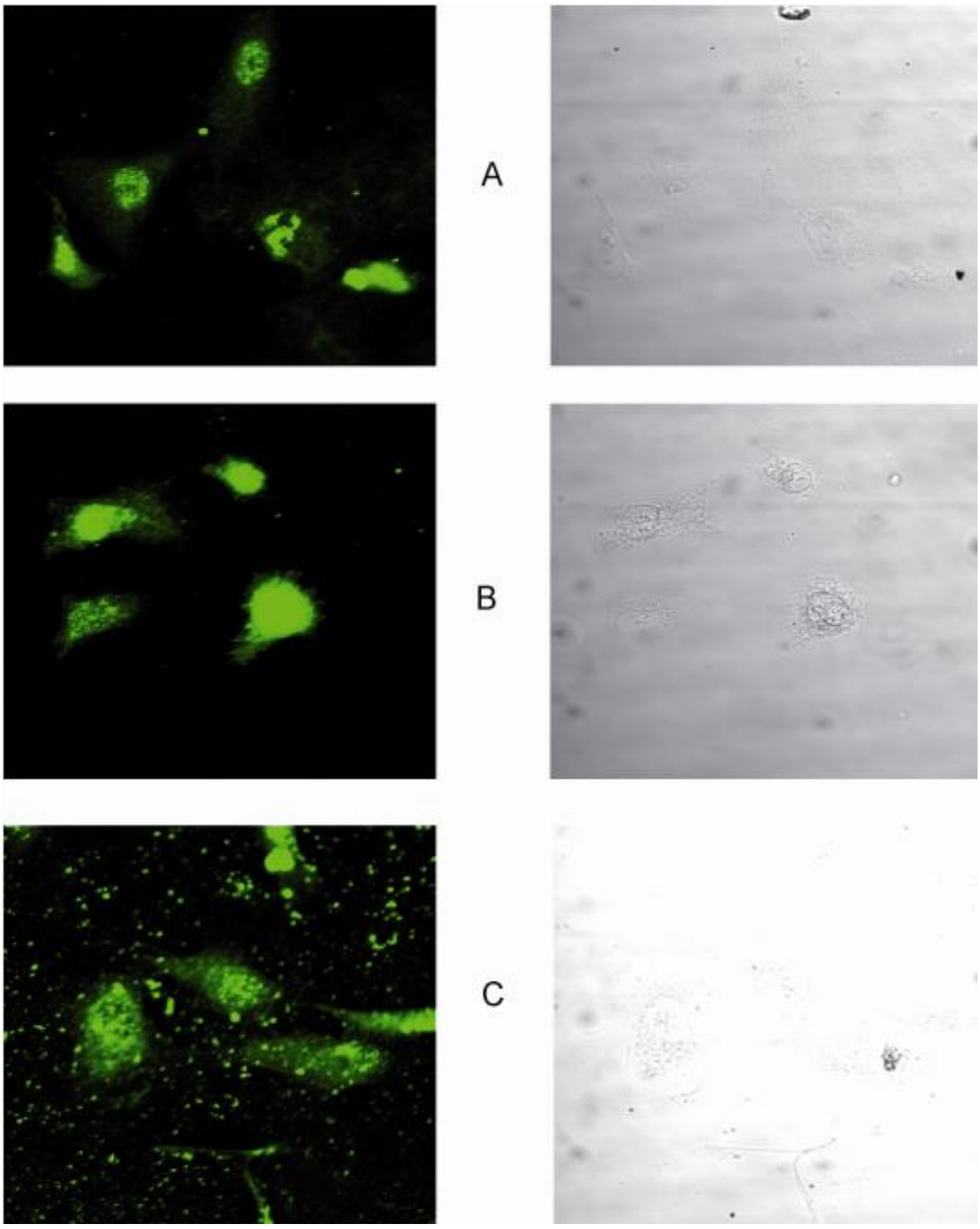


Abbildung 15: Nachweis von P-Ets-1 mittels konfokaler Mikroskopie. Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen mit Kontrolle (A), Stimulation mit Angiotensin II (B) [1 µmol/l], Patienten-IgG (C) [2.5 mg/ml] für 24 h. Es ist eine Abnahme der Ets-1 Expression im Kern nach Stimulation mit P-IgG erkennbar.

6.4.4 Einfluss der natürlichen Liganden (Ang II und ET-1) und Patienten-IgG auf die Phosphorylierung von Ets-1

Als Folge der Aktivierung von ERK1/2 wurde die Phosphorylierung von Ets-1 mittels Western Blot observiert. Hierfür wurden die Zellen nach dem gleichen Muster wie für die P-Erk1/2 Experimente durchgeführt. Stimuliert wurden die HMEC-1 am dritten Tag mit den natürlichen Liganden Ang II und ET-1 bzw. mit Kontroll-IgG und Patienten-IgG. Wie in Abbildung 16 und 17 erkennbar, wurde selektiv mit dem AT_1R-Blocker Valsartan (V), mit dem AT_2R-Blocker PD 123,319 (PD), dem ET_AR/ET_BR-Blocker Bosentan (Bos), dem ET_AR-Blocker Sitaxsentan (Sitax) und dem ET_BR-Blocker BQ788 (BQ) gearbeitet. In beiden Abbildungen ist der aktivierende Effekt von Patienten-IgG auf Ets-1 erkennbar. Sowohl Kontroll-IgG als auch Angiotensin II haben keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Ets-1, wohingegen der natürliche Ligand Endothelin-1, wie in Abbildung 17 erkennbar, die Phosphorylierung deutlich erhöht.

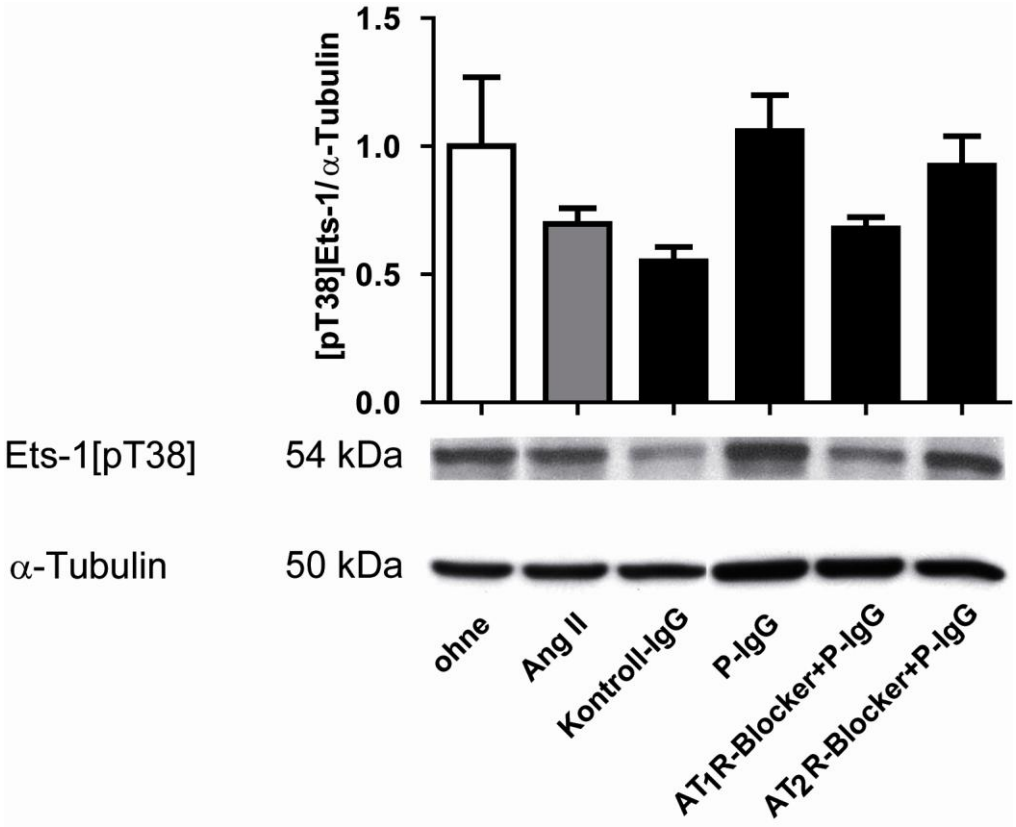


Abbildung 16: Phosphorylierung von Ets-1 an Threonin 38 über Angiotensin II Typ 1 Rezeptor in HMEC-1. Stimulation mit Angiotensin II (1 µmol/l), Kontroll-IgG (2.5 mg/ml) und Patienten-IgG (2.5 mg/ml) für 10 min, bzw. Präinkubation mit selektiven AT_1R-Blocker (V = Valsartan) und AT_2R-Blocker (PD = PD123,319) in einer Konzentration von 10 µmol/l. Es ist eine deutliche Phosphorylierung von Ets-1 durch P-IgG erkennbar, die eindeutig durch den AT_1R-Blocker (Valsartan) inhibiert ist.

Die Inhibierungseffekte der Blocker für AT_1R, ET_AR und ET_AR/ET_BR sind in beiden Abbildungen erkennbar. Bosentan inhibiert die Phosphorylierung um die Hälfte im Vergleich zu Patienten-IgG. BQ788, als ET_BR-Blocker ist im Vergleich kein bedeutender Effekt zuzuschreiben. Das Gleiche gilt auch für PD123,319, als AT_2R-Blocker.

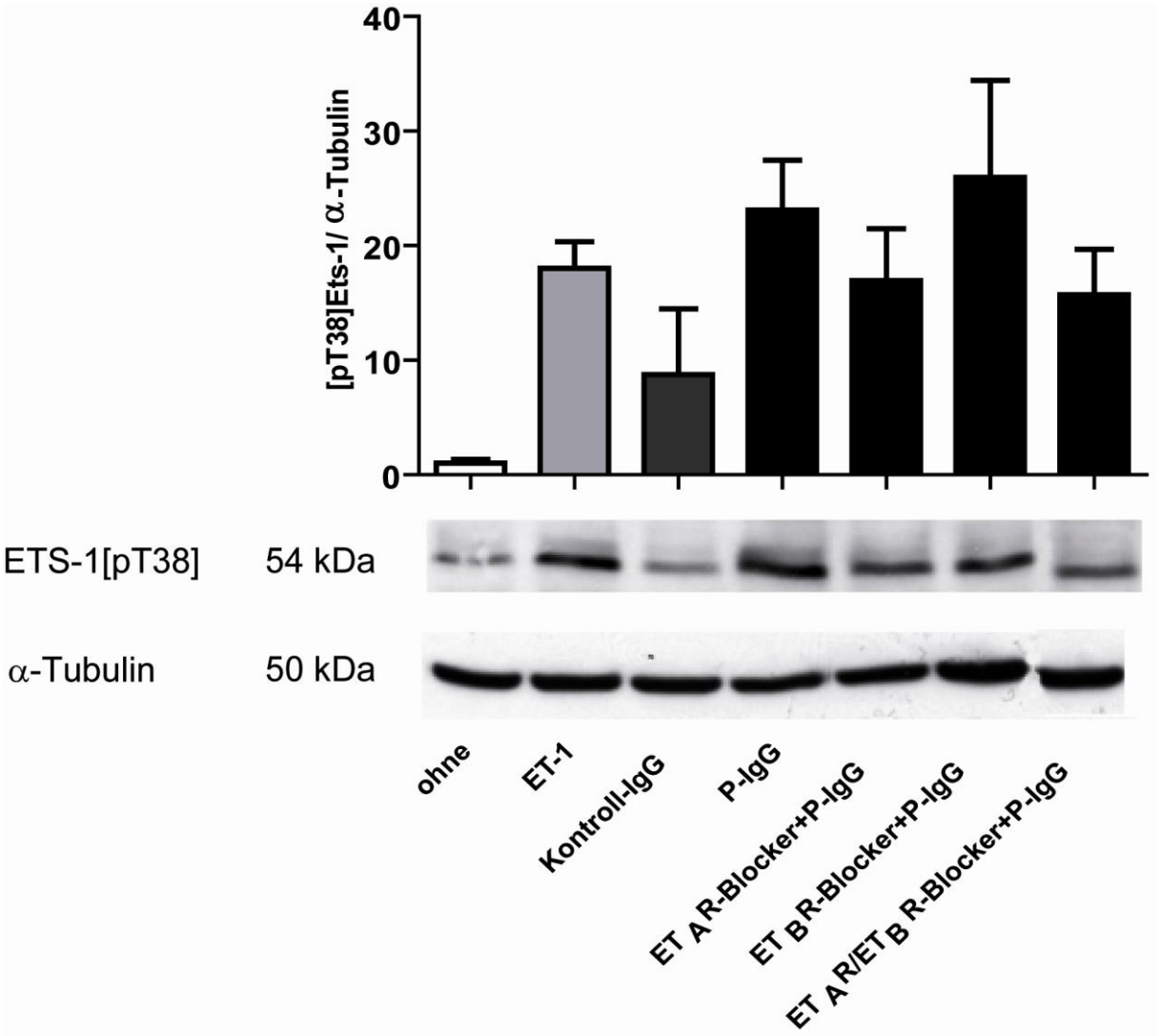


Abbildung 17: Phosphorylierung von Ets-1 an Threonin 38 über Endothelin-1 Typ A Rezeptor in HMEC-1. Stimulation mit Endothelin-1 (100 nmol/l), Kontroll-IgG (2.5 mg/ml) und Patienten-IgG (2.5 mg/ml) für 10 min , bzw. Präinkubation mit selektiven ET_AR-Blocker (Sitax = Sitaxsentan), ET_BR-Blocker (BQ = BQ788) und ET_A/ET_BR-Blocker (Bos = Bosentan) in einer Konzentration von 10 µmol/l. Es ist eine deutliche Phosphorylierung von Ets-1 durch P-IgG erkennbar, die eindeutig durch den ET_AR-Blocker (Sitaxsentan), bzw. durch den ET_AR/ET_BR-Blocker (Bosentan) inhibiert ist.

6.4.5 Nachweis von Tissue Factor in Proteinextrakten

Um die Proteinexpression von Tissue Factor zu untersuchen, wurden membran-und zytosolische Proteinlysate generiert. Dafür wurden die Zellen für 24 h mit Angiotensin II, Endothelin-1, Kontroll-IgG und Patienten-IgG stimuliert. Tissue Factor setzt sich zusammen aus einer extrazellulären Domäne von 219 Aminosäuren Länge, eine einfach transmembranäre Domäne mit einer Länge von 23 Aminosäuren sowie eine zytoplasmatische Domäne mit 21 Aminosäuren Länge.[75]

In Abbildung 18 sind die Auswirkungen der Stimulationen auf Membranproteinextrakte dargestellt. Es ist keine Regulation erkennbar. Die Expression von Tissue Factor geht nicht über Basalniveua (ohne) hinaus.

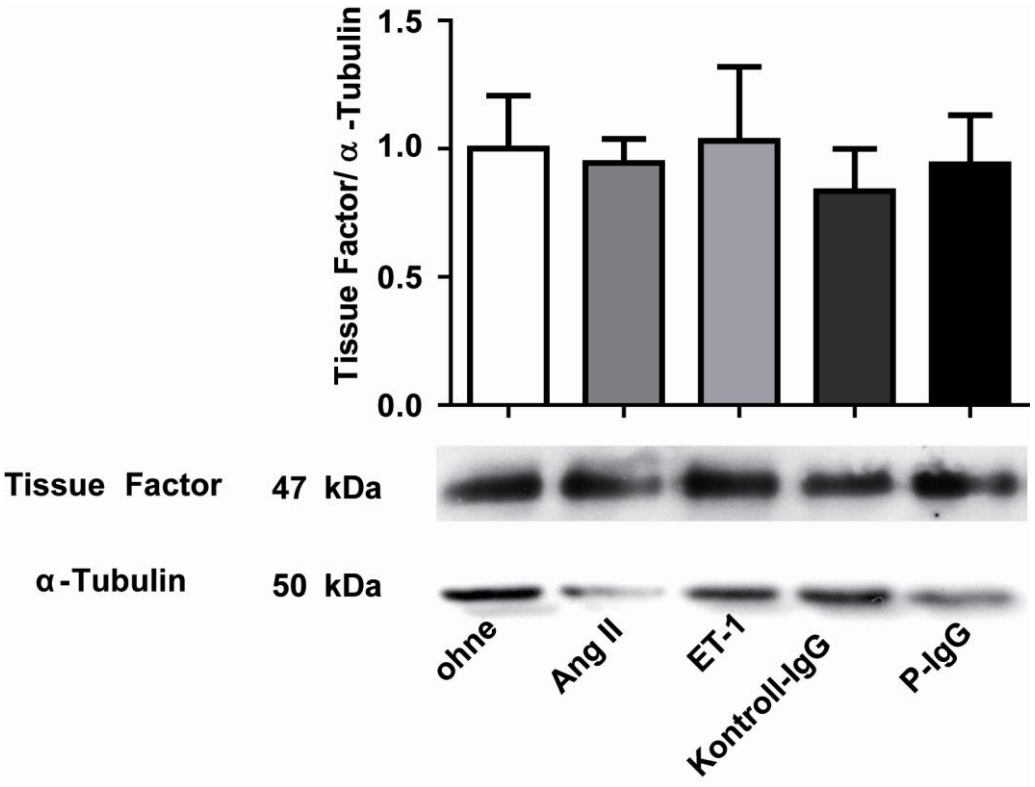


Abbildung 18: Expression von Tissue Factor in Membranproteinextrakten aus HMEC-1. Stimulation der HMEC-1 mit ET-1 (100 nmol/l), Ang II (1 µmol/l), Kontroll-IgG (2.5 mg/ml) und Patienten-IgG (2.5 mg/ml) für 24 h. Es ist keine Regulation der Tissue Factor Epression erkennbar.

Im nächsten Schritt wurde die Expression in zytosolische Proteinextrakten untersucht. In Abbildung 19 ist erkennbar, dass die Expression von TF nach Stimulation mit Patienten-IgG im Vergleich zu allen Stimulantien und zur Kontrolle (ohne) signifikant erhöht ist. Die natürlichen Liganden Endothelin-1 und Angiotensin II haben keinen Einfluss auf die Expression von TF im Zytosol.

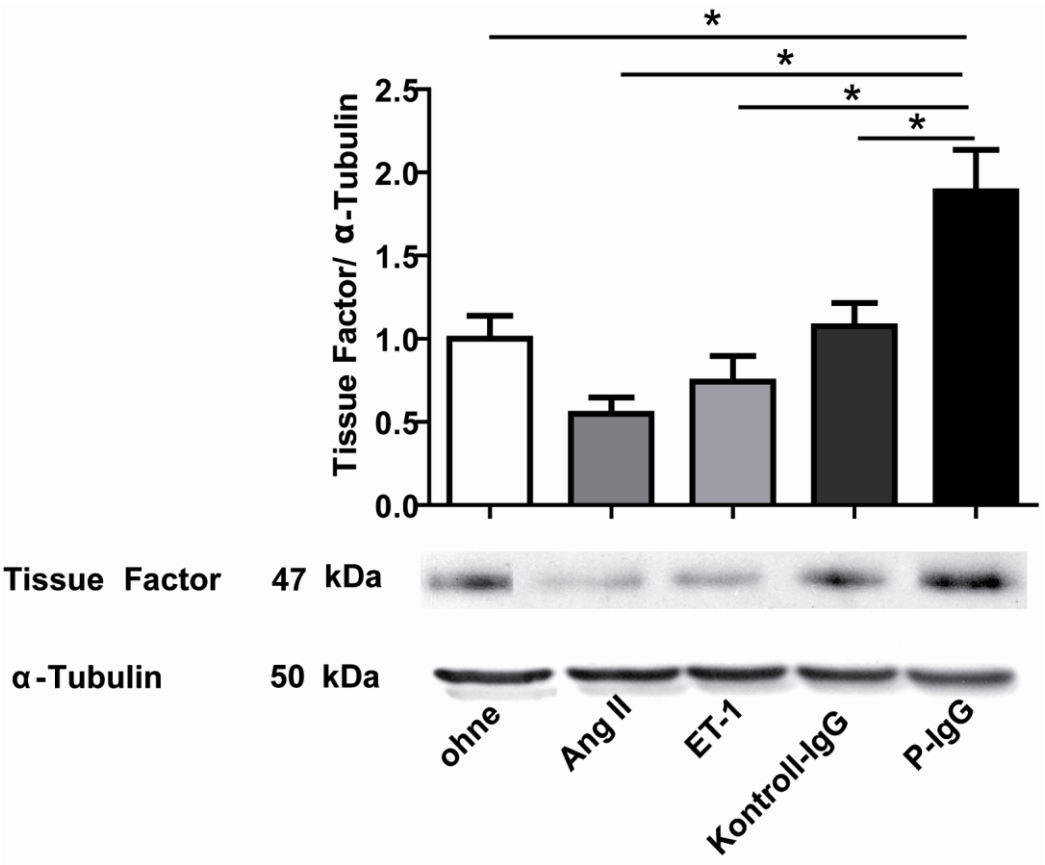


Abbildung 19: Expression von Tissue Factor in zytosolischer Fraktion aus HMEC-1. Stimulation der HMEC-1 mit ET-1 (100 nmol/l), Ang II (1 µmol/l), Kontroll-IgG (2.5 mg/ml) und Patient-IgG (2.5 mg/ml) für 24 h. Es ist ein signifikanter Anstieg von Tissue Factor nach Stimulation mit Patienten-IgG im Bezug auf Ang II, ET-1 und Kontroll-IgG erkennbar. (*p<0.05)

6.4.6 Aktivierung des TF-Promotors durch Ets-1 Expression

In diesem Experiment wurde die transkriptionelle Aktivität von Ets-1 zum Tissue Factor Promotor untersucht. Hierzu wurden HMEC-1 mit unterschiedlichen Stimulantien versetzt, Kernextrakte generiert und mittels Gel-Retardierungsexperimenten (EMSA) die transkriptionelle Aktivierung von TF durch Ets-1 untersucht. Es zeigte sich ein sehr einheitliches Muster. Wie in Abbildung 20 erkennbar, ist ein deutlicher Shift von Bande A-E vorhanden, die in Bande E (Stimulation mit P-IgG) am stärksten ist. In den Banden G-H ist

der Shift nicht vorhanden, denn hier wurde eine mutierte Sequenz von Tissue Factor, auf das Kernmotiv von Ets-1 bezogen, eingesetzt. In Bande F wurde zusätzlich zum Kernextrakt, inkubiert mit der TF-Promotorsequenz, noch der Ets-1 Antikörper zugesetzt.

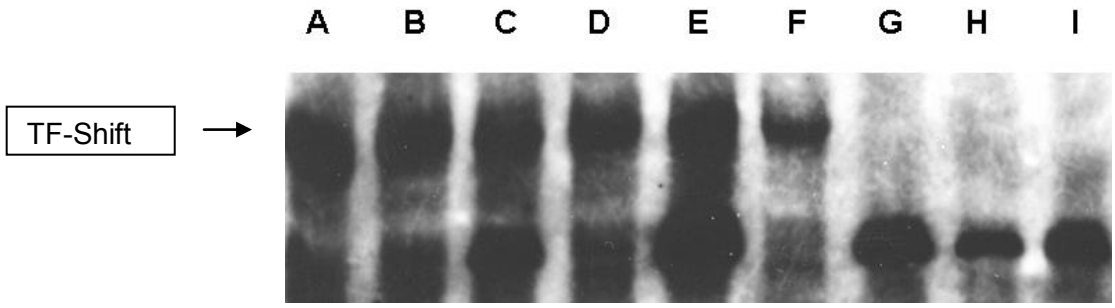


Abbildung 20: Transkriptionelle Aktivität von Ets-1. Dargestellt sind Kernextrakt-TF-Promotor-Bindungen aus HMEC-1, die durch Stimulation mit (A = ohne, B = ET-1, C = Ang II, D = Kontroll-IgG, E = Patienten-IgG, F = Patienten-IgG+Ab., G = ohne (mutierte TF), H = ET-1 (mutierte TF), I = Patienten-IgG (mutierte TF) gewonnen wurden. Erkennbar ist eine starker Shift in E nach Stimulation mit P-IgG. Die Banden G-H weisen keinen TF-Shift auf, denn hier wurde eine mutierte Kernnukleotidsequenz des TF-Promotors verwendet.

6.5 Proliferationsexperimente mittels BrdU-Einbau

Als Folge der ERK1/2-Aktivierung wurde, als funktioneller Parameter, die Proliferation der HMEC-1 in Bezug auf verschiedene Aspekte untersucht.

In Abbildung 21 und 22 wurde die Proliferation auf Angiotensin II-und Endothelin-1-Rezeptoren untersucht. Es ist erkennbar, dass Angiotensin II keinen Effekt auf die Proliferation ausübt. Durch Stimulation mit Patienten-IgG wird die Teilungsrate der Zellen um den Faktor 1.5 in Bezug auf die Kontrolle erhöht. Die verursachte Proliferationssteigerung durch Patienten-IgG ist durch den AT_1R-Blocker Valsartan inhibierbar. Auch der AT_2R-Blocker PD 123,319 übt in diesem Experiment einen reduzierenden Einfluss aus, der aber deutlich schwächer ist, als der reuzierende Effekt von Valsartan.

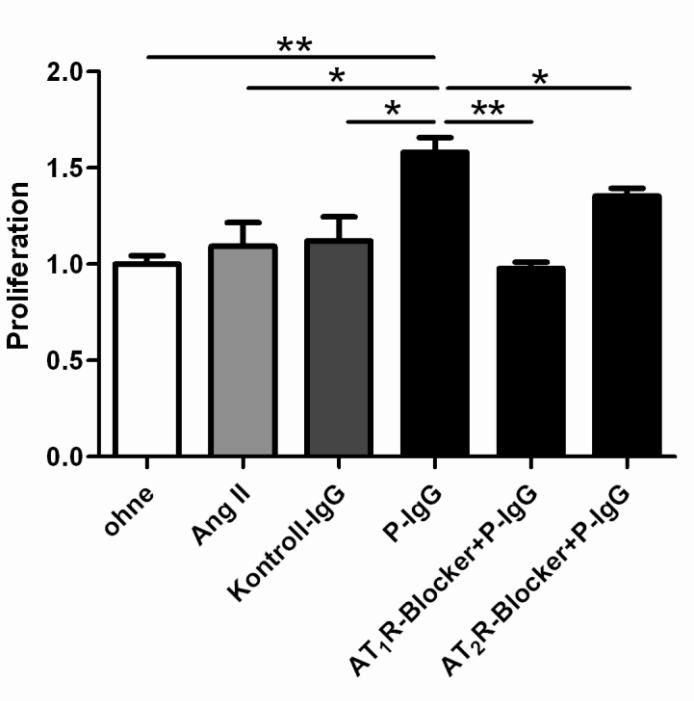


Abbildung 21: Blockade der Proliferation durch Inhibierung des AT_1-Rezeptors. Behandlung mit den Stimulantien Ang II [1 µmol/l] Kontroll-IgG und Patienten-IgG [2.5 mg/ml] für 24 h, mit und ohne Präinkubation (2 h) von AT_1R-Blocker (Valsartan) [10 µmol/l] und AT_2R-Blocker (PD 123,319) [10 µmol/l]. Erkennbar ist ein Anstieg der Proliferation nach Stimulation mit P-IgG um den Faktor 1.5 bezogen auf die unstimulierte Kontrolle (ohne), sowie eine Inhibierung der nach Präinkubation mit dem AT1R-Blocker um den Faktor 1.7 bezogen auf P-IgG. (*p<0.05; **p<0.001)

In Abbildung 22 wurde ist Proliferation in Bezug auf die Endothelin-Rezeptoren dargestellt. Endothelin-1 und Kontroll-IgG erhöhen in geringem Masse die Proliferation. Patienten-IgG erhöht die Teilungsrate um den Faktor 1.5. Sowohl der ET_AR/ET_BR-Blocker Bosentan und der ET_AR-Antagonist Sitaxsentan reduzieren die ausgelöste Patienten-IgG Proliferation um mehr als die Hälfte. Der selektive ET_BR-Blocker BQ788 übt ebenfalls einen deutlich reduzierenden Effekt auf die durch Patienten-IgG ausgelöste Proliferation aus.

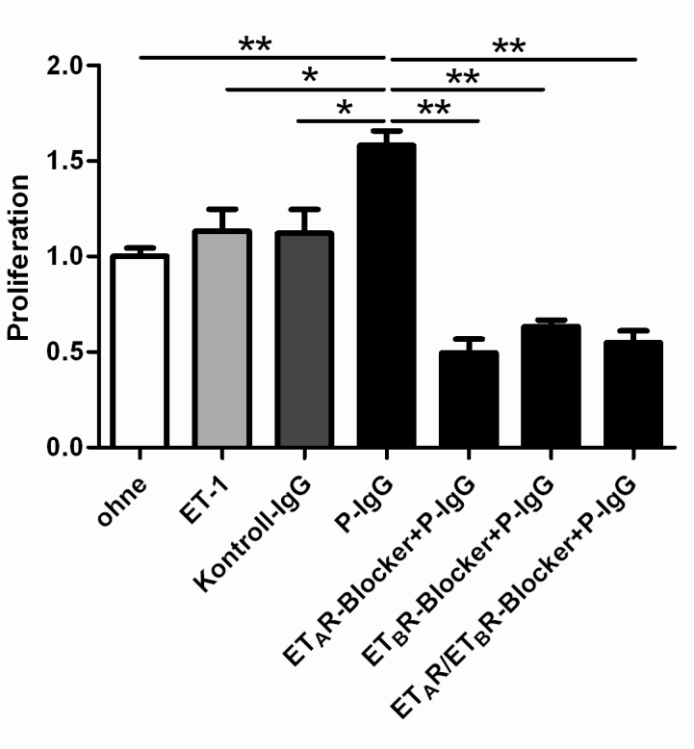


Abbildung 22: Blockade der Proliferation durch Inhibierung der ET-Rezeptoren. Behandlung mit den Stimulantien ET-1 und Patienten-IgG in den Konzentrationen von 100 nmol/l und 2.5 mg/ml für 24 h, mit und ohne Präinkubation (2 h) mit ET_AR-Blocker (Sitaxsentan) [10 µmol/l], ET_BR-Blocker (BQ788) [10 µmol/l] und ET_AR/ET_BR-Blocker (Bosentan) [10 µmol/l]. Es ist nach Stimulation mit P-IgG eine Zunahme der Proliferation um den Faktor 1.5 in Bezug zur Kontrolle (ohne) ersichtlich, mit nachfolgender signifikanter Inhibierung mit den Rezepotrblockern um den Faktor 3 in Bezug zu P-IgG. (*p<0.05; **p<0.001)

In den nächsten beiden Abbildungen sind die Auswirkungen auf die Inhibierungen von Raf-1 und MEK1/2, als Vorläuferkinasen des ERK1/2-Signalweges, auf die Zellteilung dargestellt.

In Abbildung 23 wird Raf-1 selektiv blockiert durch GW5074 in einer Konzentrationsreihe. Die Effekte von GW5074 wurden in Bezug auf den natürlichen Liganden Angiotensin II und Patienten-IgG getestet.

Die durch Stimulation mit Angiotensin II ausgelöste Proliferation lässt sich durch Präinkubation mit GW5074 auf Basalniveau blocken. Die verwendete Konzentration von GW5074 ist für diese Reduktion 1 mmol/l. Nach Präinkubation mit der Konzentration 500 nmol/l zeigte sich ebenfalls eine Inhibierung der Proliferation. Allerdings konnte bei einer Konzentration von 100 nmol/l ein leicht aktivierender Effekt festgestellt werden.

Durch Stimulation mit Patienten-IgG konnte wie in den vorherigen Experimenten eine Zunahme der Proliferation festgestellt werden, die durch Präinkubation mittels eines Konzentrationsgefälles von 100 nmol/l über 500 nmol/l zu 1 µmol/l von GW5074 in einer Abnahme der Proliferation resultiert.

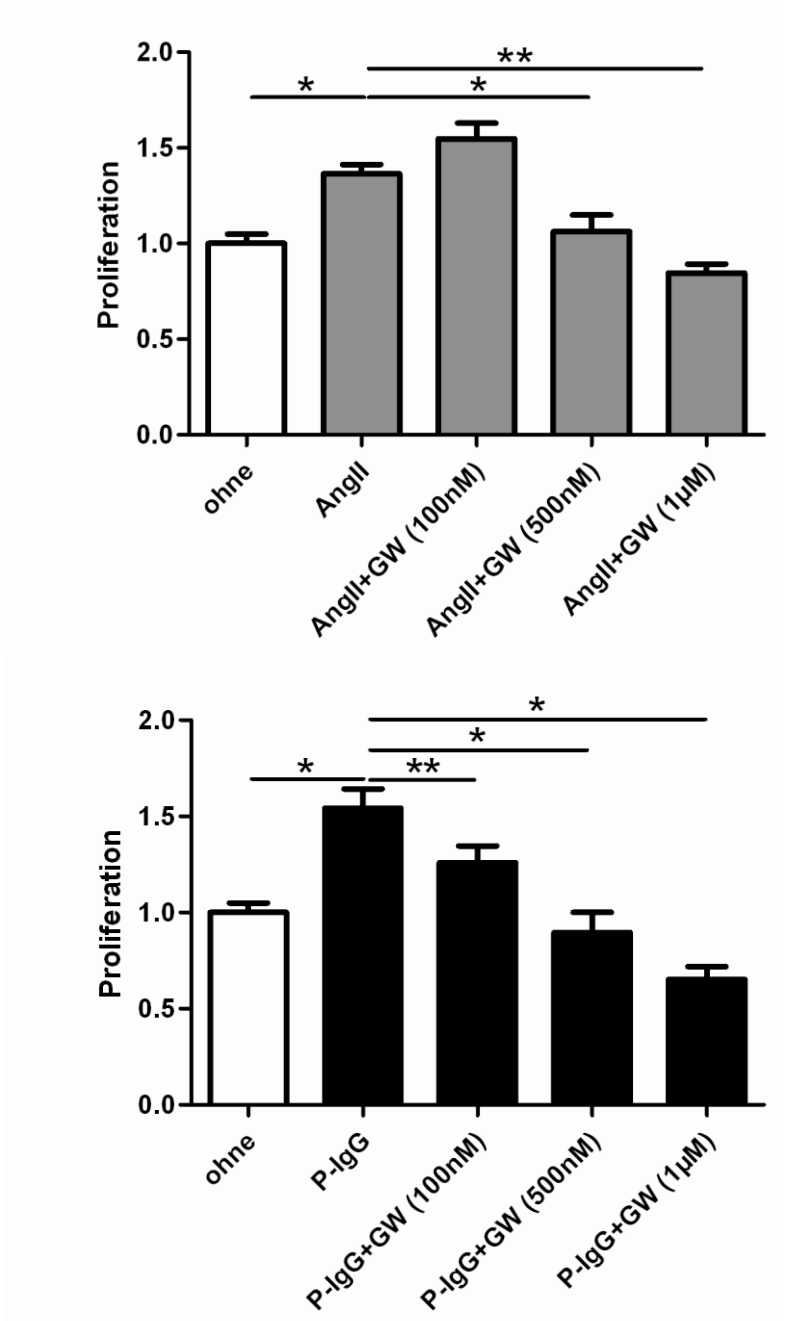


Abbildung 23: Blockade der Proliferation durch Inhibierung von Raf-1. Dargestellt sind die Proliferationsdaten mit/ohne Blockade der Raf-1 Kinase mittels GW5074 in Bezug auf Stimulation mit Ang II (1 mmol/l) und P-IgG (2.5 mg/ml). Die Reduktion der Proliferation mit GW5074 ist statistisch signifikant, wobei die höchste Reduktion bei einer Konzentration von GW5074 bei 1 µmol/l erkennbar ist. (*p<0.001, **p<0.05)

In den nächsten Abbildungen sind die Experimente mit dem selektiven MEK1/2-Inhibitors PD184,352 dargestellt. Hierfür wurden die HMEC-1 mit verschiedenen Konzentrationen von PD184,352 versetzt und danach mit Angiotensin II bzw. mit Patienten-IgG stimuliert. In Abbildung 24 ist erkennbar, dass durch Stimulation mit Patienten-IgG die Zellteilung im Vergleich zur Kontrolle erhöht wird. Die durch Patienten-IgG erhöhte Proliferation kann bei

einer PD184,352-Konzentration von 500 nmol/l am stärksten um ca. 80 % reduziert werden. Aber auch mit den höheren MEK1/2-Inhibitorkonzentrationen ist eine Reduktion der Proliferation erkennbar.

Angiotensin II übt in diesem Experiment keinen Einfluß auf die Proliferation aus. In diesem Graph ist aber ein inhibitorischer Effekt von PD184,352 auf die Kontrolle (ohne) visualisiert.

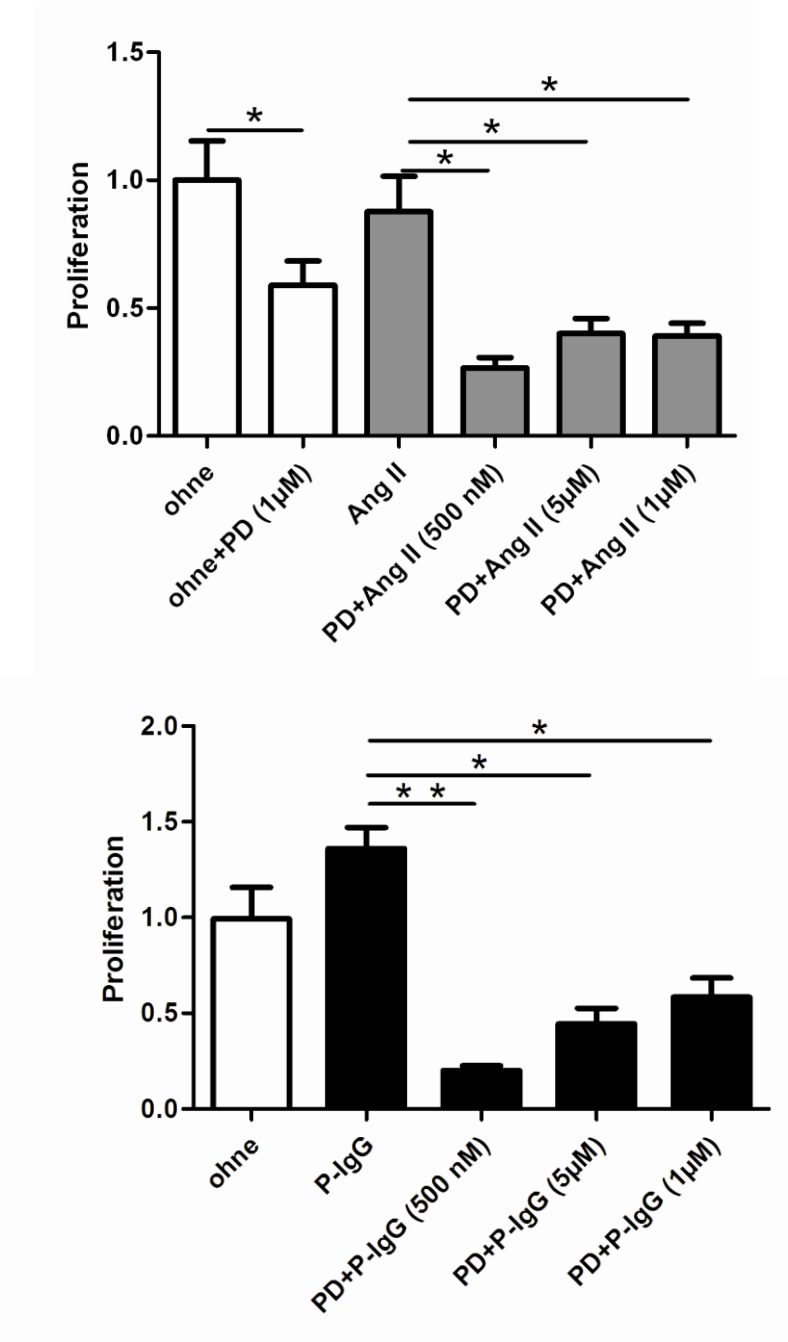


Abbildung 24: Blockade der Proliferation durch Inhibierung von MEK1/2 in HMEC-1. Dargestellt sind die Proliferationsdaten mit/ohne Blockade der MEK1/2 Kinase mittels PD184,352 in Bezug auf Stimulation mit Ang II (1 mmol/l) und P-IgG (2.5 mg/ml). Die Reduktion der Proliferation mit PD184352 ist statistisch signifikant, wobei die höchste Reduktion bei einer Konzentration von PD184352 bei 500 nmol/l erkennbar ist. (*p<0.05; **p<0.001)

7 Diskussion

Die systemische Sklerose ist eine Multiorgankrankheit mit autoimmunen Einflüssen. Da ein möglicher Zusammenhang zwischen immunologischen und vaskulären Veränderungen noch weitgehend ungeklärt ist, sollte in dieser Arbeit eine Verbindung zwischen Gefäßschädigungsmechanismen und Immunglobulinen von Patienten mit systemischer Sklerose überprüft werden. Hierzu wurde der ERK1/2/Ets-1-Signaltransduktionsweg in einer humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie der Haut (HMEC-1) untersucht. Die Ergebnisse nach Stimulation mit Patienten-IgG, Kontroll-IgG bzw. den natürlichen Liganden Angiotensin II und Endothelin-1 zeigten eindeutige aktivierende Effekte in Bezug auf ERK1/2, Ets-1 und eine Zunahme der Zellproliferation. Diese Effekte konnten durch spezifische AT_1-und ET_A-Rezeptorantagonisten inhibiert werden. Blockade der Kinasen Raf-1 und MEK1/2 oberhalb von ERK1/2 bewirkte ebenfalls eine Inhibition des Signalweges gefolgt von verminderter Proliferation der Endothelzellen.
Zur Klärung möglicher relevanter Pathomechanismen der Gefäßschädigung wurde in weiteren Untersuchungen die Regulation und Expression des proinflammatorischen und prokoagulatorischen Proteins Tissue Factor untersucht. Isoliertes Patienten-IgG führte zu einer gesteigerten Expression von Tissue Factor im Zytosol der Endothelzellen. Außerdem konnte als eine mögliche Verbindung zum ERK1/2-Signalweg eine Bindung der Kernnukleotidsequenz von Ets-1 an den Tissue Factor Promotor nachgewiesen werden.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die durch SSc-IgG ausgelösten Effekte rezeptorabhängig sind und über den AT_1R und den ET_AR vermittelt werden. Sie erklären damit einen möglichen pathogenetischen Zusammenhang zwischen immunologischen Mechanismen und gefäßschädigenden Prozessen. Durch die Aufdeckung dieses Pathomechanismus eröffnen sich zudem neue spezifische Therapiemöglichkeiten für Patienten mit systemischer Sklerose.

In einer initialen Versuchsreihe wurde der Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nach Stimulation mit den natürlichen Liganden (Ang II, ET-1) oder Patienten-IgG untersucht. Der stärkste Aktivierungsgrad trat bei allen eingesetzten Substanzen 10 min nach der Stimulation auf. Diese Kinetik entspricht Beobachtungen von anderen Untersuchern an glatten Muskelzellen. Dabei wurde eine maximale Aktivierung von ERK1/2 durch Ang II nach 10±5 min bei einer eingesetzen Konzentration von 100 nmol/l beschrieben.[76, 77] Zur Stimulation von Endothelzellen und anderen Zelllinien wurden häufig höhere Ang II-Konzentrationen im Bereich 1 µmol/l eingesetzt.[77, 78] Chen et al. fanden in einer aktuellen

Studie zum Zeitverlauf der ERK1/2-Aktivierung nach ET-1 Stimulation in humanen glatten Muskelzellen eine vergleichbare Kinetik wie in der vorliegenden Arbeit.[79]

Die höchste Aktivität der ERK1/2-Kinase konnte mit einer IgG-Konzentration zwischen 2.0 und 2.5 mg/ml erzielt werden. Erstmalig wurde in dieser Arbeit mit IgG-Dosen und nicht mit IgG-Verdünnungen gearbeitet, denn die IgG-Konzentrationen zeigten nach Isolation Variationen zwischen 4 und 9 mg/ml. Ähnliche Ergebnisse konnten Dechend et al. mit aufgereinigtem IgG aus dem Serum von Patientinnen mit Präeklampsie auf die ERK1/2 Phosphorylierung in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen finden. Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe konnten ebenfalls mit isoliertem IgG von Patienten mit refraktärer vaskulärer Nierentransplantatrejektion eine ERK1/2-Aktivierung in glatten Gefäßmuskelzellen nachweisen.[67, 80] Allerdings wurde in diesen Arbeiten mit einheitlichen IgG-Verdünnungen gearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Aktivierung des ERK1/2-Signalweges durch IgG von Patienten mit systemischer Sklerose in humanen Endothelzellen nachgewiesen werden. Mittels eines ELISA-Tests konnten in den isolierten IgG-Fraktionen hohe Titer von aktivierenden Autoantikörpern gegen den AT_1R und ET_AR nachgewiesen werden. Sowohl Dragun et al. als auch Dechend et al. konnten mit Hilfe eines Bioassays hohe Autoantikörpertiter aus isolierten IgG-Fraktionen von Patienten mit Präeklampsie und refraktärer vaskulärer Nierentransplantatrejektion gegen den AT_1R feststellen. [67, 80]

In den finalen Experimenten konnte eine Aktivierung durch das IgG von Patienten mit systemischer Sklerose mittels dem AT_1R-Blocker Valsartan eindeutig reduziert werden. Dagegen beeinflusste die Präinkubation mit dem AT_2R-Blocker PD123,319 die Phosphorylierung von ERK1/2 nicht, sondern führte stattdessen sogar zu einer gesteigerten Phosphorylierung. Ähnliche Ergebnisse konnten auch andere Arbeitsgruppen finden. In humanen Hautfibroblasten beobachteten Liu et al., dass eine Aktivierung des AT_2-Rezeptors zu einer Antagonisierung der über die AT_1R-vermittelten Aktivierungskaskade von PI3/Akt führt. Stimulation der Fibroblasten mit PD123,319 führte zu einer deutlichen Zunahme der Akt Phosphorylierung.[81] In mit dem AT_2R transfizierten, adulten, vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen aus der Ratte konnten die Funktionen des AT_1R eindeutig durch Überexpression des AT_2Rezeptors reduziert werden.[44] Die gefundenen Effekte könnten in dieser Arbeit und auch durch andere Studien auf einen „Crosstalk“ zwischen dem AT_1R und AT_2R hindeuten.

Auch Dragun et al. und Dechend et al. konnten durch anschließende spezifische Rezeptorblockade des AT_1R, die durch Patienten-IgG ausgelöste Aktivierung von ERK1/2 inhibieren. Der AT_2R-Blocker zeigte in diesem Modell ebenfalls keine inhibierenden Effekte auf die Phosphorylierung von ERK1/2.[67, 80]

Erstmalig konnte in Vorstudien unserer Arbeitsgruppe an Material von Patienten mit systemischer Sklerose, hohe Titer von aktivierenden Autoantikörpern gegen den ET_AR mittels ELISA-Test nachgewiesen werden. Die Inhibierung der ERK1/2-Aktivierung durch Einsatz des spezifischen ET_AR-Blockers Sitaxsentan deutet darauf hin, dass die beobachteten Effekte zumindest teilweise über den ET_AR vermittelt werden. Der ET_BR-Blocker BQ788 zeigte dagegen keine Auswirkung auf den Phosphorylierungsgrad.
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erstmalig eine mögliche Beteiligung des ET_AR an der ERK1/2-Aktivierung in Endothelzellen. Der Nachweis von aktivierenden Autoantikörpern gegen den AT_1R und den ET_AR im Serum von Patienten mit systemischer Sklerose deutet auf eine Beteiligung beider Rezeptoren bei der ERK1/2-Aktivierung hin.
In weiteren Experimenten dieser Arbeit wurde die pharmakologische Inhibierung des ERK1/2-Signalweges mittels eines Blockers der Vorläuferkinase MEK1/2 untersucht. Es ist bekannt, dass diese Proteinkinase für die Aktivierung des Signalweges oberhalb von ERK1/2 verantwortlich ist. Servant et al. zeigten, dass durch Blockade von MEK1/2 in glatten Gefäßmuskelzellen die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert werden kann. [82] [83] In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine ERK1/2-Inaktivierung von ca. 80-90 % durch Präinkubation von PD184352 bei einer Konzentration von 500 nmol/ nach Stimulation mit den natürlichen Liganden oder Patienten-IgG. Aus diesen Ergebnissen lässt sich zeigen, dass nach der Aktivierung der Angiotensin II- und Endothelin-1 Rezeptoren, der ERK1/2-Signaltransduktionsweg stark beteiligt ist.

Der Transkriptionsfaktor Ets-1 wird durch Phosphorylierung von ERK2 an Threonin 38 phosphoryliert. Nach der Aktivierung erhöht sich die transkriptionelle Aktivität von Ets-1.[72] Die Phosphorylierung von Ets-1 erfolgt an der Phosphoakzeptorseite über die MAP-Kinase ERK2.[84] ERK1/2-Kinasen vermitteln Signale von Plasmamembran-ständigen Rezeptoren in den Zellkern. Kommt es zur Aktivierung von ERK1/2 durch Phosphorylierung können Teile von ERK2 in den Kern wandern, während Proteinreste der Kinase im Zytoplasma zurückbleiben.[85]
In der vorliegenden Arbeit wurde mittels konfokaler Mikroskopie die Lokalisation der aktiven und der inaktiven Form von Ets-1 in Endothelzellen überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Ets-1 als auch seine phosphorylierte Form basal im Kern exprimiert werden. Die unphosphorylierte Form von Ets-1 konnte im Kern und Zytoplasma sowohl vor als auch nach Stimulation nachgewiesen werden. Vergleichbare Lokalisationen wurden auch von Valter et al. beschrieben.[86] Nach Stimulation mit IgG von Patienten mit systemischer Sklerose liess sich die aktive Form Phospho-Ets-1 nicht nur im Zellkern sondern auch im Zytoplasma nachweisen.

In weitern Untersuchungen wurde die Aktivierung von Ets-1 mittels Western Blot über phosphoryliertes Threonin 38 ([pT38] Ets-1) überprüft. Callaway et al. berichteten, dass die Phosphorylierung von Ets-1 auch über Serin 26 verlaufen kann. Dies tritt jedoch nur nach sehr langen Stimulationszeiten auf oder wenn ERK2 nicht die komplette Phosphorylierung katalysiert.[84]
In der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulationsdauer mit den natürlichen Liganden, Patienten-IgG, Kontroll-IgG und den Rezeptoranatagonisten den Phosphorylierungszeiten von ERK1/2 angepasst und lag bei 10 min. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden von anderen Untersuchern bisher keine Phosphorylierungen an Serin 26 beobachtet. Das Ausmaß der [pT38] Ets-1-Phosphorylierung korrelierte eng mit dem Grad der ERK1/2 Phosphorylierung. Stimulation mit Patienten-IgG führte zu einer deutlich erhöhten Aktivität von [pT38] Ets-1, welche mittels spezifischer Rezeptorblockade durch Valsartan (AT_1R-Blocker) und Sitaxentan (ET_AR-Blocker) gehemmt werden konnte. Die AT_2R- und ET_BR-Blocker hatten dagegen keinen inhibitorischen Einfluß.
Auch der natürliche ET_AR-Ligand ET-1 verursachte eine Aktivierung von Ets-1, welche durch Stimulation mit Ang II nicht ausgelöst werden konnte.
Über eine Aktivierung von Ets-1 in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) durch ET-1 wurde auch von Naito et al. berichtet.[87] Eine Aktivierung von Ets-1 durch Ang II wurde bisher lediglich auf mRNA Basis detektiert.[88]
Die sowohl durch den natürlichen Agonisten ET-1 als auch durch Patienten-IgG auslösbare Aktivierung von Ets-1 ist ein zusätzlicher Hinweis auf einer rezeptoraktivierende Wirkung der im Patientenserum detektierten AT_1RAA und ET_ARAA.

Tissue Factor (TF) ist ein transmembranäres Glykoprotein, welches als essentieller Kofaktor vom Gerinnungsfaktor VII an der Initiierung des extrinsischen Weges der Blutgerinnungskaskade beteiligt ist. TF setzt sich aus drei verschiedenen Domänen zusammen. Neben einer extrazellulären Domäne von 219 Aminosäuren Länge existiert eine einfach transmembranäre Domäne mit einer Länge von 23 Aminosäuren sowie eine zytoplasmatische Domäne mit 21 Aminosäuren Länge.[75] Sowohl die natürlichen Liganden Angiotensin II und Endothelin-1 als auch Patienten-IgG sind in der Lage, Tissue Factor zu aktivieren. Die Aktivierung erfolgt an unterschiedlichen Stellen innerhalb der Zelle. In Membranextrakten konnte eine Expression mit allen Stimulantien nachgewiesen werden. Dagegen war im Zytoplasma eine Aktivierung nur nach Stimulation mit Patienten-IgG vorhanden. Mody et al. konnten zeigen, dass die Mehrzahl der Modifizierungen und potentiellen regulatorischen Mechanismen die zytoplasmatische Domäne von TF betrifft.[75] Somit deutet die verstärkte Expression des zytoplasmatischen Anteils nach Stimulation mit Patienten-IgG auf eine gesteigerte Aktivierung hin.

TF wird basal nicht von Endothelzellen exprimiert. Allerdings kann die Expression in Endothelzellen durch verschiedene Zytokine oder Immunkomplexe wie z.B. IL-6 oder TNF-α induziert werden.[89] In Studien mit Serum von SSc-Patienten konnte eine Aktivierung von TF nachgewiesen werden. Dabei wurden wiederum die Zytokine IL-6 und TNF-α als auslösende und regulatorische Faktoren vermutet, da deren Serumspiegel bei Patienten mit SSc stark erhöht sind.[90, 91] Zudem korrelierten die erhöhten Zytokinspiegel mit dem Grad der systmischen Fibrosierung. So wurden beispielsweise von anderen Untersuchern erhöhte TNF-α-Spiegel im Serum von SSc-Patienten mit dem Auftreten von Lungenfibrose assoziiert.[92] In weiteren *in vitro* Studien konnte außerdem eine gesteigerte TF-Expression nach Stimulation durch aufgereinigtes IgG von Patienten mit verschiedenen Krankheitsentitäten festgestellt werden. So fanden Dechend et al. in glatten Muskelzellen eine erhöhte TF-Expression nach Stimulation mit IgG von präeklamptischen Frauen.[80] Dörfel et al. berichteten über die Aktivierung von TF in Monozyten durch IgG von hypertensiven Patienten.[93]

In weiteren Versuchen wurden Bindungsstudien von Ets-1 mit dem Tissue Factor Promotor durchgeführt. Mit dem Phosphorylierungsgrad von Ets-1 steigt dessen transkriptionelle Aktivität. Alle ETS-Faktoren binden mit ihrer Ets-Domäne an eine Kernnukleotidsequenz „GGAA/T“ eines Promotors. [72] Diese Bindung wurde erstmalig in einer THP-1 Zelllinie nach LPS Stimulation nachgewiesen.[94]

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Bindung (Shift) zwischen der Kernnukleotidsequenz der Tissue Factor Promotor Region und Ets-1 beobachtet werden. Allerdings wurde bis zu diesem Zeitpunkt kein Supershift (Bindung zwischen Ets-1, Kernnukleotidsequenz und Antikörper) mit dem Ets-1 Antikörper erzielt. Es ist aber eindeutig eine schwächere TF-Bande zwischen Kernprotein, Kernnukleotidsequenz und Ets-1 Antikörper erkennbar, was auf einen möglichen Supershift hindeuten könnte. Ein weiteres Indiz einer eindeutigen Kernnukleotidsequenz-Promotor-Bindung stellen in Abbildung 20 die Banden G-H dar. Hier wurde mit einer mutierten Sequenz des TF Promotors gearbeitet und es konnte keine TF-Shiftbande detektiert werden.

Vergleichbare Beobachtungen wurden mit Patienten-IgG von präeklamptischen Patientinnen sowie von Patienten mit refraktärer vaskulärer Nierentransplantatabstoßung gemacht. Durch *in vitro* Stimulation von Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen konnte bei Gelretardationsexperimenten eine Aktivierung von Activator Protein-1 (AP-1) festgestellt werden. [67, 80]

Anhand der erzielten Ergebnisse, werden erste Hinweise auf das Vorhandensein einer Bindung zwischen Kernukleotidsequenz des Transkriptionsfaktors Ets-1 und der Promotorregion des Transmembranen Proteins Tissue Factor gegeben. Aufgrund der

Aktivierung der ERK1/2/Ets-1 Signaltransduktionskaskade kann ein weiterer Hinweis auf die Aktivierung von Tissue Factor durch Patienten-IgG gegeben werden.

In den abschließenden Experimenten wurde die Funktionalität nach Stimulation mit Patienten-IgG auf die Endothelzellproliferation untersucht. Während die natürlichen Liganden die Proliferation nicht beeinflussten, führte Inkubation mit Patienten-IgG zu einer deutlichen Steigerung der Teilungsrate. Diese Wirkung ließ sich durch Präinkubationen mit spezifischen Rezeptorantagonisten oder den Inhibitoren der Vorläuferkinasen Raf-1 und MEK1/2 partiell inhibieren. Ein möglicher Grund für die geringe proliferative Antwort nach Stimulation mit den natürlichen Agonisten könnte die Verwendung einer immortalisierten Zelllinie sein. Verschiedene frühere Studien konnten proliferationssteigernde Effekte durch Angiotensin II und Endothelin-1 bei Zellkulturexperimenten zeigen. Allerdings wurde die Mehrzahl der Expermiente an Primärkulturen und vorrangig an glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) durchgeführt. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass VSMC den AT_1-Rezeptor und die Endothelin-Rezeptoren exprimieren.[95, 96,79] In Endothelzellen konnten ebenfalls Proliferationssteigerungen nach Stimulation mit Endothelin-1 observiert werden.[97, 98] Auch der Einfluss von AT_1- und AT_2-Rezeptorblockern auf die Ang II-induzierte Proliferation wurde an Mesangial,- Epithel- und Endothelzellen getestet. Mit Hilfe der eingesetzten Antagonisten konnte eine Reduktion der Proliferationsrate um bis zu 50 % erzielt werden.[99] Über den Einfluss der ETR-Blocker auf die Zellproliferation existieren nur wenige Daten. Der Raf-1 Inhibitor GW5074 zeigte in den Experimenten ebenfalls eine deutliche Reduktion um ca. 50 % der durch Patienten-IgG ausgelösten Proliferationssteigerung.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass IgG von Patienten mit systemischer Sklerose proliferationssteigernde Signalwege in Endothelzellen aktiviert und dieser durch spezifische Rezeptorantagonisten inhibiert werden können. Damit konnte eine immunologisch bedingte Rezeptoraktivierung als möglicher Pathomechanismus identifiziert werden. Um diese Ergebnisse zu verstärken, könnten in weiterführenden Studien Bindungsexperimente zwischen Ets-1 und dem Tissue Factor Promotor durchgeführt werden, mit Blick auf Rezeptorinhibierungen und die Auswirkungen dieser.
Da die Signale durch Blockierung der ERK1/2 Vorläuferkinasen nicht vollständig inhibierbar sind, wäre es wichtig auch andere Signalwege, die für das Zellüberleben stehen, zu überprüfen.

8 Literaturverzeichnis

1. Maurer B, Walder M, Gay RE, Gay S, Distler O. [Systemic sclerosis. Objectives for the treatment]. Z Rheumatol 2009;68:37-43.
2. Steen VD, Costantino JP, Shapiro AP, Medsger TA, Jr. Outcome of renal crisis in systemic sclerosis: relation to availability of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. Ann Intern Med 1990;113:352-7.
3. Denton CP, Humbert M, Rubin L, Black CM. Bosentan treatment for pulmonary arterial hypertension related to connective tissue disease: a subgroup analysis of the pivotal clinical trials and their open-label extensions. Ann Rheum Dis 2006;65:1336-40.
4. Chifflot H, Fautrel B, Sordet C, Chatelus E, Sibilia J. Incidence and prevalence of systemic sclerosis: a systematic literature review. Semin Arthritis Rheum 2008;37:223-35.
5. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. N Engl J Med 2009;360:1989-2003.
6. Denton CP, Lapadula G, Mouthon L, Muller-Ladner U. Renal complications and scleroderma renal crisis. Rheumatology (Oxford) 2009;48 Suppl 3:iii32-5.
7. Shahin AA. Pulmonary involvement in systemic sclerosis. Treat Respir Med 2006;5:429-36.
8. Abraham D, Distler O. How does endothelial cell injury start? The role of endothelin in systemic sclerosis. Arthritis Res Ther 2007;9 Suppl 2:S2.
9. Guillevin L. Vasculopathy and pulmonary arterial hypertension. Rheumatology (Oxford) 2009;48 Suppl 3:iii54-7.
10. Whitfield ML, Finlay DR, Murray JI, et al. Systemic and cell type-specific gene expression patterns in scleroderma skin. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:12319-24.
11. Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. Thromb Haemost 2004;92:262-74.
12. Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA, et al. Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. Arthritis Rheum 2007;56:4189-94.
13. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. J Physiol 1940;98:283-98.
14. Skeggs LT, Jr., Lentz KE, Kahn JR, Shumway NP, Woods KR. The amino acid sequence of hypertensin. II. J Exp Med 1956;104:193-7.
15. Page IH, Mc CJ, Schwarz H, Bumpus FM. Pharmacologic aspects of synthetic angiotonin. Circ Res 1957;5:552-5.
16. de Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. Pharmacol Rev 2000;52:415-72.
17. Dzau VJ, Baxter JA, Cantin M, et al. Report of the Joint Nomenclature and Standardization Committee of the International Society of Hypertension, American Heart Association and the World Health Organization. J Hypertens 1987;5:507-11.
18. Dzau VJ, Gibbons GH. Autocrine-paracrine mechanisms of vascular myocytes in systemic hypertension. Am J Cardiol 1987;60:99I-103I.
19. Tsai BS, Peach MJ. Angiotensin homologs and analogs as inhibitors of rabbit pulmonary angiotensin-converting enzyme. J Biol Chem 1977;252:4674-81.
20. Schiavone MT, Khosla MC, Ferrario CM. Angiotensin-[1-7]: evidence for novel actions in the brain. J Cardiovasc Pharmacol 1990;16 Suppl 4:S19-24.
21. Ganten D, Schelling P, Vecsei P, Ganten U. Iso-renin of extrarenal origin. "The tissue angiotensinogenase systems". Am J Med 1976;60:760-72.
22. Rosenthal JH, Pfeifle B, Michailov ML, Pschorr J, Jacob IC, Dahlheim H. Investigations of components of the renin-angiotensin system in rat vascular tissue. Hypertension 1984;6:383-90.

23. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 1980;288:373-6.
24. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature 1987;327:524-6.
25. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. Am J Physiol 1985;248:C550-6.
26. Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, O'Brien RF. Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. J Pharmacol Exp Ther 1986;236:339-43.
27. O'Brien RF, Robbins RJ, McMurtry IF. Endothelial cells in culture produce a vasoconstrictor substance. J Cell Physiol 1987;132:263-70.
28. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature 1988;332:411-5.
29. Wright CE, Fozard JR. Regional vasodilation is a prominent feature of the haemodynamic response to endothelin in anaesthetized, spontaneously hypertensive rats. Eur J Pharmacol 1988;155:201-3.
30. Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. FEBS Lett 1988;238:249-52.
31. Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, Yamashita K, Masaki T. A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. J Biol Chem 1989;264:7856-61.
32. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:2863-7.
33. Levin ER. Endothelins. N Engl J Med 1995;333:356-63.
34. Matsuura A, Yamochi W, Hirata K, Kawashima S, Yokoyama M. Stimulatory interaction between vascular endothelial growth factor and endothelin-1 on each gene expression. Hypertension 1998;32:89-95.
35. Yu JC, Pickard JD, Davenport AP. Endothelin ETA receptor expression in human cerebrovascular smooth muscle cells. Br J Pharmacol 1995;116:2441-6.
36. Remuzzi G, Perico N, Benigni A. New therapeutics that antagonize endothelin: promises and frustrations. Nat Rev Drug Discov 2002;1:986-1001.
37. Ji TH, Grossmann M, Ji I. G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. J Biol Chem 1998;273:17299-302.
38. Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. Science 1994;265:1405-12.
39. Sondek J, Bohm A, Lambright DG, Hamm HE, Sigler PB. Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1A resolution. Nature 1996;379:369-74.
40. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. Pharmacol Rev 2000;52:639-72.
41. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. J Clin Invest 1991;88:921-33.
42. Unger T, Chung O, Csikos T, et al. Angiotensin receptors. J Hypertens Suppl 1996;14:S95-103.
43. Zhuo J, Moeller I, Jenkins T, et al. Mapping tissue angiotensin-converting enzyme and angiotensin AT1, AT2 and AT4 receptors. J Hypertens 1998;16:2027-37.
44. Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, et al. The angiotensin II type 2 (AT2) receptor antagonizes the growth effects of the AT1 receptor: gain-of-function study using gene transfer. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92:10663-7.
45. Sakurai T, Yanagisawa M, Masaki T. Molecular characterization of endothelin receptors. Trends Pharmacol Sci 1992;13:103-8.

46. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. Circulation 1994;89:1203-8.
47. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1988;85:9797-800.
48. Masaki T. Historical review: Endothelin. Trends Pharmacol Sci 2004;25:219-24.
49. Adner M, Uddman E, Cardell LO, Edvinsson L. Regional variation in appearance of vascular contractile endothelin-B receptors following organ culture. Cardiovasc Res 1998;37:254-62.
50. Verhaar MC, Strachan FE, Newby DE, et al. Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. Circulation 1998;97:752-6.
51. Dhaun N, Pollock DM, Goddard J, Webb DJ. Selective and mixed endothelin receptor antagonism in cardiovascular disease. Trends Pharmacol Sci 2007;28:573-9.
52. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca2+ channels. J Hypertens Suppl 1988;6:S188-91.
53. Rossi GP, Colonna S, Pavan E, et al. Endothelin-1 and its mRNA in the wall layers of human arteries ex vivo. Circulation 1999;99:1147-55.
54. Rubens C, Ewert R, Halank M, et al. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. Chest 2001;120:1562-9.
55. Kabunga P, Coghlan G. Endothelin receptor antagonism: role in the treatment of pulmonary arterial hypertension related to scleroderma. Drugs 2008;68:1635-45.
56. Koh ET, Lee P, Gladman DD, Abu-Shakra M. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis: an analysis of 17 patients. Br J Rheumatol 1996;35:989-93.
57. Schneider MP, Boesen EI, Pollock DM. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:731-59.
58. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. Life Sci 1992;50:247-55.
59. Ishikawa K, Ihara M, Noguchi K, et al. Biochemical and pharmacological profile of a potent and selective endothelin B-receptor antagonist, BQ-788. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:4892-6.
60. Williamson DJ, Wallman LL, Jones R, et al. Hemodynamic effects of Bosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with pulmonary hypertension. Circulation 2000;102:411-8.
61. Givertz MM, Colucci WS, LeJemtel TH, et al. Acute endothelin A receptor blockade causes selective pulmonary vasodilation in patients with chronic heart failure. Circulation 2000;101:2922-7.
62. Papadea C, Check IJ. Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. Crit Rev Clin Lab Sci 1989;27:27-58.
63. Wallukat G, Homuth V, Fischer T, et al. Patients with preeclampsia develop agonistic autoantibodies against the angiotensin AT1 receptor. J Clin Invest 1999;103:945-52.
64. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. Science 2005;308:1592-4.
65. Granger JP, Alexander BT, Llinas MT, Bennett WA, Khalil RA. Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction. Hypertension 2001;38:718-22.
66. Mellor AL, Munn DH. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. Annu Rev Immunol 2000;18:367-91.
67. Dragun D, Muller DN, Brasen JH, et al. Angiotensin II type 1-receptor activating antibodies in renal-allograft rejection. N Engl J Med 2005;352:558-69.
68. Yamamoto T, Takahashi Y, Kuno S, Geshi Y, Sasamori Y, Mori H. Effects of anti-endothelial cell antibody in pre-eclampsia on endothelin-1 release from cultured endothelial cells. Immunol Cell Biol 1997;75:340-4.

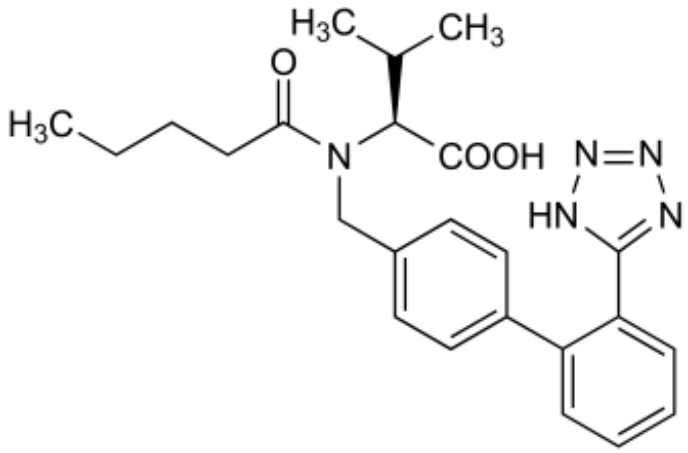
69. Yoshio T, Masuyama J, Mimori A, Takeda A, Minota S, Kano S. Endothelin-1 release from cultured endothelial cells induced by sera from patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis 1995;54:361-5.
70. Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, et al. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. J Invest Dermatol 1992;99:683-90.
71. Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. Trends Cell Biol 1997;7:353-61.
72. Oettgen P. Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors. Circ Res 2006;99:1159-66.
73. Bach RR. Initiation of coagulation by tissue factor. CRC Crit Rev Biochem 1988;23:339-68.
74. Bloem LJ, Chen L, Konigsberg WH, Bach R. Serum stimulation of quiescent human fibroblasts induces the synthesis of tissue factor mRNA followed by the appearance of tissue factor antigen and procoagulant activity. J Cell Physiol 1989;139:418-23.
75. Mody RS, Carson SD. Tissue factor cytoplasmic domain peptide is multiply phosphorylated in vitro. Biochemistry 1997;36:7869-75.
76. Anandanadesan R, Gong Q, Chipitsyna G, Witkiewicz A, Yeo CJ, Arafat HA. Angiotensin II induces vascular endothelial growth factor in pancreatic cancer cells through an angiotensin II type 1 receptor and ERK1/2 signaling. J Gastrointest Surg 2008;12:57-66.
77. Nie W, Yan H, Li S, et al. Angiotensin-(1-7) enhances angiotensin II induced phosphorylation of ERK1/2 in mouse bone marrow-derived dendritic cells. Mol Immunol 2009;46:355-61.
78. Sampaio WO, Henrique de Castro C, Santos RA, Schiffrin EL, Touyz RM. Angiotensin-(1-7) counterregulates angiotensin II signaling in human endothelial cells. Hypertension 2007;50:1093-8.
79. Chen QW, Edvinsson L, Xu CB. Role of ERK/MAPK in endothelin receptor signaling in human aortic smooth muscle cells. BMC Cell Biol 2009;10:52.
80. Dechend R, Homuth V, Wallukat G, et al. AT(1) receptor agonistic antibodies from preeclamptic patients cause vascular cells to express tissue factor. Circulation 2000;101:2382-7.
81. Liu HW, Cheng B, Yu WL, et al. Angiotensin II regulates phosphoinositide 3 kinase/Akt cascade via a negative crosstalk between AT1 and AT2 receptors in skin fibroblasts of human hypertrophic scars. Life Sci 2006;79:475-83.
82. Servant MJ, Giasson E, Meloche S. Inhibition of growth factor-induced protein synthesis by a selective MEK inhibitor in aortic smooth muscle cells. J Biol Chem 1996;271:16047-52.
83. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. Biochem J 2000;351:95-105.
84. Callaway KA, Rainey MA, Riggs AF, Abramczyk O, Dalby KN. Properties and regulation of a transiently assembled ERK2.Ets-1 signaling complex. Biochemistry 2006;45:13719-33.
85. Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. EMBO J 1997;16:1901-8.
86. Valter MM, Hugel A, Huang HJ, et al. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. Cancer Res 1999;59:5608-14.
87. Naito S, Shimizu S, Maeda S, Wang J, Paul R, Fagin JA. Ets-1 is an early response gene activated by ET-1 and PDGF-BB in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1998;274:C472-80.
88. Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Wang JW, et al. Regulated expression of the ets-1 transcription factor in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. Circ Res 1996;78:589-95.

89. Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. Am J Pathol 1989;134:1087-97.
90. Gourh P, Arnett FC, Assassi S, et al. Plasma cytokine profiles in systemic sclerosis: associations with autoantibody subsets and clinical manifestations. Arthritis Res Ther 2009;11:R147.
91. Sfrent-Cornateanu R, Mihai C, Balan S, Ionescu R, Moldoveanu E. The IL-6 promoter polymorphism is associated with disease activity and disability in systemic sclerosis. J Cell Mol Med 2006;10:955-9.
92. Hasegawa M, Sato S, Nagaoka T, Fujimoto M, Takehara K. Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin-13 are elevated in patients with localized scleroderma. Dermatology 2003;207:141-7.
93. Dorffel Y, Wallukat G, Bochnig N, et al. Agonistic AT(1) receptor autoantibodies and monocyte stimulation in hypertensive patients. Am J Hypertens 2003;16:827-33.
94. Groupp ER, Donovan-Peluso M. Lipopolysaccharide induction of THP-1 cells activates binding of c-Jun, Ets, and Egr-1 to the tissue factor promoter. J Biol Chem 1996;271:12423-30.
95. Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. Am J Hypertens 2000;13:31S-8S.
96. Marrero MB, Schieffer B, Li B, Sun J, Harp JB, Ling BN. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription and mitogen-activated protein kinase cascades in angiotensin II- and platelet-derived growth factor-induced vascular smooth muscle cell proliferation. J Biol Chem 1997;272:24684-90.
97. Dong F, Zhang X, Wold LE, Ren Q, Zhang Z, Ren J. Endothelin-1 enhances oxidative stress, cell proliferation and reduces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of ETB receptor, NADPH oxidase and caveolin-1. Br J Pharmacol 2005;145:323-33.
98. Kuhlmann CR, Most AK, Li F, et al. Endothelin-1-induced proliferation of human endothelial cells depends on activation of K+ channels and Ca+ influx. Acta Physiol Scand 2005;183:161-9.
99. Efrati S, Berman S, Goldfinger N, et al. Enhanced angiotensin II production by renal mesangium is responsible for apoptosis/proliferation of endothelial and epithelial cells in a model of malignant hypertension. J Hypertens 2007;25:1041-52.

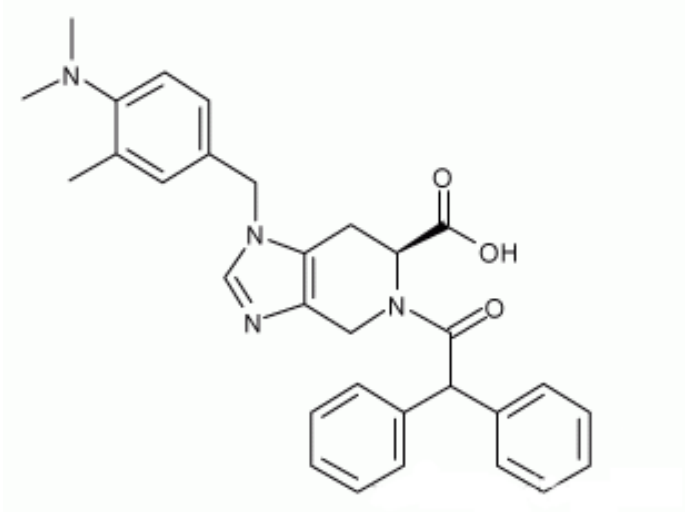
9 Anhang

9.1 Angiotensin II Rezeptorblocker

Angiotensin II Typ 1 Rezeptorblocker = Valsartan

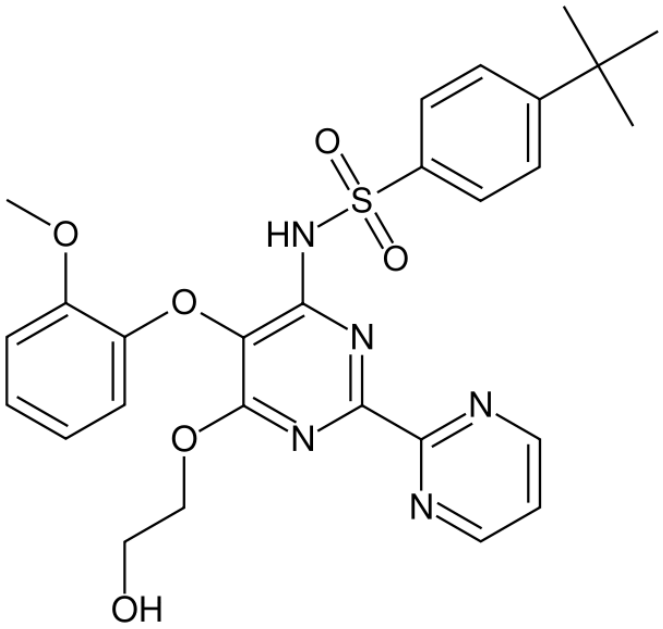


Angiotensin II Typ 2 Rezeptorblocker = PD123,319

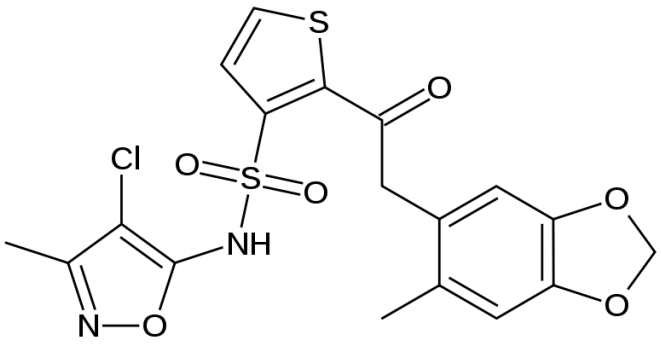


9.2 Endothelin-1 Rezeptorblocker

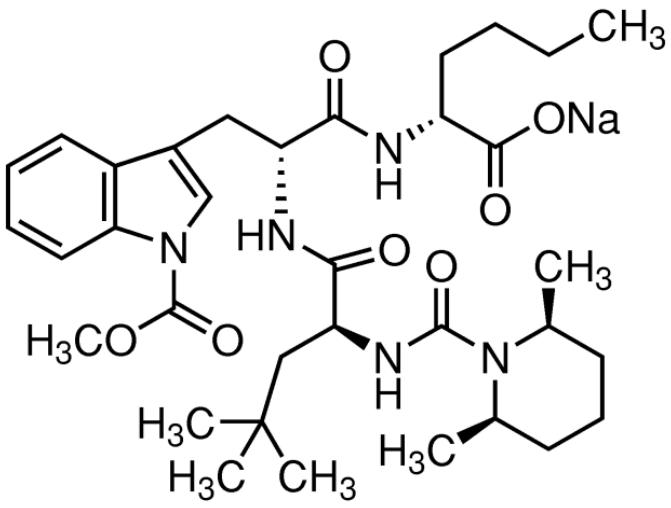
Endothelin-1 Typ A/Typ B Rezeptor = Bosentan



Endothelin-1 Typ A Rezeptor = Sitaxsentan

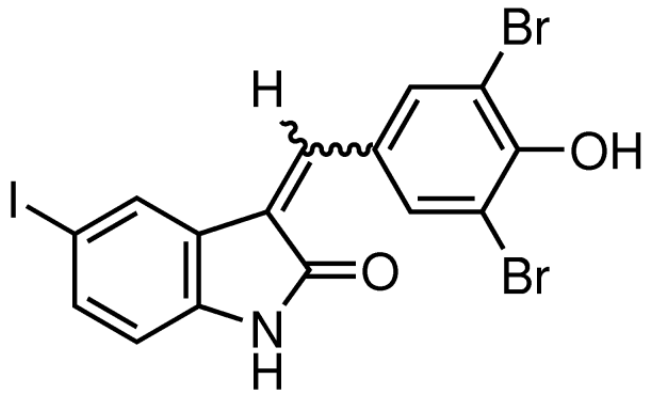


Endothelin-1 Typ B Rezeptor = BQ788



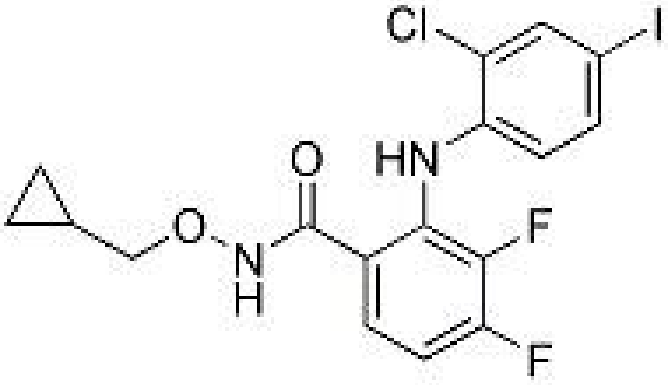
9.3 Raf-Inhibitor

GW5074



9.4 MEK1/2-Inhibitor

PD184,352



10 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Frau Prof. Dr. Duska Dragun für die Bereitstellung des Themas, ihrer fachlichen Diskussionsbereitschaft und ihr Vertrauen, welches sie in mich gesetzt hat. Prof. Dr. Roderich Süßmuth danke ich für die Berichterstattung an die Technische Universität Berlin und das offene Ohr für diverse Fragen.
Carsten Lindschau danke ich für die mikroskopischen Aufnahmen und die Unterstützung in der Auswertung. Der Firma Celltrend und besonders Dr. rer. nat. Harald Heidecke danke ich für die schnelle Bestimmung der Patiententiter.
Meinen Kollegen, die mich in allen Situationen hilfreich unterstützt haben, möchte ich danken. Besonders PhD Aurélie Philippe möchte ich für ihre ständige Mühe und Unterstützung danken, aber auch Dr. med. Uwe Hoff und Dr. med. Björn Hegner bin für jegliche medizinische Fachfragen und auch allem anderen, was uns so verbunden hat in den letzten fünf Jahren, dankbar. Dennis Gürgen, mein längster Bekannter aus dieser Arbeitsgruppe möchte ich für die stete Diskussionsbereitschaft und auch die oft lustigen Gespräche danken. Ein großer Dank gilt selbstverständlich auch Dr. rer. nat. Rusan Catar, der immer ein offenes Ohr hatte und mir in jeder Fragestellung Hilfe geben konnte. Dr. med. Angelika Kusch möchte ich für den Rat und Beistand danken, sowie Marc Eigen und Chantel Spencer-Hänsch für die Übernahme diverser experimentelle Hilfestellungen und ohne die ich manchmal nicht mehr weiter gewusst hätte.
Ein besonderer Dank gilt aber meinen Freunden. Und jeder Einzelne weiß sich an dieser Stelle angesprochen! Besonders zu erwähnen sind aber meine beiden Sabine-Freundinnen, die mich schon durchs Studium begleitet haben und mit denen ich so manch prikäre Situation durchgestanden hab. Aber auch Katarina und Kati sind immer für mich dagewesen, egal, wie meine Lage gerade war. **Es ist so schön, dass es Euch gibt!**
Mein besonderer Dank gilt meiner Mama und Jürgen, die mich in allen Situationen unterstützt haben und immer, auch wenn es manchmal nicht leicht war, an mich glaubten. Mein Papa ist nicht zu vergessen, der auch aus der Ferne nie aufhören wird an mich zu glauben!
Ohne die unendliche Energie eines Menschen wäre dieses Schriftstück nicht in dieser Zeit entstanden und auch dafür möchte ich mich bei Dir, Florian, bedanken! Es ist das Beste, Dich an meiner Seite zu haben!

11 Veröffentlichungen

11.1 Publikation

T. Florian Fuller, Uwe Hoff, Linghua Kong, **Melanie Naether**, Philine Wagner, Melina Nieminen-Kelhä, Jochen Nolting , Friedrich C. Luft, Björn Hegner, Duska Dragun
CYTOPROTECTIVE ACTIONS OF FTY720 MODULATE SEVERE PRESERVATION REPERFUSION INJURY IN RAT RENAL TRANSPLANTS
Transplantation (in press)

11.2 Kongressbeiträge

Philippe Aurélie, **Naether Melanie**, Catar Rusan, Riemekasten Gabriela and Dragun Duska
Synergy of agonistic autoantibodies targeting ET_A- and AT_1 receptors in systemic sclerosis patients.
Keystone, G Protein-Coupled Receptors, 07.–12.04.2010, Breckenridge, Colorado

Melanie Naether, Aurélie Philippe, Rusan Catar, Ivo Lukitsch, Gabriela Riemekasten, Duska Dragun
Signaling induced by endogenous ligand independent autoimmune activation of Angiotensin type 1- and Endothelin Type A-receptor in microvascular endothelial cells
1st systemic sclerosis world congress, 11.-13.02.10 Florenz, Italien

Catar R, Kretzschmar T, **Naether M**, Philippe A, Wagner P, Luft FC, Riemekasten G, Dragun D (2010)
Agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1 receptors act synergistically in systemic sclerosis patients
1st systemic sclerosis world congress, 11.-13.02.10 Florenz, Italien

Hegner B, Catar R, Kusch A, Essin K, **Naether M**, Gollasch M, Riemekasten G, Dragun D
Differentation responses of bone marrow derived mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients to pro-fibrotic cytokines
1st systemic sclerosis world congress, 11.-13.02.10 Florenz, Italien

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

Melanie Naether, Aurélie Philippe, Rusan Catar, Ivo Lukitsch, Gabriela Riemekasten, Duska Dragun
Signaling induced by endogenous ligand independent autoimmune activation of Angiotensin type 1- and Endothelin Type A-receptor in microvascular endothelial cells
Signal Transduction and Disease, Trinational Fall Meeting of the Biochemical Societies, 27.-30.09.2009 Aachen, Deutschland

Duska Dragun, **Melanie Naether**, Dominik N. Müller, Ulrich Frei, Harald Heidecke, FriedrichC. Luft, Maik Gollasch, Gabriela Riemekasten
Activating AT1R and ETAR autoantibodies serve as biomarkers and link autoimmunity and vasculopathy in systemic sclerosis
ET-11: APS International Conference on Endothelin, 9.-12.09.09 Montreal, Canada

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

R. Catar; T. Kretzschmar ; **M. Näther**; A. Philippe; P. Wagner; F. C. Luft; G. Riemekasten; D. Dragun
Agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1-receptors act synergistically in systemic sclerosis patients
Kongress für Nephrologie 2009, 26.-29.09 Göttingen, Deutschland

R. Catar; T. Kretzschmar ; **M. Näther**; A. Philippe; P. Wagner; F. C. Luft; G. Riemekasten; D. Dragun
Agonistic autoantibodies targeting ETA- and AT1-receptors act synergistically in systemic sclerosis patients
Jahrestagung der Gesellschaft für Kinder- und *Jugendrheumatologie* e.V. 2009, 23.-26.09.09 Köln, Deutschland