

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Diagnostik

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Thomas Renné

„Nachweis, Lokalisation und Funktion von Polyphosphat im Endothel“

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Björn Formella

geboren: 27.11.1989 in Rostock

Hamburg Juli 2022

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 12.01.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. Florian Langer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Thomas Renné

Inhaltsverzeichnis

Arbeitshypothese und Fragestellung.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Polyphosphat und zelluläre Funktionen	1
1.2 Einfluss von Polyphosphat auf die Gerinnung und Inflammation	2
1.3 XPR1-assoziierte humane Erkrankungen.....	5
1.4 Ziele dieser Doktorarbeit	8
2 Methoden und Material	9
2.1 Methoden	9
2.1.1 Zellkultur	9
2.1.2 Polyphosphatextraktion.....	10
2.1.3 Urea-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese	12
2.1.4 <i>Malachite Green Assay</i>	13
2.1.5 Immunofluoreszenzfärbung von Endothelzellen	13
2.1.6 <i>Small-interfering ribonucleic acid in vitro</i> Transfektion.....	14
2.1.7 <i>Messenger-RNA</i> Extraktion.....	15
2.1.8 Reverse Transkription	16
2.1.9 <i>Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>	16
2.2 Material	17
Tabelle 2.2: Nährmedien.....	17
Tabelle 2.3: Zellkultur.....	17
Tabelle 2.4: Reagenzien und Chemikalien.....	18
Tabelle 2.5: Antikörper/TaqMan-Proben und Immunfluoreszenz.....	19
Tabelle 2.6: Kits	20
Tabelle 2.7: Verbrauchsmaterial	20
Tabelle 2.8: Geräte	22
Tabelle 2.9: Software	22
Tabelle 2.10: Hergestellte Lösungen.....	22
3 Resultate	24
3.1 Nachweis von PolyP in Endothelzellen.....	24
3.1.1 <i>Malachite Green Assay</i> und Urea-PAGE	24
3.1.2 <i>In situ</i> Nachweis durch Immunfluoreszenz	29
3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von PolyP in Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz	32
3.2 Auswirkungen der siRNA-vermittelten Deletion von <i>XPR1</i>	34
4 Diskussion	40
5 Zusammenfassung	49

5.1 Abstract.....	50
6 Abkürzungsverzeichnis.....	52
7 Literaturverzeichnis.....	55
8 Danksagung.....	61
9 Lebenslauf.....	62
10 Eidesstattliche Erklärung.....	63

Liste der Abbildungen

Abbildung 1.1	Strukturformel von PolyP	2
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung von PolyP-regulierten Signalwegen	5
Abbildung 1.3	Schemazeichnung der Interaktion von SLC20A2 und XPR1.....	7
Abbildung 3.1	Quantitative Bestimmung von PolyP der EAhy926 im <i>Malachite Green Assay</i>	25
Abbildung 3.2	Störfaktoren in der Urea-PAGE	26
Abbildung 3.3	Urea-PAGE von EAhy926-PolyP nach Extraktion durch Anionenaustauscherharz	27
Abbildung 3.4	Urea-PAGE von EAhy926-PolyP nach Extraktion durch Phenol-Chloroform-Aufreinigung	28
Abbildung 3.5	Urea-PAGE von b.End3-PolyP nach Extraktion durch Anionenaustauscherharz	29
Abbildung 3.6	Kompetitive Hemmung von PPX_Δ1,2 mittels P70	30
Abbildung 3.7	Fluoreszenzmikroskopie mittels PPX_Δ1,2, MitoTracker und DAPI von b.End3	31
Abbildung 3.8	Anreicherung von PPX_Δ1,2 in den Nuclei von EAhy926	32
Abbildung 3.9	Anreicherung von PPX_Δ1,2 in den Nuclei und den Mitochondrien von HUVECs	33
Abbildung 3.10	Retention von PolyP intrazellulär bei EAhy926 nach siXPR1-Transfektion in der Urea-PAGE	35
Abbildung 3.11	Hochregulierung von Proliferationsmarkern bei XPR1- <i>Knockdown</i> mittels siRNA in HUVECs	36
Abbildung 3.12	Zellkontakte von HUVECs mittels VE-Cadherin nach siXPR1-Transfektion	37
Abbildung 3.13	VWF-Expression nach siXPR1-Transfektion von HUVECs.....	38
Abbildung 3.14	PolyP-Staining mittels HIS-Tag-Antikörper bei HUVECs.....	39

Liste der Tabellen

Tabelle 2.1	Inkubationsparameter für Endothelzellen.....	9
Tabelle 2.2	Nährmedien.....	17
Tabelle 2.3	Zellkultur.....	17
Tabelle 2.4	Reagenzien und Chemikalien.....	18
Tabelle 2.5	Antikörper/TaqMan-Proben und Immunfluoreszenz.....	19
Tabelle 2.6	Kits.....	20
Tabelle 2.7	Verbrauchsmaterial.....	20
Tabelle 2.8	Geräte.....	22
Tabelle 2.9	Software.....	22
Tabelle 2.10	Hergestellte Lösungen.....	22
Tabelle 3.1	Ausgetestete Methoden für störungsfreie PolyP Urea-PAGE und effiziente PolyP-Aufreinigung.....	26

Arbeitshypothese und Fragestellung

Anorganisches Polyphosphat (PolyP) ist ein ubiquitär vorkommendes Polymer, bestehend aus Orthophosphaten mit energiereichen Phosphoanhydridbindungen. Die zellulären Funktionen von PolyP sind zahlreich. Neuere Arbeiten zeigen, dass gespeichertes PolyP in den dichten Granulationen von humanen Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Gerinnung spielt. Auch Endothelzellen, welche die innere Zellschicht aller Gefäße bilden, enthalten PolyP. Jedoch ist die Funktion von PolyP im Endothel kaum untersucht. Einige Arbeiten beschreiben den Einfluss von exogenem PolyP auf Zellmetabolismus und Proliferation. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit soll jedoch das Vorkommen und mögliche zelluläre Funktionen von endogenem PolyP in verschiedenen murinen und humanen Endothelzelllinien sowie in primären humanen Endothelzellen untersucht werden. Initial soll hierbei die Menge an PolyP (semi-) quantitativ mittels *Malachite Green Assay* und Urea-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese (Urea-PAGE) sowie die subzelluläre Lokalisation von PolyP mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

Der *Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1 (XPR1)* ist ein Phosphattransporter, welcher in humanen Zellen, wie *Human Embryonic Kidney*-Zellen, Hepatozyten, T-Lymphozyten und auch Endothelzellen für den Transport von anorganischem Phosphat aus den Zellen verantwortlich ist. Unsere Arbeitsgruppe konnte nun zeigen, dass *XPR1*-Expression den PolyP-Gehalt in Thrombozyten reguliert. In *XPR1* siRNA-basierten Zellkulturexperimenten soll analysiert werden, ob ähnliche Regulationsmechanismen für PolyP in Endothelzellen existieren. Funktionale Analysen nach PolyP-Modulation, mit einem Fokus auf endotheliale Proliferation und Zellkontakte, sollen erste Hinweise zu PolyP-vermittelten zellulären Mechanismen liefern.

1 Einleitung

1.1 Polyphosphat und zelluläre Funktionen

Polyphosphat (PolyP) ist ein anorganisches, lineares, negativ geladenes Polymer aus Orthophosphaten, welche durch energiereiche Phosphoanhydridbindungen verknüpft sind, ähnlich wie bei Adenosintriphosphat (ATP) (Abbildung 1.1) (Hassanian et al., 2015, Ruiz et al., 2004). Das *low-molecular-weight* PolyP wird mit wenigen Orthophosphatgruppen vom *high-molecular-weight* (HMW) PolyP mit über 1000 Phosphaten unterschieden. Das HMW PolyP dient als tatsächlicher Speicher von PolyP (Kulaev, 1975, Mailer et al., 2019). Bereits 1888 beschrieb erstmals Leo Liebermann PolyP in *Saccharomyces cerevisiae* als essentiellen Energiespeicher (Liebermann, 1888). Einige Bakterien wie *Acinetobacter johnsonii* und Parasiten wie *Trypanosoma cruzi* haben bis zu 30% ihres Trockenzellgewichts in den Acidocalcisomen, die als Granulation einen Speicher für PolyP und Kalzium darstellen (Mailer et al., 2021).

In Bakterien und Hefen wurden Enzyme identifiziert, die PolyP intrazellulär synthetisieren und verstoffwechseln. In *Escherichia coli* (*E. coli*) synthetisiert das Enzym Polyphosphatkinase (PPK) PolyP aus ATP ($n\text{ATP} \rightleftharpoons n\text{ADP} + \text{PolyP}_n$), während die Exopolyphosphatase aus *E. coli* (PPX) selektiv Orthophosphate von den Enden der PolyP-Ketten hydrolysiert. Die alkalische Phosphatase der Bakterien hat hingegen vorwiegend ATP als Substrat (Akiyama et al., 1993).

Im Gegensatz zu Bakterien und Hefen ist in Säugetierzellen bisher wenig über die Synthese und Verstoffwechslung von PolyP bekannt (Mailer et al., 2019). Es finden sich Speichergranulationen in Thrombozyten, Mastzellen und auch in Tumorzellen (Ruiz et al., 2004, Verhoef et al., 2017, Moreno-Sanchez et al., 2012, Nickel et al., 2015). Zum Beispiel zeigen Malignome erhöhte PolyP-Gehalte in den Tumorzellen (Kulakovskaya et al., 2018, Jimenez-Nuñez et al., 2012). Anhand der Kettenlänge kann unterschieden werden, welche möglichen Funktionen PolyP in höheren Organismen haben kann. Langkettiges PolyP aus infektiösen Mikroorganismen ist zum Beispiel ein kompetenter Aktivator des Kontaktsystems der Blutgerinnung (Morrissey et al., 2012). Mittellanges PolyP, welches aus aktivierten Thrombozyten sekretiert wird, beschleunigt die Aktivierung des Faktor V, hebt die Gerinnungshemmung des Gewebefaktor-Inhibitors auf, stabilisiert das Fibrinkoagulat und beschleunigt die Aktivierung von Faktor XI durch Thrombin *in vitro* (Morrissey et al., 2012). Neben der Regulation der Blutgerinnung und der Immunantwort (Abschnitt 1.2), spielt PolyP ebenso eine wichtige Rolle bei der Regulation von Mitochondrien (Angelova et al., 2016). Ein wesentlicher Faktor der Schädigung der Kardiomyozyten beim Myokardinfarkt entsteht durch die exzessive Akkumulation von Kalzium in den Zellen. Da

eine Kalzium-abhängige Öffnung der inneren Mitochondrienpermeabilitätsübergangspore (mPTP) erfolgt, sorgen dauerhaft erhöhte Kalziumspiegel zu einer gesteigerten Permeabilisierung und somit zu einer Unterbrechung der ATP-Produktion durch Abbau des Membranpotentials (Seidlmayer et al., 2012). PolyP kann die Homöostase des Kalziums in den Mitochondrien beeinträchtigen und sorgt vermutlich durch die Bildung stabiler Komplexe mit Kalzium für eine Beeinträchtigung der mPTP und somit zu einer Dysfunktion der Mitochondrien, was wiederum zum Zelltod führen kann (Seidlmayer et al., 2012). Zudem dient PolyP als Gliotransmitter in Astrozyten über die Aktivierung des Purinrezeptors P2Y1 mit Stimulation der Phospholipase C (Angelova et al., 2016).

Bei *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs), welche auf einer verfestigten Basalmembran-Extraktmatrix ausgesät wurden, wurde bereits gezeigt, dass exogenes PolyP die Bildung eines Lumens beschleunigt. Zudem stiegen die ATP-Spiegel im Kulturmedium der Zellen nach Zugabe von PolyP deutlich an (Müller et al., 2018). Exogenes PolyP kann sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* die Kinase *Mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) verstärkt aktivieren, welche durch Autophosphorylierung sowie Phosphorylierung seines Substrates PHAS-I die intrazellulären Signalkaskaden der Zellproliferation beeinflussen kann (Wang et al., 2003). Durch die mTOR-abhängige Phosphorylierung von PHAS-I und den *Eucaryotic Translation Initiation Factor* 4E (eIF4E) wird Zellwachstum und die Proliferation aktiviert. Durch die Aktivierung des mTORC2 wird auch die Permeabilität von Endothelzellkontakten erhöht (Hassanian et al., 2015).

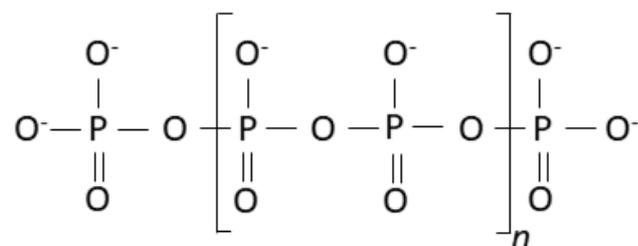


Abbildung 1.1 Strukturformel von PolyP

Das anorganische Polyphosphat ist ein negativ geladenes Polymer, bestehend aus wenigen, bis hin zu mehreren hundert (siehe n in der Abbildung) Orthophosphaten. Die Bindungen bestehen aus energiereichen Phosphoanhydridbindungen, wie sie auch bei ATP auftreten.

1.2 Einfluss von Polyphosphat auf die Gerinnung und Inflammation

Anorganisches PolyP kann die Gerinnungskaskade regulieren und die Koagulation beeinflussen. Aktivierte Thrombozyten sekretieren PolyP aus dichten Granula auf ihre Oberfläche, wo membrangebundenes PolyP mit divalenten Metallionen unlösliche, kugelförmige Nanopartikel bildet, die als kompetenter Aktivator der intrinsischen Gerinnung über Gerinnungsfaktor XII (FXII) fungieren (Abbildung 1.2) (Verhoef et al., 2017). Zudem

verbessert PolyP die Bindung von Thrombozyten an den Von-Willebrand-Faktor (VWF) (Montilla et al., 2012). *In vitro* können zusätzlich Thrombosen durch eine Stabilisierung des Fibrinclots (Smith and Morrissey, 2008) sowie eine verzögerte Lyse des Koagulats, durch die verstärkte Aktivierung eines Antifibrinolytikums, begünstigt werden (Smith et al., 2006). Auch eine beschleunigte Aktivierung des Gerinnungsfaktors V und die Aufhebung der Wirkung des gerinnungshemmenden Proteins Gewebefaktor-Inhibitor sorgen für eine verstärkte Gerinnung (Smith et al., 2006).

FXII aktiviert außerdem den klassischen Weg des Komplementsystems und PolyP kann direkten Einfluss auf die Inflammation nehmen (Ghebrehiwet et al., 1981). FXII aktiviert über das Kallikrein-Kinin-System das *high-molecular-weight Kininogen* (HMWK), aus welchem der proinflammatorische Mediator Bradykinin enzymatisch abgespalten wird (Abbildung 1.2) (Müller and Renné, 2008). Letztendlich begünstigt PolyP über die Aktivierung des Bradykinins unter anderem eine Dysfunktion von Mikrogefäßen. In FXII-defizienten Mäusen kann jedoch durch das Fehlen des Faktors substituiertes PolyP kein Angioödem induzieren (Björkqvist et al., 2013). Das Generieren von Bradykinin durch das Kallikrein-Kinin-System wird durch den C1-Esterase-Inhibitor (C1INH) reguliert (Müller and Renné, 2008). Ein Mangel an C1INH erhöht die FXII- sowie Plasmakallikrein-Aktivität, als Initiatoren der Reaktion und sorgt über die Freisetzung des Bradykinins sowie einer Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität. Dieses ist auch die Ursache des hereditären Angioödems (Renne, 2012). Bei C1INH-defizienten Mäusen verstärkt PolyP die Entstehung eines solchen Ödems (Björkqvist et al., 2013).

C1INH ist der einzig bekannte Inhibitor der Serin-Protease C1s und somit entscheidender Regulator der Komplementaktivierung, denn C1s stellt den Initiator der klassischen Aktivierung des Komplementsystems dar (Wijeyewickrema et al., 2016). Interessanterweise dient PolyP auch als Ko-Faktor für C1INH und verstärkt die Bindung dieses Serpins an C1s. Somit dämpft PolyP auch die C1s-getriggerte Aktivierung des klassischen Komplementsystems (Wijeyewickrema et al., 2016).

Mastzellen, als Untergruppe der Leukozyten und wichtige Zellen des Immunsystems, besitzen Granula, die vergleichbar sind mit den Acidocalcisomen aus beispielsweise *Acinetobacter johnsonii* und *Trypanosoma cruzi* (Docampo and Moreno, 2011, Mailer et al., 2021). PolyP zeigt Ko-Lokalisationen mit serotoninhaltigen, jedoch nicht mit histaminhaltigen Granula der Mastzellen. Es wurde gezeigt, dass bei Aktivierung dieser Zellen durch Immunglobulin E der intrazelluläre Gehalt an PolyP deutlich abnimmt. Somit lässt sich vermuten, dass durch die Sekretion das Mastzellen-PolyP an proinflammatorischen und pro-koagulatorischen Mechanismen beteiligt ist (Moreno-Sanchez et al., 2012).

Aufgrund der mit Hilfe von PolyP-vermittelten Regulation von Gerinnung und Entzündung durch den Einfluss von FXII, wurde die PolyP-FXII-Achse als potentielles therapeutisches Target vorgeschlagen, um erfolgreich antithrombotisch ohne Blutungskomplikationen zu therapieren (Labberton et al., 2016, Müller et al., 2009, Travers et al., 2014). Bei Malignomen ist eine der häufigsten Komplikationen das Auftreten von Thromboembolien und bedingt die zweithäufigste Todesursache dieser Patientengruppen. Präventiv werden zur Prophylaxe *low-molecular-weight* Heparin oder Vitamin K-Antagonisten verwendet, jedoch mit der erheblichen Gefahr von Blutungskomplikationen. Bei prostatakarzinom-bedingten Thromboembolien spielt PolyP eine Rolle bei der Aktivierung der intrinsischen Gerinnung. Denn Prostatakarzinomzellen und Prostatasomen setzen langkettiges PolyP auf ihrer Oberfläche frei, wodurch FXII-getriebene Gerinnung aktiviert wird und Koagel begünstigt werden (Nickel et al., 2016). Bei FXII-defizienten Menschen und Mäusen hingegen wurde keine Beeinträchtigung der Hämostase mit Blutungskomplikationen aufgezeigt (Nickel et al., 2015). Mittels neutralisierender FXII-Antikörper können Thromboembolien verhindert werden, ohne das Blutungsrisiko zu erhöhen (Kenne et al., 2015). Zusammenfassend scheint der PolyP-FXII-Signalweg als ein mögliches therapeutisches Target bei onkologischen Patienten zur Vermeidung schwerwiegender venöser Thromboembolien zu dienen, ohne hierbei das Auftreten erhöhter Blutungskomplikationen zu begünstigen (Nickel et al., 2016).

Neuere Arbeiten zeigen, dass *Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1* (XPR1) in Säugetierzellen den Export von Phosphat bedingt und somit die Homöostase von endogenem Phosphat reguliert. In Thrombozyten beeinflusst XPR1 auch den Gehalt von endogenem PolyP durch den Export von Phosphat (Mailer et al., 2021). Es erfolgte hierbei bereits ein Nachweis darüber, dass sich bei Thrombozyten die Expression von *XPR1* umgekehrt proportional zum intrazellulären Gehalt von PolyP verhält. In *XPR1*-defizienten Thrombozyten findet sich ein erhöhter Gehalt von PolyP in den dichten Granulationen dieser Thrombozyten, was letztlich bei einer Aktivierung zu einer Steigerung der Koagulation und verstärkter Thrombusbildung führt (Mailer et al., 2021). In humanen Zellen wird XPR1 unter anderem durch die zwei Mitglieder der Inositol-Pyrophosphat (PP-InsP) - Familie *1,5-Bis-Diphosphoinositol 2,3,4,6-Tetrakisphosphate* (InsP₈) und *5-Diphosphoinositol 1,2,3,4,6-Pentakisphosphate* (InsP₇) (Hauptform von InsP₇) reguliert (Abbildung 1.3) (Li et al., 2020).

Factor-BB (PDGFB) und *XPR1* (Ramos et al., 2018, Mathorne et al., 2019). *SLC20A2* codiert den Typ III natriumabhängigen Phosphattransporter 2 (PiT2) und reguliert die zelluläre Phosphataufnahme (Wang et al., 2012). *XPR1* hingegen wurde erstmals als Oberflächenrezeptor für xenotrope und polytrope murine Leukämie-Retroviren identifiziert (Battini et al., 1999). 2013 wurde von Giovanni et al. aufgezeigt, dass *XPR1* der einzige, bekannte Phosphatexporter in Metazoa ist (Giovannini et al., 2013). *SLC20A2* und *XPR1* sind entscheidend für die Phosphathomöostase zum Beispiel in HAP1-Zellen (López-Sánchez et al., 2020). Obwohl *SLC20A2* und *XPR1* das zelluläre Phosphat in gegensätzliche Transportrichtung regulieren, kommt es bei einer *loss-of-function* (LOF) Mutation eines der Gene zu einer Akkumulation von Kalziumphosphat in den glatten Gefäßmuskelzellen oder Perizyten im Gehirn und somit zur PFBC (Abbildung 1.3) (López-Sánchez et al., 2020). Somit führt eine LOF-Mutation des *SLC20A2* sowie vermutlich des *XPR1* durch eine direkte Beeinträchtigung der Transportfunktion zu einer Akkumulation von Phosphat und infolgedessen zu Ablagerungen von Kalziumphosphat (López-Sánchez et al., 2020). Bisher ist wenig bekannt welche Zelltypen bei der Entwicklung von PFBC eine Rolle spielen. Vor allem Perizyten wurden mit der Erkrankung assoziiert (Zarb et al., 2019). In Endothelzellen wurde bisher die Funktion von *XPR1* und eine mögliche Funktion bei der Entstehung von PFBC nicht analysiert (Taglia et al., 2015). Es ist jedoch gezeigt, dass eine Mutation des *SLC20A2* in Endothelzellen, die aus pluripotenten Stammzellen von PFBC-Patienten differenziert wurden, eine deutlich beeinträchtigte Funktionalität des Phosphattransporters haben und somit möglicherweise auch die Entstehung einer PFBC nahelegen können (Sekine et al., 2019). Im Gegensatz dazu resultiert eine LOF-Mutation von *PDGFB* oder *PDGFRB* in einer Dysfunktion der Perizyten, die an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind und dieses somit in einer Kalzifizierung endet (López-Sánchez et al., 2020, Tadic et al., 2015, Nicolas et al., 2013).

Außerdem spielt *XPR1* eine zentrale Rolle in der Pathogenität des Plattenepithelkarzinoms der Zunge (Chen et al., 2019). In diesen Tumoren wurde eine deutliche Steigerung der Aktivität des *XPR1* aufgezeigt verglichen mit gesundem Zungengewebe. Hierbei werden die Proliferation, Invasion und Anti-Apoptose der Zellen gesteigert. Ursächlich könnte unter anderem eine erhöhte Konzentration von cyclischem Adenosinmonophosphat intrazellulär sein sowie eine gesteigerte Aktivierung des Signalweges über *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B). Die Expression von *XPR1* korreliert mit dem Überleben der Patienten, da eine erhöhte Aktivität mit einem schlechteren Outcome der Patienten verbunden ist (Chen et al., 2019).

Eine mögliche Rolle von PolyP in dieser *XPR1*-assoziierten Erkrankungen wurde bisher nicht genau analysiert.

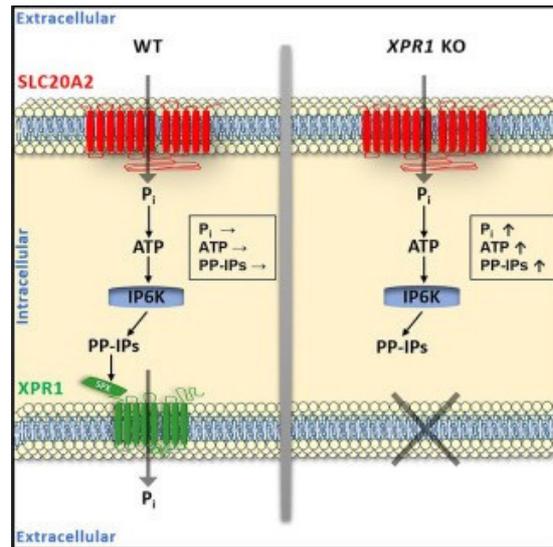


Abbildung 1.3 Schemazeichnung der Interaktion von SLC20A2 und XPR1

Schemazeichnung der beiden Phosphattransporter SLC20A2 und XPR1 mit den Interaktionen untereinander. Links ist die reguläre Darstellung eines Wildtyps (WT) mit regulärer Aufnahme des Phosphates über SLC20A2. Vorrübergehend kommt es zu einem Anstieg des Phosphates und folglich des ATPs intrazellulär. Die Konzentration des ATPs wird durch die Aktivität der ATP-abhängigen *Inositolhexakisphosphatase Kinase* (IP6K) durch Anstieg von PP-InsP, InsP₈ und InsP₇ umgesetzt. Diese interagieren mit der SPX-Domäne von XPR1 und aktivieren hierbei den Phosphatefflux. Somit wird dem Anstieg von ATP, PP-InsP, InsP₈ sowie InsP₇ durch den Ausstrom von Phosphat entgegengewirkt und die Werte nähern sich den Ausgangswerten wieder an. Bei den XPR1-KO-Zellen (XPR1 KO) erfolgt ebenso ein regulärer Einstrom von Phosphat über SLC20A2. Jedoch mangels des funktionsfähigen Exporters für Phosphat XPR1 sorgen steigende Spiegel an ATP für eine weiterhin aktive IP6K, was letztlich neben einer Akkumulation von Phosphat und ATP auch zur Akkumulation von PP-InsP, InsP₈ und InsP₇ führt.

Modifiziert nach (López-Sánchez et al., 2020)

1.4 Ziele dieser Doktorarbeit

PolyP hat verschiedenste Funktionen in einzelligen Organismen und höheren Lebewesen. Vor allem in Prokaryoten ist bereits viel über die Synthese, den Metabolismus und die Homöostase von PolyP bekannt. Bei Säugetieren und Menschen spielt thrombozytäres PolyP bei der Aktivierung der intrinsischen Gerinnung und über die Aktivierung von FXII auch bei entzündlichen Prozessen eine entscheidende Rolle (Müller et al., 2009).

Auch Endothelzellen enthalten PolyP. Erste Arbeiten mit Endothelzellkulturen legen nahe, dass durch die Zugabe von exogenem PolyP Entzündungsprozesse, das Zellwachstum (Hassanian et al., 2015) und die Gefäßneubildung (Müller et al., 2018) reguliert werden können. Die Funktion von intrazellulärem endotheliale PolyP ist jedoch gänzlich unbekannt.

In dieser Arbeit sollte zunächst der intrazelluläre Gehalt von endotheliale PolyP analysiert und die subzelluläre Lokalisation und intrazelluläre Speicher identifiziert werden.

Um die Funktion von endotheliale PolyP zu untersuchen, soll des Weiteren der PolyP-Gehalt in Endothelzellen systematisch moduliert werden. Dazu soll, vergleichbar zu den Thrombozyten-Studien der Arbeitsgruppe, die Expression von XPR1 im Endothel reguliert werden. Eine Verminderung der XPR1-Expression könnte auch in Endothelzellen zur Akkumulation von PolyP führen und verschiedenste zelluläre Signalwege beeinflussen mit Implikationen zum Beispiel für die Proliferation, Permeabilität und Kalzifizierungsprozessen.

2 Methoden und Material

2.1 Methoden

2.1.1 Zellkultur

Die Arbeiten zur Kultivierung der Endothelzelllinien und primären *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) erfolgten stets unter einer Sicherheitswerkbank in steriler Umgebung. Zentrifugationen der Zellen erfolgten bei 1000 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf) bei 24 °C für 5 Minuten (min), sofern nicht anders erwähnt. Alle Medien wurden vor der Verarbeitung auf Zimmertemperatur erwärmt. EAhy926-Zellen wurden auf Corning®-Zellkulturplatten angezüchtet und kultiviert. Die b.End3-Zellen wurden auf Corning® CellBIND®-Kulturplatten kultiviert. HUVECs wurden auf Corning®-Zellkulturplatten kultiviert, welche zuvor 1:1000 mit Fibronectin/Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) 20 min bei 37 °C beschichtet wurden (coating). Wenn die Zellen ein konfluentes Wachstum erreichten, wurden diese 1:3 passagiert. Nach dem Waschen mit DPBS wurden die Zelllayer 30 Sekunden (sek) mit 0,05 %igem Trypsin-EDTA inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin-EDTA aspiriert und die Zellen bis zur vollständigen Ablösung 5 min bei 37 °C inkubiert und mit neuem Medium ausplattiert. Gewaschen wurden alle Zelllinien stets mit DPBS. Temperatureinstellung und CO₂-Gehalt erfolgten wie in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Inkubationsparameter für Endothelzellen

Zellart	CO ₂ -Gehalt	Temperatur
bEnd.3	10 %	37 °C
EAhy926	10 %	37 °C
HUVECs	5 %	37 °C

2.1.1.1 Langzeitlagerung der Zellen

Nach der Trypsinierung wurden die Zellen mit Kulturmedium aufgenommen und bei 1000 rcf 5 min bei Raumtemperatur (RT \pm 20 – 22 °C) zentrifugiert. Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit dem Einfriermedium (Tabelle 2.10) zügig auf Eis aliquotiert. Anschließend wurden die Zellen ca. 2 Stunden (h) bei -20 °C eingefroren. Lagerung bis 6 Monate erfolgte bei -80 °C und Langzeitlagerung bei -196 °C.

2.1.2 Polyphosphatextraktion

Das intrazelluläre, anorganische PolyP wurde nach verschiedenen Wachstumsbedingungen aus den Endothelzellen extrahiert. Verglichen wurden Unterschiede zwischen den Zelllinien b.End3 und EAhy926, primären HUVECs und auch nach siRNA-vermitteltem *Knockdown* des *XPR1*-Gens Untersuchungen durchgeführt.

Die PolyP-Extraktion erfolgte anionenaustauscherbasiert mittels zwei verschiedener Methoden auf Grundlage von Kumble und Kornberg mit einigen Modifikationen (Kumble and Kornberg, 1995, Müller et al., 2009). Als Standardvariante wurden mittels Anionenaustauscherharz in Durchlaufsäulen (\cong Säulenaufreinigung) vor allem langkettige PolyP aufgereinigt und zusätzlich konnten mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion auch weitere lang- und kurzkettige PolyP extrahiert werden. Konfluente Zellen wurden mit Trypsin-EDTA gelöst (wie bereits unter 2.1.1 aufgeführt) und mit DPBS in ein Falcon Tube überführt. Für die Vergleichbarkeit erfolgte vor der Extraktion die Zellzählung vitaler Endothelzellen in Suspension. Hierzu wurden 10 μ l Zellsuspension 1:1 mit Trypan Blau inkubiert und mit Hilfe einer Neubauer Kammer ausgezählt. Die Zellsuspension wurde anschließend 5 min bei 1000 rcf zentrifugiert. Das DPBS wurde abgesaugt und das Zellpellet mit 250 μ l Tris 50mM pH 7,4 in Suspension gebracht sowie mit 250 μ l SDS 20 % (Endkonzentration 10 %) für 10 min bei RT lysiert. PolyP wurde mit einem Anionenaustauscherharz in Säulen extrahiert (QIAprep® *Spin Miniprep Kit*-Methode) nach dem QIAprep® Miniprep Handbook mit leichten Modifikationen (Werner et al., 2007). Bei der Verwendung von konfluent bewachsenen 10 cm Kulturplatten wurden Volumina entsprechend des Protokolls verwendet. Nach der Verwendung von 350 μ l N3 Puffer wurde das Puffer-SDS-Zelllysat 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert. Der verbliebene Rest wurde erneut mit 150 μ l Tris 50mM pH 8,8 resuspendiert und 4 min zentrifugiert. Der gesamte Überstand (ca. 500 μ l) wurde auf die Harz-Säule gegeben, 1 min zentrifugiert und anschließend die Puffer PB (500 μ l) und PE (750 μ l) verwendet, mit zwischenzeitlicher Zentrifugation von 1 min. Die Eluation des PolyPs erfolgte mit zweimaliger Inkubation von 10 μ l Tris 50 mM pH 7.4 für 4 min auf der Säulenmembran und anschließender Zentrifugation von 1 min mit abschließender Leerzentrifugation von ebenfalls 1 min. Zentrifugationen erfolgten stets bei 13.000 rcf und RT.

Der erste Durchlauf (ca. 500 μ l) der Anionenaustauscherharz-Säulen wurde für die anschließende Phenol-Chloroform-Aufreinigung auf Eis aufbewahrt. Die Phenol-Chloroform-Aufreinigung erfolgte wie bereits etabliert (Bru et al., 2016, Müller et al., 2009, Kumble and Kornberg, 1995) mit kleinen Modifikationen, wie nachfolgend beschrieben. So wurde zum Beispiel eine SDS-Zelllyse bereits vor der Säulenaufreinigung durchgeführt sowie der DNA-Verdau am Ende. Zudem erfolgte eine dezent abgewandelte

Präzipitation des PolyPs.

Der Durchlauf der Säulen wurde zweimal aufgereinigt 1:1 mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, 5 min zentrifugiert und jeweils der Überstand weiterverwendet. Nach der ersten Zentrifugation mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und dem Abtrennen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß, wurde der verbliebene Rest im ersten Reaktionsgefäß mit 100 µl Tris 20 mM pH 7,5 erneut 1 min zentrifugiert. Anschließend wurde der gesamte Überstand mit 500 µl Chloroform 5 min zentrifugiert. Die Zentrifugationen der Phenol-Chloroform-Aufreinigung erfolgten bei 4 °C und 10.000 rcf. Im letzten Schritt erfolgte mit 500 µl gewonnenem Überstand die Präzipitation mit 56 µl Natriumacetat (0,33 M Endkonzentration) und 1000 µl eiskaltem, absolutem Ethanol mit einer Inkubation von 10 min auf Eis und anschließender Zentrifugation 10 min mit 13.000 rcf bei 4 °C (Bru et al., 2016). Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes luftgetrocknet. In Lösung gebracht wurde das extrahierte PolyP mit 20 µl Tris 50 mM pH 7,4.

Der DNA-Verdau erfolgte zweimal 30 min bei 37 °C im ThermoCycler mit dem TURBO DNA-free™ Kit mit jeweils 2 Units (U) DNase und den Vorgaben des Herstellers. 10x DNase-Buffer wurde nur im ersten Verdau hinzugefügt. Zur Hydrolyse des PolyPs wurde die bereits im Labor etablierte Exopolyphosphatase aus *E. coli* (PPX) genutzt (Labberton et al., 2016). Der Verdau des PolyPs erfolgte mit 500 µg/ml PPX für 1 h 15 min bei 37 °C im ThermoCycler, sofern nicht anders angegeben. Die Verdünnungen des PPX erfolgten stets in Tris 50 mM pH 7,4, sofern nicht anders angegeben. Die Kontrollprobe wurde mit der gleichen Menge Tris 50 mM pH 7,4 aufgefüllt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

In den ersten Versuchsfolgen erfolgte die Extraktion des PolyPs noch mittels des QIAquick® Gel Extraction Kits nach Vorgaben des Herstellers. Da im Rahmen der Arbeit auf die ergiebigere Methode umgestellt wurde, beziehen sich lediglich die Resultate der Abbildung 3.1 auf die anfangs durchgeführte QIAquick® Gel Extraction Kit-Methode. Bei Abbildung 3.2 wurde genauso verfahren, nur wurden die Säulen des QIAprep® Spin Miniprep Kit bereits verwendet.

Es erfolgte die Lyse des Zellpellets, nach der Kultivierung, der Trypsinierung und dem Waschen mit DPBS, mit 300 µl 4 M NaCl für 5 min bei RT. Anschließend wurde mit 50 mM Tris pH 7,4 auf 2 ml aufgefüllt. Zusätzlich wurden in der Endkonzentration 3,5 mM MgCl₂ sowie 200 U/ml DNase I der Firma Roche hinzugefügt. Nach der Inkubation für 1 h bei 37 °C folgten 750 µg/ml Proteinase K und erneute Inkubation für 1 h bei 37 °C. Die Zentrifugation erfolgte für 8 min bei 14.000 rcf. Der Überstand wurde im Verhältnis 3:2 mit dem QG Buffer gemischt. In das QIAquick Spin Column wurden nacheinander jeweils ca. 700µl hinzugefügt, bis das gesamte Gemisch aufgebraucht war. Zentrifugationen des Spin

Columns erfolgten bei jedem Schritt 30 sek bei 17.000 rcf. Am Ende wurde die Säule mit dem Puffer PE gespült und erneut zentrifugiert sowie eine Leerzentrifugation durchgeführt, um die Reste des Buffers zu entfernen. Die Eluation erfolgte ebenso zweimalig mit je 10 µl Tris 50mM pH 7.4 für 4 min und anschließender Zentrifugation für 1 min. Die Extraktion nach dieser Methode mit dem QIAquick® *Gel Extraction Kit* stellte sich jedoch als weniger effektiv heraus im Vergleich zur oben genannten, neu etablierten Methode. Zudem konnte die DNA nicht ausreichend verdaut werden.

2.1.3 Urea-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese

Die Darstellung von PolyP mittels Urea-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese (Urea-PAGE) wurde bereits früher etabliert und erfolgte mit Modifikationen (Kumble and Kornberg, 1995, Smith et al., 2010, Gomez Garcia, 2014). Die Auftrennung des PolyPs erfolgt hierbei in den Urea-Gelen nach anlegen einer Spannung ihrer Kettenlänge nach, ähnlich wie DNA oder RNA (Summer et al., 2009). Für zwei 12 %ige Polyacrylamide-Gele in der Stärke von 1,5 mm mit 10 Taschen wurden 9,45 g Urea, 2,25 ml 10x TBE, 9 ml 30 %iges Acrylamide und 3,5 ml dH₂O bei 37 °C im Wasserbad erwärmt. Mit 9 µl TEMED und 225 µl 10 %igem APS wurden Gele gegossen und polymerisiert. Mit den Gelen wurde ohne Proben 30 min bei 100 V mit 1x TBE ein Pre-run im Bio Rad PowerPac Basic durchgeführt. Die Proben wurden 1:2 mit TBE/Urea-Sample-Buffer geladen bis maximal 75µl und mit 1x TBE bei 100 V circa 90-130 min laufen gelassen. Als Kontrolle wurden 100 ng synthetisches Polyphosphat P30 oder Natriumpolyphosphat P70 (P70) (gelöst in Tris 50 mM pH 7.4) aufgetragen und mit 1:2 TBE/Urea-Sample-Buffer-Tris-Gemisch auf das gleiche Volumen wie die Proben gebracht. Die Darstellung des Polyphosphat erfolgte mittels *4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)-negative-staining* (Smith and Morrissey, 2007, Clark and Wood, 1987, Labberton et al., 2016). Mit Hilfe des *negative-staining* mittels DAPI kann eine Unterscheidung zwischen PolyP und DNA bzw. RNA erfolgen, da diese in einem bestimmten Zeitrahmen nicht fotobleichen im Gegensatz zum vorliegenden PolyP im Urea-Gel (Moreno-Sanchez et al., 2012). Das *DAPI-negative-staining* erfolgte mittels 2 µg/ml DAPI in *negative-DAPI-Lösung* (Tabelle 2.10) 30 min abgedunkelt bei RT unter Schwenken. Anschließend wurde zweimalig frische *negative-DAPI-Lösung* für jeweils 25 min unter Schwenken inkubiert. Die Darstellung der Bilder erfolgte mit dem Bio Rad *UV-Transilluminator Molecular Imager Gel Doc XR+* mit zwischenzeitigem Fotobleaching für 99 sek (für maximale PolyP Darstellung ca. fünfmal bleachen).

- Softwareeinstellung: SYBR Safe, Filter: Standard Filter (Filter 1), Light: UV Trans illumination, Image colour: Gray

2.1.4 Malachite Green Assay

Mittels des *Malachite Green Assays* kann via Extinktionsbestimmung bei einer Wellenlänge von 650 nm anorganisches Phosphat detektiert und eine Aussage über die Menge an intrazellulärem PolyP getroffen werden. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip, dass *Malachite Green* bei einem niedrigen pH beispielsweise mit Phosphomolybdat sowie freien Orthophosphaten einen Komplex bildet und sich hierbei durch einen Absorptionsshift ein neues Absorptionsmaximum nach einer Inkubation einstellt (Itaya and Ui, 1966, Altmann et al., 1971). Höhere Extinktionen werden vor allem nach einem Enzymverdau des PolyPs mit PPX erreicht, da eine Bindung des Farbstoffes beim Vorliegen von langkettigem PolyP nicht stattfindet. Somit kann nach dem spezifischen Verdau von PolyP durch PPX ein deutlicher Anstieg der optischen Dichte (OD) bei der Extinktionsbestimmung ermittelt und somit das PolyP intrazellulär aufgezeigt werden (Bru et al., 2016).

Der Verdau des PolyPs erfolgte zuvor 45 min bei 37 °C mit 50 – 100 µg/ml PPX. Die Ansätze erfolgten in 96-Well Platten zur Extinktionsbestimmung. Extrahiertes PolyP aus Endothelzellen (QIAprep® *Spin Miniprep Kit* Extraktion oder in den ersten Experimenten mittels QIAquick® *Gel Extraction Kit*) wurde verwendet. Die Proben wurden mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl pro Probe gebracht. Verwendet wurde das *Phosphate Assay Kit* der Firma Abcam und es wurde nach dem vorgegebenen Protokoll gearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Standards. Zu den 200 µl der Proben wurden 30 µl des Farbstoffes hinzugefügt und nach 30 min Inkubation bei RT im Dunkeln erfolgte die Absorptionsbestimmung mittels des Spark 10M™ *Plate reader* der Firma Tecan.

2.1.5 Immunofluoreszenzfärbung von Endothelzellen

Intrazelluläres PolyP in b.End3, EAhy926 und HUVECs wurde mittels der etablierten PolyP-Sonde PPX_Δ1,2 (Labberton et al., 2016, Labberton et al., 2018) detektiert und mit subzellulären Zellkomponenten durch Antikörper sowie Marker (Tabelle 2.5) ko-lokalisiert. Da PolyP in Plasma instabil ist und eine repetitive Struktur besitzt, konnten keine PolyP-Antikörper entwickelt werden. Um dennoch PolyP spezifisch experimentell aufzeigen zu können, wurde aus PPX die PolyP-Sonde PPX_Δ1,2 entwickelt, welche durch gentechnische Modifikationen nur die zwei C-terminalen Bindungsdomänen 3 und 4 von PPX umfasst und somit an PolyP binden, dieses aber nicht hydrolysieren kann (Labberton et al., 2018, Labberton et al., 2016).

Zur Fluoreszenzdetektion wurde die Sonde PPX_Δ1,2 mit dem Alexa Fluor™ 488 *Labeling Kit* nach Herstellerangaben gelabelt (Labberton et al., 2016, Verhoef et al., 2017). Zunächst wurde PPX_Δ1,2 (gelöst in Tris) in Slide-A-Lyzer® *Dialysis* Kassetten und mit 1 Liter DPBS (mit MgCl₂ und CaCl₂) 24 h umgepuffert. Dabei wurde das DPBS alle 6 h gewechselt.

Die Färbungen wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt mit leichten Modifikationen (Zhang et al., 2018). Lab-Tek™ II *Chamber Slides* wurden 20 min bei 37 °C mit Fibronectin 1:100 bei allen Zellen beschichtet. Die Zellen wurden nach benötigter Dichte ($4 - 8 \cdot 10^4$ /Kammer) ausgesät und mit 400 µl Medium bedeckt. Die Kultivierung erfolgte ca. 24 - 48 h bei 37 °C. MitoTracker wurde gemäß den Herstellerangaben vorbereitet und in einer Konzentration von 300 nM 35 min bei 37 °C inkubiert vor der Fixation mit 4 % PFA für 20 min bei RT oder Methanol 15 min bei 4 °C. Die Permeabilisierung erfolgte 5 min bei RT mit DPBS + 0,5 % Triton-X und anschließendes Blocken 1 h bei RT mit DPBS + 2 % BSA + 0,3 % Triton-X (Tabelle 2.10). Inkubation von PPX_Δ1,2 Alexa_488 auf den Zellen erfolgte mit einer Konzentration von 100 µg/ml 1 h bei RT oder wurde gleichermaßen mit dem 1:200 verdünnten sekundären Antikörper inkubiert. Vor allem anfangs wurde Alexa_488 gelabeltes PPX_Δ1,2 noch 1 h bei 37 °C inkubiert. Dieses stellte sich jedoch als nicht notwendig heraus.

Primäre Antikörper (Tabelle 2.5) wurden je nach benötigter Endverdünnung in *Blocking Solution* eingesetzt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschriffe mit DPBS + 0,3 % Triton-X (Tabelle 2.10) jeweils 5 min bei RT. Sekundäre Antikörper (Tabelle 2.5) wurden 1:200 mit *Blocking Solution* verdünnt und 45 min bei RT inkubiert. Phalloidin wurde 1:40 verdünnt und zeitgleich mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Abschließendes Waschen erfolgte mit DPBS und Eindecken mit Fluoroshield™.

Zusätzlich enthält die PPX_Δ1,2-Sonde einen 6xHistidin-Tag (HIS-Tag), welcher mit HIS-Tag-Antikörpern detektiert werden kann (Tabelle 2.5). Hierzu wurde das PPX_Δ1,2 zunächst ungelabelt 1 h bei RT verdünnt in Tris 50 mM pH 7.4 inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären HIS-Tag-Antikörpers 1:400 für 1 h bei RT. Zuletzt wurde der Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte, sekundäre Antikörper inkubiert.

Als Kernfärbung wurde stets DAPI (Tabelle 2.4) verwendet, welches in Fluoroshield™ zum Eindecken enthalten war und zur Anfärbung der Mitochondrien MitoTracker™ Red CMXRos (MitoTracker) (Tabelle 2.5). Beides wurde je nach Herstellerangaben für die Endothelzellen verwendet.

2.1.6 *Small-interfering ribonucleic acid in vitro* Transfektion

Small interfering ribonucleic acid (siRNA) sind doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 20-25 Basenpaaren. Diese siRNAs vermitteln RNA *interference* (RNAi), wobei komplementäre Stränge an die *messenger RNA* (mRNA) binden und somit spezifisch zum *Knockdown* von Genen führen.

In dieser Arbeit wurde die siRNA zur Ausschaltung der Expression von humanem *XPR1* in EAhy926 und HUVECs genutzt. Genutzt wurde eine siRNA, welche an die Zielstruktur des humanen *XPR1*⁷³ bindet mit der Sequenz: 5'-GGAUUUCAUGCCAUCCCAUTT-3' und

5'-GCACUCCACCAUGUAUUATT-3'. Die Analyse der *Knockdown*-Effizienz erfolgte via *real-time quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR), Urea-Gel Analyse sowie im Immunostaining.

Die Anzucht der Zellen erfolgte auf 6-Well Platten mit $2 \cdot 10^5$ - $2,5 \cdot 10^5$ Zellen pro Well mit einer Wachstumsfläche von 9,6 cm². Bei HUVECs wurden die Platten zuvor 20 min bei 37 °C mit Fibronektin 1:1000 gecoatet. Die konfluent gewachsenen Zellen wurden mit DPBS gewaschen und pro Well mit 2 ml Opti-MEM 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde in einem *Polystyrene Round-Bottom-Tube* 125 µl Opti-MEM mit 7,5 µl Lipofectamine 3000 versetzt. Zusätzlich wurden in einem weiteren *Polystyrene Round-Bottom-Tube* 125 µl Opti-MEM mit 3,75 µl negativ-Kontrolle 20 µM oder 3,75 µl siRNA *XPR1* 20 µM versetzt und dieses vorsichtig dem Opti-MEM/Lipofectamine hinzugefügt. Nach 5 min Inkubation wurde dieses den mit Opti-MEM inkubierten Zellen hinzugefügt mit einer Endkonzentration der siRNA von 79,5 nM. Die Negativ-Kontrolle erfolgte mit der *AllStars Negative Control* als *non-silencing* siRNA. Die Inkubation auf den Zellen erfolgte 4 - 6 h bei 37 °C mit anschließendem Wechsel auf Kulturmedium (HUVEC/EAhy926-Medium). Die Transfektion wurde nach ~72 h analysiert.

Für die siRNA Transfektion direkt auf den *Chamber Slides* zur Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Mengen der Reagenzien gemäß den geringeren Volumina angepasst. Für Lipofectamine 3000 und siRNA wurden gleichermaßen 0,75 µl in je 35 µl Opti-MEM pipettiert und anschließend nach 5 min Inkubation zu 250 µl Opti-MEM auf den Zellen gegeben. Die weitere Durchführung zum Immunostaining erfolgte wie in Punkt 2.1.5 angegeben.

2.1.7 Messenger-RNA Extraktion

Die *messenger*-RNA (mRNA)-Isolation erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit, des *Rnase-Free* DNase Set und der QIAshredder™ der Firma Qiagen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll *Purification of Total RNA from Animal Cells Using Spin Technology* des RNeasy® *Mini Handbook*. Vor der Anwendung des Kits wurden die Zellmonolayer zweimal mit DPBS gewaschen und die Kulturschalen anschließend auf Eis platziert. Modifikationen des Kits erfolgten folgendermaßen: Die Zellen wurden direkt auf den Kulturschalen (Wachstumsfläche von 9,6 cm²) mit 350 µl RLT-Buffer lysiert und mit einem sterilen Kunststoffzellschaber abgelöst. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Lysates in den QIAshredder™ Säulen und die Zentrifugation für 25 sek. Der Durchlauf wurde mit 350 µl 70 %igem, unvergälltem Ethanol gemischt, das *RNeasy Spin Column* wurde nach den Herstellervorgaben genutzt und 25 sek zentrifugiert. Statt 700 µl RW1-Buffer wurden 350 µl in das *Spin Column* pipettiert, erneut 25 sek zentrifugiert und anschließend der Verdau der DNA direkt auf der Membran der RNeasy® Mini Kit Säule mit

dem *Rnase-Free* DNase Set gemäß dem vorgegebenen Protokoll des Herstellers durchgeführt. Der Verdau erfolgte 20 min bei RT. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 µl des RW1-Buffer gespült und 25 sek zentrifugiert. Weiter nach den Vorgaben zweimalig 500 µl RPE-Buffer mit Zentrifugation von je 25 sek und 2 min 10 sek abschließend. Als letzten Schritt des Protokolls erfolgte die einmalige Zugabe von 40 µl *Rnase-free Water* auf die Säulen zur Eluierung der RNA mit Zentrifugation von 1 min 10 sek. Alle Schritte zur Zentrifugation erfolgten bei 8000 rcf. Die Lagerung der RNA-Isolate erfolgte bei -20 °C.

2.1.8 Reverse Transkription

Die Analyse der Genexpression über die mRNA erfolgt mit Hilfe der qPCR. Hierzu musste mittels der reversen Transkription die mRNA in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben werden. Die Reverse Transkriptase ist eine RNA abhängige DNA-Polymerase mit Rnase Aktivität und bildet hierbei den neuen komplementären DNA-Doppelstrang aus dem Einzelstrang der mRNA mit Hilfe der einzelnen DNA Nukleotide als Komponenten (Bustin, 2000).

Zu 16 µl der RNA-Isolation wurden 4 µl SuperScript™ IV VILO™ *Master-Mix* hinzugefügt und die reverse Transkription erfolgte im Thermal Cycler PTC-200 von MJ Research. Bei weniger als 16 µl RNA-Isolation wurde bis auf insgesamt 20 µl mit *Rnase-free Water* aufgefüllt. Die entstandene cDNA wurde entweder direkt für die anschließende qPCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.1.9 Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction

Die qPCR dient heutzutage als etablierte Methode zur Ermittlung der Effektivität des *Knockdowns* eines Gens durch siRNA (Thornton and Basu, 2015, Milstein et al., 2013). Als Referenz oder *housekeeping gene* der hier durchgeführten qPCR-Testungen wurde zur Quantifizierung Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) genutzt, da dieses wenig Varianz in der Genexpression besitzt.

Die qPCR wurde in einer 96 *Fast* PCR-Platte angesetzt und mit Hilfe des StepOnePlus™ die *real-time* PCR über 2 h amplifiziert. Der *Master-Mix* für jede Bestimmung setzte sich aus 4µl cDNA, 5µl *Rnase-free Water* und 10µl TaqMan™ *Gene Expression Master-Mix* zusammen. Hinzu kam 1 µl TaqMan Probe des jeweils zu bestimmenden Gens (*GAPDH*, *XPR1*, *CCNB1*, *CCNB2*, *MKI67*, *MYBL2* Tabelle 2.5). Es erfolgten hierbei Dreifachbestimmungen. Die Bestimmung des exponentiellen Anstiegs des emittierten Lichtes erfolgte hierbei zu einem Zeitpunkt, indem die Hintergrundfluoreszenz durch das Signal überschritten wurde. Zur Auswertung des Anstiegs der Signale erfolgte in dieser Phase zur relativen Quantifizierung die Ermittlung des C_t -Wertes (*cycle threshold value*).

Die Ergebnisse wurden verglichen mit der Expression des GAPDH und wurden als n-fache Expression ermittelt. Die n-fache Expression wurde mit Hilfe des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes kalkuliert.

2.2 Material

Tabelle 2.2: Nährmedien

Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Dulbecco's Modified Medium (DMEM) + 4,5g/l D-Glucose, L-Glutamine - Pyruvate	41965-039 (500ml)	Gibco
Endothelial Cell Growth Medium	C-22010	PromoCell
OPTI-MEM® (1x) Reduced Serum Medium + HEPES + 2,4 g/l Sodium Bicarbonate + L-Glutamine	31985-062 (100ml)	Gibco

Tabelle 2.3: Zellkultur

Lösung	Artikelnummer	Hersteller
0,05 % Trypsin-EDTA (1x)	25300-054 (100 ml)	Gibco
Dimethyl Sulphoxide (DMSO)	D2438	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) - CaCl ₂ - MgCl ₂	14190-094 (500 ml)	Gibco
DPBS with MgCl ₂ and CaCl ₂	D8662	Sigma-Aldrich
Fetal Bovine Serum (FBS), Qualified, Heat Inactivated	10500-064 (500 ml)	Gibco
L-Glutamine 200 mM	25030-081 (100 ml)	Gibco
Penicillin-Streptomycin (PenStrep) + 10.000 Units/ml Penicillin + 10.000 µg/ml Streptomycin	15140-122 (100 ml)	Gibco
Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix	C-39215	PromoCell
Fibronectin bovine plasma	F1141	Sigma-Aldrich

Tabelle 2.4: Reagenzien und Chemikalien

Reagenz	Artikelnummer	Hersteller
10x TBE (890 mM Tris, 890m M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8.4)	#161-0733	Bio Rad
30 % Acrylamide/Bis Solution 29:1	#1610156	Bio Rad
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	D9542-10MG	Sigma-Aldrich
Amersham Shrimp Alkine Phosphatase	E70092Y	Cytiva
Ammonium Persulfate (APS)	A3678-25G	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	B4287	Sigma-Aldrich
Chloroform	7386.1000	J.T. Baker
Ethanol 70% ROTIPURAN_>70 %, p.a., UN1170	T868.1	Carl Roth GmbH
Ethanol absolut	2273.2500	ChemSolute
FastAP thermosensitive alkaline Phosphatase	EF0651	Fermentas Life Sciences
Fibronectin bovine plasma	F1141-1MG	Sigma-Aldrich
Fluoroshield™	F6182	Sigma-Aldrich
Fluoroshield™ with DAPI	F6057	Sigma-Aldrich
Glycerol	G5516-1L	Sigma-Aldrich
Lipofectamine® 3000 Transfection Kit	L3000-015	Invitrogen
Magnesium chloride anhydrous for synthesis	81473	Merck
Methanol	8045.2500	J.T. Baker
Natriumpolyphosphat P70 (P70)	7 1480	BK Giulini
N, N, N', N', Tetramethylethylenediamine	T9281-25ML	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyde	1.04005.1000	Merck
Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol Mixture	77617-500ML	Sigma-Aldrich
PhosChek P 30R (P30)	2 2840	BK Giulini
Proteinase K	P2308 – 25MG	Sigma-Aldrich
Rnase-free Water	129112	Qiagen
Salzsäure 25 %	6331.3	Carl Roth GmbH

SDS-Solution 20 % pure	A3942	AppliChem
Sodium Chloride	0278.1000	Baker
SuperScript™ IV VIL0™ Master Mix	11756050	Invitrogen
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	4369016	Applied Biosystems
TBE-Urea Sample Buffer	#1610768 (abgesetzt)	Bio Rad
TBE urea sample buffer (2x)	J60186	Alfa Aesar
Triton X-100	#1610407	Bio Rad
Trizma® base	T1503-1KG	Sigma-Aldrich
Trypan Blue Stain (0,4 %)	15250-061 (100ml)	Gibco
Urea	U6504-500G	Sigma-Aldrich

Tabelle 2.5: Antikörper/TaqMan-Proben und Immunfluoreszenz

Antikörper/TaqMan	Artikelnummer	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor® 488-conjugated AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Mouse IgG	715-547-003	IF1:200	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
Alexa Fluor™ 594 Phalloidin	A12381	IF 1:40	Invitrogen
Alexa Fluor® 647-conjugated AffiniPure Fab Fragment Donkey Anti-Rabbit IgG	711-607-003	IF 1:200	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
AllStars Negative Control siRNA 20 nm	1027281		Qiagen
HIS-Tag (D3I10) XP® Rabbit mAb	12698	IF 1:400	Cell Signaling Technology
MitoTracker™ Red CMXRos	M7512	Auf 300nM	Invitrogen
Polyclonal Rabbit Anti-Human Von Willebrand Factor 3,1g/l	A0082	IF 1:100	Dako
VE-cadherine mouse monoclonal IgG	sc-9989	IF 1:50	Santa Cruz Biotechnology
TaqMan CCNB1	Hs23960		Thermo Fisher Scientific
TaqMan CCNB2	Hs194698		Thermo Fisher Scientific
TaqMan GAPDH	Hs544577		Thermo Fisher Scientific

TaqMan MKI67	Hs689823	Thermo Fisher Scientific
TaqMan MYBL2	Hs179718	Thermo Fisher Scientific
TaqMan XPR1	Hs227656	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 2.6: Kits

Kit	Artikelnummer	Hersteller
Alexa Fluor™ 488 Protein Labeling Kit	A10235	Invitrogen
Phosphate Assay Kit (Colorimetric)	Ab65622	Abcam
QIAshredder™ (50)	79654	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit (250)	27106	Qiagen
QIAquick® Gel Extraction Kit	28506	Qiagen
RNeasy® Mini Kit (50)	74104	Qiagen
Rnase-Free DNase Set (50)	79254	Qiagen
TURBO DNA-free™ Kit	AM1907	Invitrogen

Tabelle 2.7: Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
96 Fast PCR-Platte Halbrand	72.1981.202	Sarstedt
Biosphere® Filter Tips 0,1-20 µl	70.1114.210	Sarstedt
Biosphere® Filter Tips 2-100 µl	70.760.212	Sarstedt
Biosphere® Filter Tips 100-1000 µl	70.762.211	Sarstedt
Cell Scraper 25 cm	83.1830	Sarstedt
Corning® 100 mm x 20 mm Style Dish	430167	Corning Incorporated
Corning® 100 mm x 20 mm Style Dish CellBIND®	3296	Corning Incorporated
Costar® Stripette 25 ml	CLS4489	Corning Incorporated
CryoTube™ Vials	363401	Thermo Scientific

Deckgläser 24x50 mm	0101222	Marienfeld
Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube	352054	Corning Incorporated
Falcon® 6-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate, with Lid, Individually Wrapped, Sterile, 50/Case	353046	Corning Incorporated
Filter tip 1000 µl	70.3060.255	Sarstedt
Multiply®-Pro Gefäß 0,2 ml	72.737.002	Sarstedt
Nunc™ Lab-Tek™ II CC2™ Chamber Slide	154941	Sigma-Aldrich
Pipet tips with microcapillary for loading gels	732-0508	VWR
Pipette tip 1000 µl	70.3050.200	Sarstedt
Quality Pipette Tips 100-1000 µl	70.762.100	Sarstedt
Röhre 15 ml, 120x17 mm, PP	62.554.502	Sarstedt
Röhre 50 ml, 114x28 mm, PP	62.547.254	Sarstedt
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	72.706	Sarstedt
SafeSeal Reagiergefäß 2 ml	72.695.500	Sarstedt
Serological Pipette 5 ml	86.1253.001	Sarstedt
Serological Pipette 10 ml	86.1254.001	Sarstedt
Serological Pipette 50 ml	86.1256.001	Sarstedt
Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette	66380	Thermo Scientific
TC-Platte 6 Well Standard	83.3920.005	Sarstedt
Tip StackPack Pipettenspitzen 0,1-20 µl	70.1130.600	Sarstedt
Tip StackPack Pipettenspitzen 2-100 µl	70.760.502	Sarstedt
Transferpipetten	86.1172.010	Sarstedt

Tabelle 2.8: Geräte

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Mikroskop Leica Dmi8 Laser White light laser pulsed 460-670 λ Detektor 3x HyD Software Leica LAS X		Leica
Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System Software Image Lab V2.0.1 build 18	#1708195	Bio Rad
PowerPac Basic 300 V, 400 mA, 75 W	#1645050	Bio Rad
PTC-200 Thermal Cycler	MJ-200	MJ Research
StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Software StepOne Software V2.3	4376600	Applied Biosystems™
Sonopuls HD 2200		Bandelin
Spark 10M™ Software SparkControl V2.3		Tecan
UV-Transilluminator	95-0447-02	UVP

Tabelle 2.9: Software

Name	Version	Hersteller
Image J 1.52P	Java 1.8.0_172	Fiji
Image Lab	6.1 Software for Mac	Bio Rad
Prism	8.4.2 (679)	GraphPad

Tabelle 2.10: Hergestellte Lösungen

Lösung	Reagenzien
b.End3-Zellmedium	DMEM + 10 % FBS + 1 % PenStrep + 1 % L-Glutamine
Eahy926-Zellmedium	DMEM + 10 % FBS + 1 % PenStrep
HUVEC-Zellmedium	Endothelial Cell Growth Medium PromoCell + Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix + 1 % PenStrep

Einfriermedium Zellen	50 % Zellmedium (Eahy926, b.End3, HUVECs) + 40 % FBS + 10 % DMSO
<i>Negative-DAPI Solution</i> (Urea-PAGE)	750 ml dH ₂ O + 250 ml Methanol + 50 ml Glycerol
<i>Permeabilization Buffer</i> (Immunostaining)	50 ml DPBS + 0,5 % Triton-X 100
<i>Blocking Buffer</i> (Immunostaining)	50 ml DPBS + 2 % BSA + 0,3 % Triton-X 100
<i>Wash Buffer</i> (Immunostaining)	50 ml DPBS + 0,3 % Triton-X 100

3 Resultate

3.1 Nachweis von PolyP in Endothelzellen

3.1.1 *Malachite Green Assay* und Urea-PAGE

Neuere Arbeiten zeigen den Einfluss von exogenem PolyP auf die Endothelzellen (Biswas et al., 2018, Dinarvand et al., 2014, Hassanian et al., 2016, Müller et al., 2018). Dabei wurden die Funktionen des endogenen PolyPs der Endothelzellen bis dato kaum untersucht. Somit erfolgte in dieser Arbeit zunächst der Nachweis des intrazellulären Gehaltes an PolyP.

Zu Beginn des Projektes erfolgte die Isolation von PolyP mit Hilfe des QIAquick® *Gel Extraction Kit* mit Zellyse durch 300 µl 4 M NaCl sowie in Endkonzentration 3,5 mM MgCl₂, 200 U/ml DNase I der Firma Roche und 750 µg/ml Proteinase K (Abschnitt 2.1.2). Die Resultate hierbei beschränken sich auf die Abbildung 3.1. Bei Abbildung 3.2 wurde gleich verfahren, nur wurden bereits die Säulen des QIAprep® *Spin Miniprep Kit* verwendet. Nach der QIAquick® *Gel Extraction Kit*-Methode konnte nach Verdau mit 50 µg/ml PPX 5,5 µM Monophosphat für $9,625 \cdot 10^6$ EAhy926-Zellen detektiert werden (Abbildung 3.1). Nach überarbeiteter Extraktion mit der QIAprep® *Spin Miniprep Kit*-Methode (Abschnitt 2.1.2) wurden nach Verdau mit 100 µg/ml PPX 23,67 µM Phosphat für $2,7 \cdot 10^5$ EAhy926-Zellen detektiert (Abbildung nicht beigefügt). Durch die effektivere Extraktion wurde auf die QIAprep® *Spin Miniprep Kit*-Methode umgestellt. Außerdem konnte bei dieser Methode durch eine zusätzliche Phenol-Chloroform-Aufreinigung des ersten Säulendurchlaufes weiteres, vor allem auch kurzkettigeres, PolyP extrahiert und in der Urea-PAGE dargestellt werden.

Zum Nachweis von PolyP wurde zunächst der *Malachite Green Assay* (Itaya and Ui, 1966, Altmann et al., 1971) durchgeführt. Hierzu wurde die immortalisierte Zelllinie der HUVECs EAhy926 bei 37 °C und 10 % CO₂ für 24 - 72 h kultiviert und anschließend wurde nach oben genannter Methode mit Hilfe der Anionenaustauscherharze das PolyP isoliert. Es erfolgte der Verdau des extrahierten PolyPs mittels PPX mit einer Konzentration zwischen 50 - 100 µg/ml für 45 min bei 37 °C. Durch den Verdau mit 50 µg/ml PPX (hierdurch abgedauter Monophosphatgehalt der $9,625 \cdot 10^6$ EAhy926-Zellen 5,5 µM) konnte endogenes PolyP in EAhy926 Zellen durch einen Anstieg der optischen Dichte (OD) auf 0,45 nachgewiesen werden, da die unverdaute Probe lediglich eine Hintergrund-OD von 0,09 besitzt (Abbildung 3.1). Da PPX Phosphate spezifisch von den Kettenenden des PolyPs abspaltet, zeigt eine Zunahme von Monophosphaten die relative PolyP-Menge pro Zeit an.

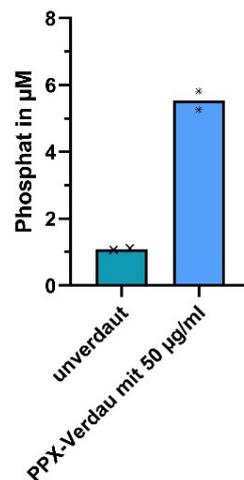


Abbildung 3.1 Quantitative Bestimmung von PolyP der EAhy926 im *Malachite Green Assay*

Abgebildet ist die Bestimmung der Extinktion der optischen Dichte (OD) bei 650 nm mittels des Tecan Spark 10M™ nach Aufreinigung des PolyPs mit der QIAquick® *Gel Extraction Kit*-Methode. Zu erkennen ist ein deutlicher Unterschied der Konzentration an Phosphat durch den Verdau mit 50 µg/ml PPX (5,5 µM Phosphat für $9,625 \cdot 10^6$ Zellen) und ohne Verdau (1,1 µM Phosphat für $9,625 \cdot 10^6$ Zellen). Somit wurde die Effektivität des Enzyms aufgezeigt sowie intrazelluläres PolyP nachgewiesen, da der Farbstoff des *Malachite Green Assays* zur Detektion freier Phosphate genutzt wird und hierbei ein Absorptionsshift aufgezeigt werden kann. Durch das Enzym wurden PolyP-Ketten zu Monophosphaten verdaut. Es erfolgte eine Doppelbestimmung (n=2). Dargestellt sind der Mittelwert und die einzelnen Datenpunkte.

Zusätzlich lässt sich PolyP auch im Urea-Gel nachweisen (Smith et al., 2010). Diese Methode wurde zunächst im Rahmen dieser Arbeit für endotheliales PolyP etabliert. Hierbei erfolgten Austestungen mit verschiedenen Polyacrylamidgelkonzentrationen sowie die Verwendung unterschiedlicher Anionenaustauscherharze zur Isolation des PolyPs.

Zunächst erfolgte, wie bereits erwähnt, die PolyP Aufreinigung mittels des QIAquick® *Gel Extraction Kits* mit $MgCl_2$, Proteinase K und die Zellyse durch 4 M NaCl (Nickel et al., 2015) sowie der Verdau der DNA mit Hilfe einer DNase der Firma Roche (Tabelle 3.1). Diese Anwendungen führten nicht zu einer reproduzierbaren Aufreinigung von PolyP sowie insuffizienter Verdau der DNA war in der Urea-PAGE detektierbar (Abbildung 3.2). Testungen mit verschiedenen DNasen, Ultraschall zur DNA-Spaltung (Tabelle 3.1), unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (ausgetestet 6-12 % Acrylamid) des Gels und verschiedene Abläufe der Aufreinigung führten nicht zu gut analysierbaren PolyP-Banden in der Urea-PAGE. Häufigste Störfaktoren waren vor allem ein mangelnder DNA-Verdau, unter anderem durch die Roche DNase bzw. mangelnde Effektivität der Extraktion sowie vermutlich zu starke Ladungsunterschiede nach der Phenol-Chloroform-Aufreinigung und dadurch Artefakte im Gel mit Störung der Größenseparation der PolyP-Banden (Abbildung 3.2 weißer Pfeil). Die effizienteste Detektion in den Gelen nach der PolyP Aufreinigung wurde mit dem QIAprep® *Spin Miniprep Kit*, dem TURBO *DNA-free*™ Kit, der Zellyse

mittels 10 % SDS und dem Lauf im 12 %igem Polyacrylamid-Gel erzielt (Abbildung 3.3 bis 3.5).

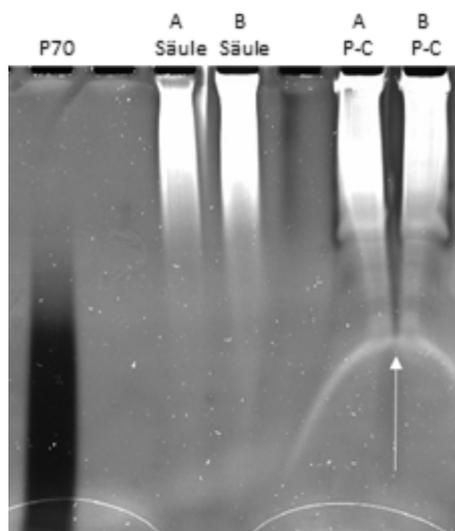


Abbildung 3.2 Störfaktoren in der Urea-PAGE

Pro Probe wurde jeweils das Lysat von $8,4 \cdot 10^6$ EAhy926-Zellen beimpft. P70 diente als Standard. Die Zellyse erfolgte bei allen Proben mit 4 M NaCl 5 min bei RT. Alle Proben wurden 1 h bei 37 °C mit 0,5 mg/ml der DNase der Firma Roche und mit 4 mM $MgCl_2$ inkubiert. Zudem wurden bei allen Proben Proteinase K mit einer Konzentration von 750 μ g/ml verwendet. Bei den Proben A erfolgte vor dem Enzymverdau eine Zerkleinerung der DNA mittels Ultraschalls (5 x 5 sek). Die Proben B dienten als Kontrolle. Bei A & B Säule erfolgte die Aufreinigung des PolyPs mit Hilfe des QIAprep® *Spin Miniprep Kit* und bei den Proben P-C erfolgte zusätzlich die Aufreinigung über Phenol-Chloroform. Bei den Phenol-Chloroform Aufreinigungen entstanden häufig mutmaßlich Ladungsunterschiede, wodurch es zu Störungen im Lauf des Gels und den Proben kam (siehe Abbildung weißer Pfeil). Wahrscheinlich durch viel störende DNA konnte in allen Proben kein endogenes PolyP nachgewiesen werden, da diese das Signal des PolyPs überdeckte. Zwischen den Proben mit unterschiedlicher DNA-Beseitigung konnten keine Unterschiede festgestellt werden hinsichtlich der Störfaktoren.

Tabelle 3.1 Ausgetestete Methoden für störungsfreie PolyP Urea-PAGE und effiziente PolyP-Aufreinigung

Bezeichnung	Artikelnummer	Anwendung	Hersteller
Amersham Shrimp Alkaline Phosphatase	E70092Y	7 U	Cytiva
DNase	Nicht mehr verfügbar	0,5 mg/ml	Roche
FastAP thermosensitive alkaline Phosphatase	EF0651	7 U	Fermentas Life Sciences
Magnesium chloride anhydrous for synthesis	81473	5 mM	Merck
Proteinase K	P2308 – 25MG	750 μ g/ml	Sigma-Aldrich
QIAquick® Gel Extraction Kit	28506	Laut Herstellerangaben	Merck
Sodium Chloride	0278.1000	4 M	Baker

Sonopuls HD 2200
Ultraschall

5x5 sek

Bandelin

In einem nächsten Schritt wurden optimale Bedingungen für die PolyP-Hydrolyse analysiert. Auch steigende Konzentrationen (bis 500 µg/ml) der PPX mit einer Inkubation bis zu 1 h 15 min bei 37 °C führten nicht zum erfolgreichen Verdau des PolyPs, um somit einen Nachweis zu erbringen, dass die vorliegenden Banden in den Gelen das gewünschte PolyP sind (Abbildung nicht beigelegt). Es wurde die Effizienz weiterer Phosphatasen untersucht. Die Hinzugabe von 7 U *Fast* alkalische Phosphatase oder auch *Shrimp* alkalische Phosphatase mit einer Inkubation von 1 h bei 37 °C führten nicht zu einem suffizienten Verdau des vorliegenden PolyPs (Tabelle 3.1). Es erfolgte somit im nächsten Schritt eine Vorverdünnung der Proben, um die Konzentration an endogenem PolyP deutlich zu senken. Hierbei konnte ein detektierbarer Verdau in der Urea-PAGE erzielt werden. Um im Vergleich mit der Kontrolle einen erfolgreichen Verdau mit 500 µg/ml PPX zu detektieren, mussten bei den EAhy926 $\sim 1 \cdot 10^6$ Zellen bzw. deren isoliertes, endogenes PolyP vorliegen (Abbildung 3.3 und 3.4). In EAhy926 Zellen konnte durch eine Verdünnungsreihe bei einer Zellzahl von $0,25 \cdot 10^6$ sowohl bei der Säulenaufreinigung (Abbildung 3.3), als auch in der Phenol-Chloroform-Aufreinigung (Abbildung 3.4) ein restloser Verdau des PolyPs nachgewiesen werden.

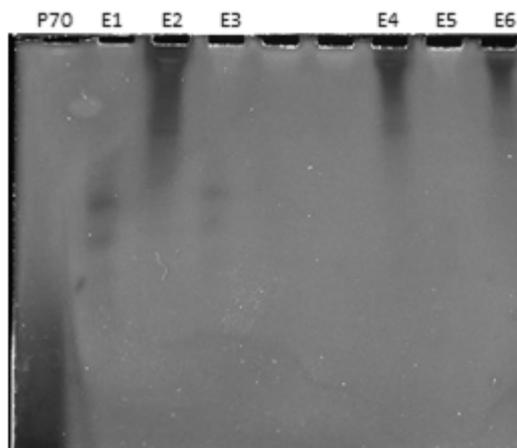


Abbildung 3.3 Urea-PAGE von EAhy926-PolyP nach Extraktion durch Anionenaustauscherharz

Dargestellt ist endogenes PolyP aus EAhy926 mit Verdau durch PPX in der Urea-PAGE nach Säulenaufreinigung mittels etablierter Standardmethode. Die Anfangskonzentration der EAhy926-Zellmenge wurde in E1 & E2 auf $1 \cdot 10^6$, in E3 & E4 auf $0,5 \cdot 10^6$ und in E5 & E6 auf $0,25 \cdot 10^6$ verdünnt. Der PolyP-Verdau erfolgte in den Proben E1, E3 und E5. Ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen ist bei den EAhy926 eine deutliche Restriktion des PolyPs verglichen mit der unverdauten Probe zu erkennen. Bei $0,25 \cdot 10^6$ Zellen verdauten 500 µg/ml PPX das endogene PolyP restlos. Vor allem langkettiges PolyP wurde isoliert.

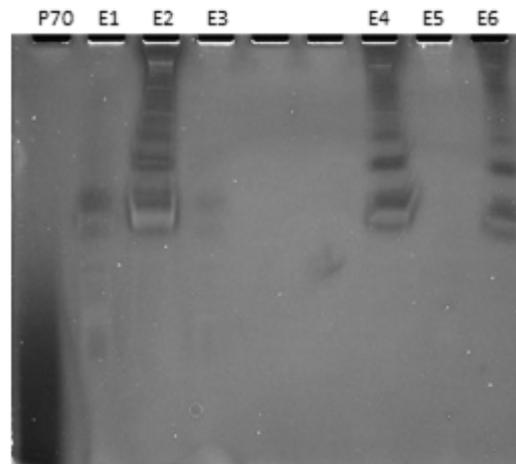


Abbildung 3.4 Urea-PAGE von EAhy926-PolyP nach Extraktion durch Phenol-Chloroform-Aufreinigung

Dargestellt ist endogenes PolyP aus EAhy926 mit Verdau durch PPX in der Urea-PAGE nach zusätzlicher Phenol-Chloroform-Aufreinigung der Proben aus Abbildung 3.3. Somit sind die Proben E1 - E6 zwischen Abbildung 3.3 und 3.4 jeweils identisch und vergleichbar. Die Anfangskonzentration der EAhy926-Zellmenge wurde in E1 & E2 auf $1 \cdot 10^6$, in E3 & E4 auf $0,5 \cdot 10^6$ und in E5 & E6 auf $0,25 \cdot 10^6$ verdünnt. Der PolyP-Verdau erfolgte in den Proben E1, E3 und E5. Ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen ist bei den EAhy926 eine deutliche Restriktion verglichen mit der unverdauten Probe zu erkennen. Bei $0,25 \cdot 10^6$ Zellen verdauten $500 \mu\text{g/ml}$ PPX das endogene PolyP restlos. Bei der Phenol-Chloroform-Aufreinigung ist eine deutliche Auftrennung in Banden des PolyPs zu erkennen. Zusätzlich wurde weiteres, eher kurzkettigeres PolyP isoliert, verglichen mit der eileinigen Säulenaufreinigung.

Simultan zum PolyP-Nachweis in humanen Endothelzellen erfolgte die Analyse des PolyPs in murinen b.End3-Zellen. Bei den b.End3 Zellen genügte das Vorliegen von $\sim 2 \cdot 10^6$ Zellen, um einen erfolgreichen Verdau deren endogenen PolyPs durch Schwächung der Banden darzustellen (Abbildung nicht beigefügt). Durch eine geringere notwendige Vorverdünnung der Proben bzw. eine höhere Zellzahl, um bei gleichen Konditionen wie bei den EAhy926 einen effizienten Verdau aufzuzeigen, liegt es nahe, dass eine geringere Konzentration an endogenem PolyP in den b.End3-Zellen vorliegt. Hierdurch konnte bei den b.End3 bereits bei $1,5 \cdot 10^6$ Zellen der Säulenaufreinigung ein restloser Verdau des PolyPs erreicht werden (Abbildung 3.5). Zudem wurden im Gel bei den murinen Zellen deutlich schmalere Banden des PolyPs festgestellt, verglichen mit einer gleichen Zellzahl der EAhy926, sodass auch dieses für eine geringere Konzentration an endogenem PolyP spricht. Jedoch kann in der Urea-PAGE nur eine semiquantitative Bestimmung von PolyP erfolgen, da bei den durchgeführten Analysen ab einem gewissen Maximum keine Verstärkung der Banden mehr zu erkennen war, obwohl die PolyP-Konzentration noch ansteigend war.

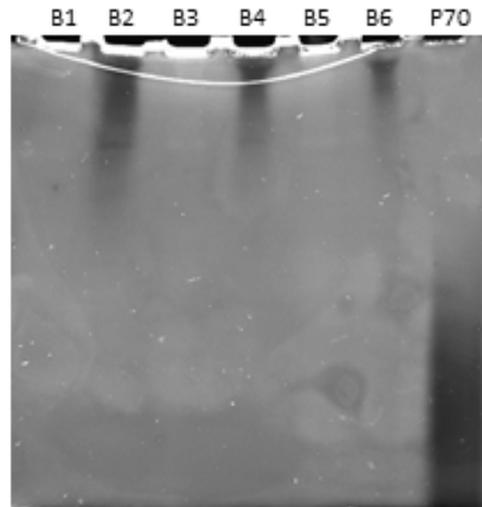


Abbildung 3.5 Urea-PAGE von b.End3-PolyP nach Extraktion durch Anionenaustauscherharz

Dargestellt ist endogenes PolyP aus b.End3 Zellen mit Verdau in der Urea-PAGE nach Säulenaufreinigung. Die Anfangskonzentration der b.End3-Zellenmenge wurde in B1 & B2 auf $1,5 \cdot 10^6$, in B3 & B4 auf $0,75 \cdot 10^6$ und in B5 & B6 auf $0,375 \cdot 10^6$ verdünnt. Der PolyP-Verdau erfolgte in den Proben B1, B3 und B5. In diesem Experiment erfolgte bei den b.End3 bereits bei einer verdünnten Zellzahl von $1,5 \cdot 10^6$ ein restloser Verdau des PolyPs durch 500 $\mu\text{g/ml}$ PPX. Vor allem langkettiges PolyP wurde isoliert.

Durch verschiedene Analysen konnte eine Methode zur Isolierung des endogenen PolyPs von Endothelzellen sowie die Darstellung in der Urea-PAGE erarbeitet werden. Vor allem durch die selektiven Eigenschaften der PPX zur Hydrolyse von PolyP konnte das endogene PolyP sowohl in humanen, als auch murinen Endothelzellen spezifisch nachgewiesen werden. Eine exakte Analyse der Kettenlängen und des absoluten Gehaltes ist anschließend möglich.

3.1.2 *In situ* Nachweis durch Immunfluoreszenz

Nach der Etablierung des Nachweises von endogenem PolyP mittels der Urea-PAGE, sollte anschließend ein direkter Nachweis mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie von intrazellulärem PolyP in Endothelzellen stattfinden. Die PolyP-Sonde PPX Δ 1,2 wurde nach einer im Labor etablierten Methode verwendet (Labberton et al., 2018, Labberton et al., 2016). Diese wurde in der Standardmethode mittels Alexa $_488$ gelabelt, sofern nicht anders erwähnt. Murine und humane Zellen wurden auf den *Chamber Slides* ausgesät, für ~ 24 - 48 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 35 min bei 37 °C mit MitoTracker inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 4% PFA oder Methanol fixiert und anschließend mit der PolyP-Sonde inkubiert sowie mit Antikörpern gefärbt. Zuletzt erfolgte die Eindeckung der Präparate mittels Fluoroshield™ mit DAPI.

Zu Beginn des Projektes erfolgte die PPX Δ 1,2-Inkubation bei 37 °C auf fixierten Endothelzellen, um eine bessere Effektivität der Bindung an das endogene PolyP zu erreichen. Weitere Experimente wurden anschließend jedoch bei RT durchgeführt, da die Sondenbindung unabhängig von der Temperatur äquivalent funktionierte.

Um die Spezifität der Bindung des PPX_Δ1,2 an endogenem PolyP aufzuzeigen, erfolgte die Ko-Inkubation von 100 µg/ml PPX_Δ1,2 gelabelt mit Alexa_488 mit steigenden Konzentrationen von synthetischem PolyP-P70. Diese Spezifität konnte mit Hilfe der kompetitiven Hemmung der Bindung der PolyP-Sonde durch synthetisches PolyP sowohl direkt auf den Zellen, als auch nach Vorinkubation zuvor separat in Reaktionsgefäßen bei 37 °C nachgewiesen werden. P70 sollte in diesem Experiment an PPX_Δ1,2 binden und somit die Bindung an endogenes PolyP verhindern. Analysiert werden konnte dieses sowohl bei humanen als auch bei murinen Endothelzellen. Durch diese Versuchsreihen konnte reproduzierbar eine deutliche Abnahme der Bindung der PolyP-Sonde auf bis zu 14 % Restintensität mit semiquantitativer Bestimmung der Fluoreszenzintensität bei steigender Konzentration des P70 bis auf 500 µg/ml auf den EAhy926-Zellen detektiert werden (Abbildung 3.6). Die Resultate mit 50 und 100 µg/ml zeigten sich dreimal äquivalent.

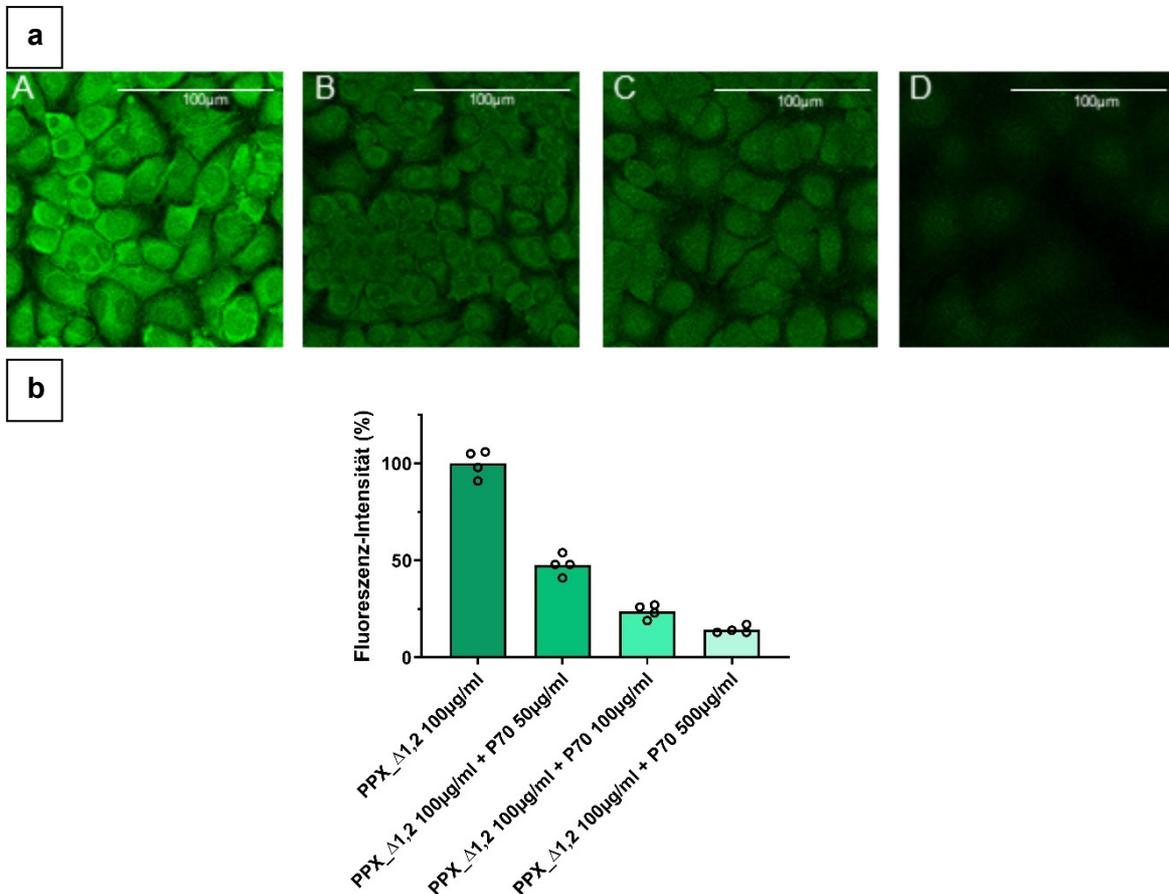


Abbildung 3.6 Kompetitive Hemmung von PPX_Δ1,2 mittels P70

Es erfolgte auf den permeabilisierten EAhy926-Zellen eine Färbung des PolyPs mit 100 µg/ml PPX_Δ1,2 Alexa_488 nach Methanolfixierung und separater Vorinkubation des PPX_Δ1,2 mit P70 bei 37 °C in Reaktionsgefäßen für 1,5 h. Um die Spezifität der Bindung des PPX_Δ1,2 aufzuzeigen, erfolgte eine Blockierung der Sonde mit P70. Eingesetzt wurde reines PPX_Δ1,2 (aA) sowie zusätzlich P70 mit 50 µg/ml (aB), 100 µg/ml (aC) und 500 µg/ml (aD). Die Fluoreszenzintensitäten wurden semiquantitativ analysiert und in b graphisch dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration des P70 die Bindungsaktivität bei aB noch 48 %, bei aC noch 24 %, bis hin zu einer nahezu vollständigen Blockierung des PPX_Δ1,2 bei aD mit einer Restintensität von 14 % erfolgte. Somit wurde die PolyP-Sonde abgesättigt und konnte nicht mehr an das intrazelluläre PolyP der Zellen binden.

Es erfolgte die Analyse von jeweils 4 Blickfeldern. Darstellung der Mittelwerte mit einzelnen Datenpunkte. Die Blockierung mit 50 und 100 µg/ml P70 erfolgte dreimal unabhängig voneinander mit vergleichbaren Resultaten.

Eine Abnahme der Fluoreszenz-Intensität von Alexa_488 zeigt eine verminderte Bindungsaktivität von PPX_Δ1,2 auf dem Zellmonolayer. Zum Vergleich konnte auch bei b.End3 bei simultaner Inkubation der PolyP-Sonde mit dem P70 auf den Zellen eine verminderte Bindungsaktivität analysiert werden und somit die Ergebnisse aus den humanen Zellen bestätigt werden (Abbildung 3.7).

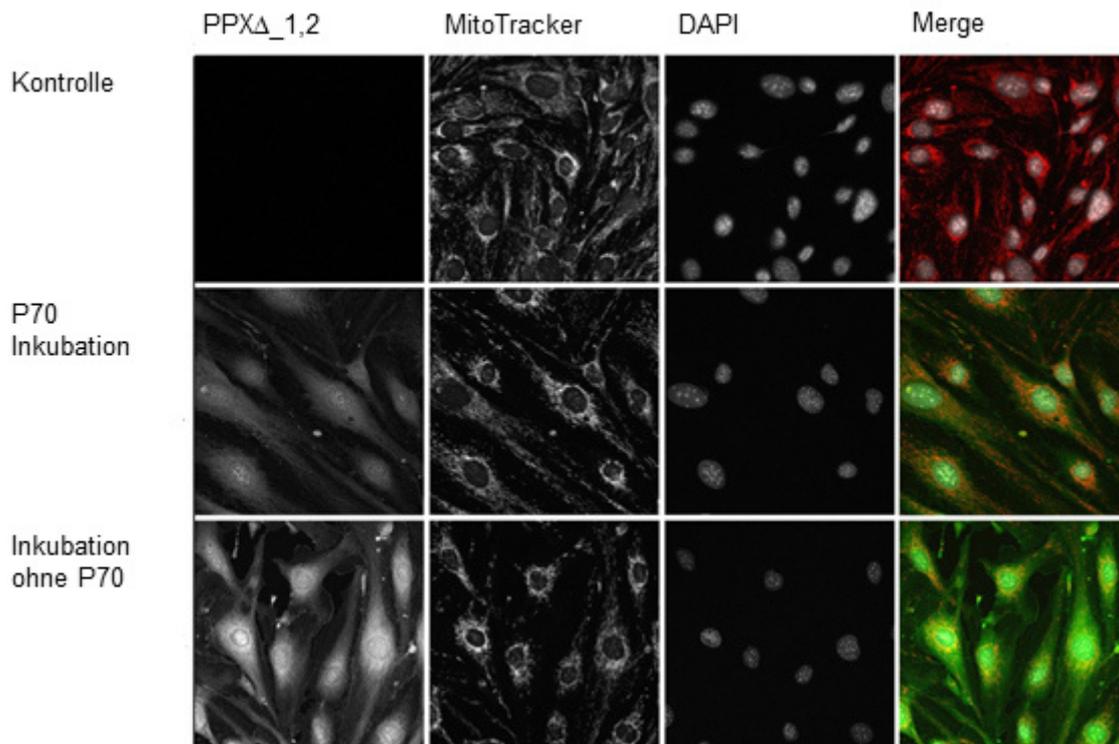


Abbildung 3.7 Fluoreszenzmikroskopie mittels PPX_Δ1,2, MitoTracker und DAPI von b.End3

Dargestellt ist die simultane Anfärbung von PolyP mit der Sonde PPX_Δ1,2 Alexa_488 sowie Mitochondrien mit MitoTracker und die Nuclei mittels DAPI auf b.End3-Zellen mit einer 4 %igem PFA und anschließender Methanolfixierung. Die Negativkontrolle der PolyP-Sonde erfolgte mit Tris. PPX_Δ1,2 Alexa_488 wurde mit einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt und bei „P70 Inkubation“ zeitgleich mit 50 µg/ml P70 inkubiert, um eine Hemmung des Signals durch die Bindung des PPX_Δ1,2 an P70 zu erlangen. Verglichen wurde dieses mit der alleinigen Inkubation von 100 µg/ml PPX_Δ1,2 auf den Zellen. Zu erkennen ist eine Hemmung der Signalstärke des PPX_Δ1,2 Alexa_488, wenn dieses auf den b.End3 Zellen zeitgleich mit synthetischem PolyP abgesättigt wird und somit nicht mehr in voller Konzentration an das endogene PolyP binden kann. Zudem ist eine Konzentrationsanreicherung des PPX_Δ1,2 vor allem um den Nucleus zu erkennen sowie in einzelnen punktuellen Anreicherungen innerhalb der Nuclei. Vermutlich könnten dieses Nucleoli darstellen. Die Blockierung des PPX_Δ1,2 durch P70 auf den b.End3 erfolgte nur einmalig.

Bei einem Versuch vor der Färbung durch die PolyP-Sonde das endogene PolyP der Zellen mit Hilfe von 500 µg/ml inkubiertem PPX zu verdauen, konnte eine deutlich verstärkte Bindungsaktivität verglichen mit der Kontrollprobe festgestellt werden (Abbildung nicht beigefügt). Da PPX eine Exopolyphosphatase und keine Endopolyphosphatase ist, konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, wodurch nach dem Verdau mutmaßlich vermehrt Bindungspartner für das PPX_Δ1,2 Alexa_488 zur Verfügung stehen und somit eine Signalanhebung der Fluoreszenz resultiert.

Zwar konnte eine spezifische Bindung von PPX Δ 1,2 durch kompetitive Hemmung mit synthetischem PolyP nachgewiesen werden, jedoch gab es deutliche Unterschiede in der Intensität der Immunfloreszenzen (Abbildung nicht dargestellt).

3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von PolyP in Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz

Nach der Funktionstestung der PolyP-Sonde sollten Zellspeicher des PolyPs mittels PPX Δ 1,2 Alexa_488 dargestellt werden.

Bei der humanen Zelllinie EAhy926 (Abbildung 3.8) sowie primären HUVECs (Abbildung 3.9) wurde eine vermehrte Bindung des PPX Δ 1,2 mit subzellulärer Lokalisation nahe den Nuclei sowie in Nucleoli-ähnlichen Strukturen festgestellt. Bei den b.End3 Zellen konnte auch eine Bindung der PolyP-Sonde verstärkt im örtlichen Bezug zu den Nuclei der Zellen und in den Zellkernen detektiert werden (Abbildung 3.7). Zudem konnte auch eine Ko-Lokalisation der PolyP-Sonde mit dem MitoTracker bei den b.End3 (Abbildung 3.7), EAhy926 (Abbildung 3.8) und HUVECs (Abbildung 3.9) gezeigt werden.

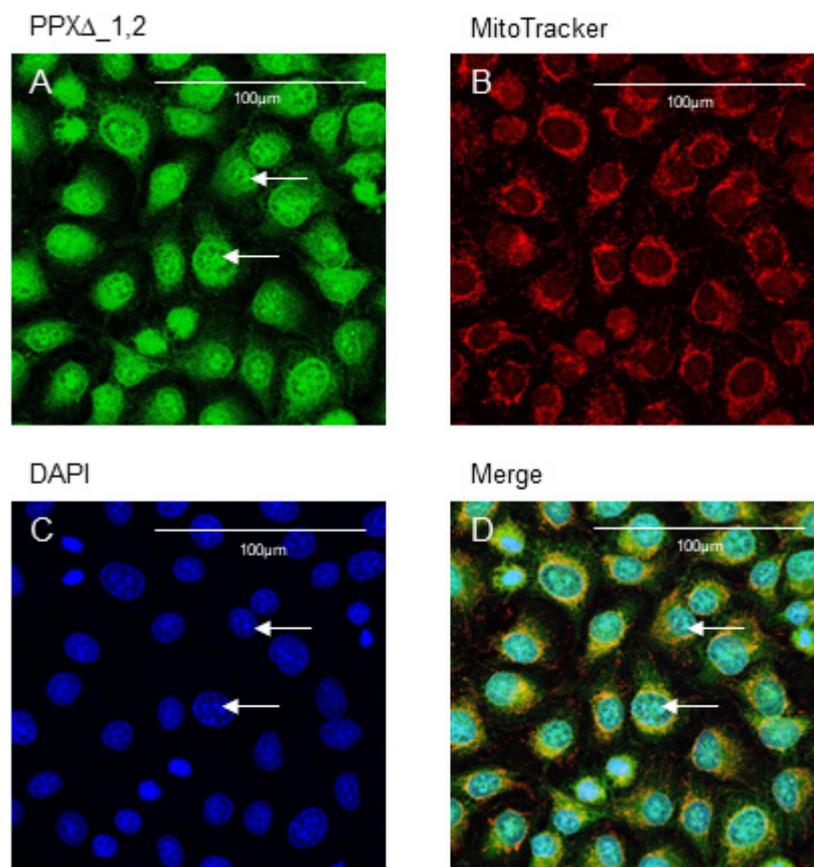


Abbildung 3.8 Anreicherung von PPX Δ 1,2 in den Nuclei von EAhy926

PPX Δ 1,2 mit Alexa_488 (A) wurde auf EAhy926-Zellen eingesetzt mit MitoTracker (B) und DAPI (C). In Abbildung D wurden die Floreszenzen aller Kanäle simultan dargestellt. Zu erkennen ist eine deutliche punktuelle Anfärbung einzelner Spots innerhalb der Nuclei bei einer Wellenlänge von 488 nm, was für eine PolyP Anreicherung im Nucleolus sprechen könnte (siehe weiße Pfeile). Zudem scheint eine Anreicherung in den Mitochondrien vorzuliegen.

Diese Färbung wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt (n=2).

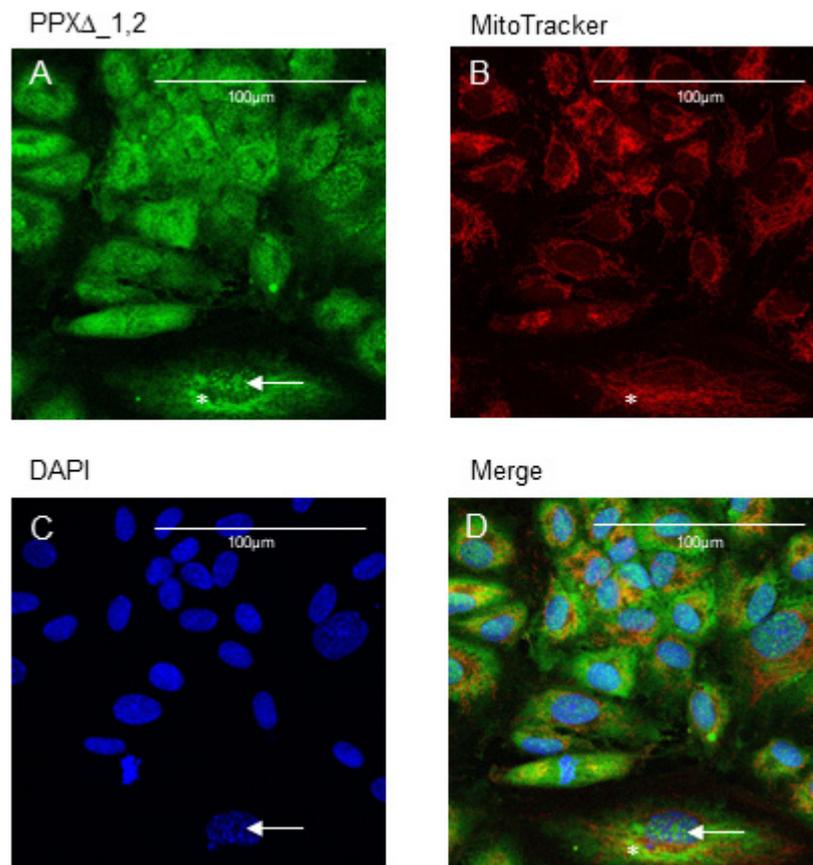


Abbildung 3.9 Anreicherung von PPX_Δ1,2 in den Nuclei und den Mitochondrien von HUVECs

Abgebildet ist die Fluoreszenzmikroskopie der Kontrolle nach siRNA Behandlung. PPX_Δ1,2 mit Alexa_488 (A) wurde auf HUVECs eingesetzt mit MitoTracker (B) und DAPI (C). In Abbildung D wurden die Floreszenzen aller Kanäle simultan dargestellt. Zu erkennen ist eine deutliche punktuelle Anfärbung einzelner Spots innerhalb der Nuclei bei einer Wellenlänge von 488 nm, was für eine PolyP Anreicherung im Nucleolus sprechen könnte (siehe weiße Pfeile). Sowie die Anreicherung an bzw. in den Mitochondrien (siehe weiße Sterne). Passend zu den Deckungsgleichen Ergebnissen aus den EAhy926 wurde diese Färbung bei den HUVECs nur einmal stichprobenartig durchgeführt.

Durch eine Ko-Lokalisation von PPX_Δ1,2 mit den Mitochondrien der Zellen kann eine Anreicherung von PolyP in den Mitochondrien sowohl der untersuchten humanen, als auch der murinen Endothelzellen gezeigt werden. Zudem liegt es durch die pyknotischen Anreicherungen der PolyP-Sonde innerhalb der Zellkerne nahe, dass weitere PolyP-Anreicherungen in den Nucleoli der Endothelzellen vorliegen könnten. Dieses ist jedoch in weiteren Experimenten endgültig zu klären.

Zusätzlich wurde unter anderem auch eine Detektion des endogenen PolyPs mittels der PolyP-Sonde JC-D7 zur Kontrolle ausgetestet. Dieses Fluoreszenzmolekül ist einer Benzimidazolium-Farbstoffbibliothek zugehörig (JC genannt), mit dessen Farbstoffklassen bereits früher selektiv negativ geladene Analyten (wie Heparin) detektiert werden konnten. JC-D7 und JC-D8 konnten hierbei für PolyP verwendet werden (Angelova

et al., 2014). Dieses konnte jedoch in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der Endothelzellen nicht reproduziert werden (Abbildung nicht beigefügt).

3.2 Auswirkungen der siRNA-vermittelten Deletion von *XPR1*

XPR1 wurde 2013 erstmals als einzig bekannter Phosphatexporter in Metazoa entdeckt. Dieser membrangebundene Transporter spielt hiermit eine wichtige Rolle in der Transportfunktion und Phosphathomöostase (Giovannini et al., 2013). Beim Zungengrund-Plattenepithelkarzinom wurde zum Beispiel eine erhöhte Expression an XPR1 mit gesteigerter Proliferation gezeigt, was eine zentrale Rolle für die Pathogenität des Karzinoms zeigen könnte (Chen et al., 2019).

Mittels der *XPR1* siRNA-Transfektion sollte die intrazelluläre PolyP-Menge zwischen der Kontrolle und dem *Knockdown* des Transporters XPR1 verglichen werden, da der Exporter auch für den Transport des PolyPs aus dem Intrazellularraum der Endothelzellen verantwortlich sein könnte (López-Sánchez et al., 2020, Giovannini et al., 2013).

In der Tat konnte in der Urea-PAGE bei den EAhy926 eine Erhöhung des intrazellulären PolyPs mit Hilfe semiquantitativer Bestimmung des PolyP-Gehaltes durch die *Global Background Subtraction* der Banden im Gel festgestellt werden, da ein Verlust des Membranmoleküls durch die siXPR1-Transfektion eine Retention des endogenen PolyPs zur Folge hatte (Giovannini et al., 2013) (Abbildung 3.10). Bei der *Global Background Subtraction* wurde die Intensität der Banden mittels der Software Image Lab ermittelt.

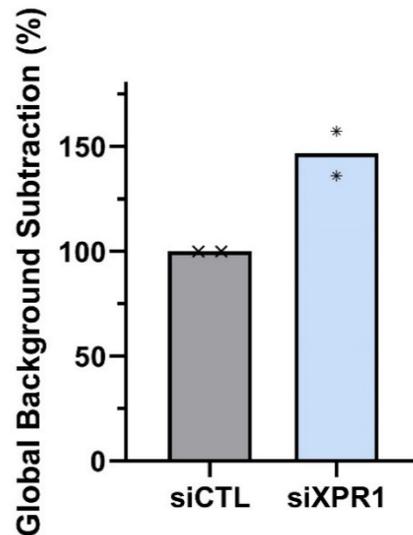


Abbildung 3.10 Retention von PolyP intrazellulär bei EAhy926 nach siXPR1-Transfektion in der Urea-PAGE

Es erfolgte die Kultivierung der EAhy926-Zellen mit anschließender siRNA-Transfektion zum *Knockdown* von *XPR1*. Nach Ende der Transfektion wurden die Zellen der Kontrolle und für den *Knockdown* des *XPR1* jeweils gepoolt um ausreichende Menge an Zellmaterial und somit an PolyP zur Detektion auf dem Urea-Gel zu erhalten. Dargestellt ist die prozentuale Menge an PolyP verglichen mit der Kontrolle. Im Urea-Gel wurde mittels Image Lab die globale Hintergrundsubtraktion (*Global Background Subtraction*) ermittelt. Hierbei wurden die Messwerte der Kontrollen als 100 % PolyP-Gehalt angenommen und der PolyP-Gehalt der Proben nach siXPR1 verglichen. Die Proben nach siXPR1 enthielten mit 136 % und 157 % mehr endogenes PolyP als die Kontrollproben mit regulärer *XPR1*-Aktivität.

Dieses Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Werten unabhängig voneinander durchgeführt (n=2). Dargestellt sind der Mittelwert und die einzelnen Datenpunkte.

Um einen möglichen Einfluss von *XPR1*-Deletion auf die endotheliale Proliferation zu analysieren, wurden die Expressionen von den Proliferationsmarker *CCNB1*, *CCNB2*, *MKI67* sowie *MYBL2* nach siXPR1-Transfektion in HUVECs mittels qPCR untersucht. Hierzu wurden die Zellen ~ 24 h kultiviert, dann transfiziert und nach weiteren 72 h Kultivierung wurde die mRNA isoliert. Durch eine Runterregulation der *XPR1*-mRNA in HUVECs konnte eine Steigerung der Proliferation um das bis zu ~ 2,0-fache detektiert werden (Expression am Beispiel *MKI67* 198 % gemittelt) (Abbildung 3.11).

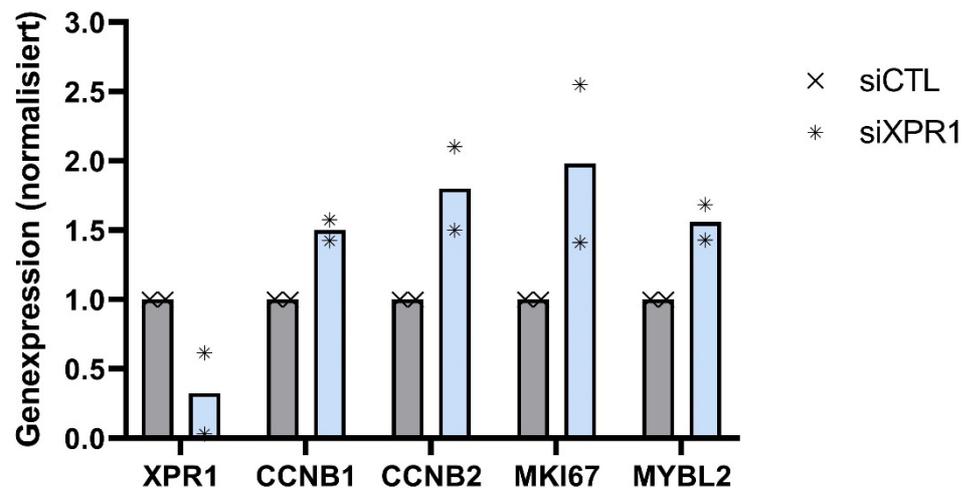


Abbildung 3.11 Hochregulierung von Proliferationsmarkern bei XPR1-Knockdown mittels siRNA in HUVECs

Nach der Kultivierung der HUVECs für ~ 24 h erfolgte die siRNA-Transfektion für 72 h zum *Knockdown* von XPR1. Nach erfolgreichem *Knockdown* des XPR1 betrug die Restaktivität nur noch 32 %. In Folge dessen wurde die Expression der Proliferationsmarker erhöht. Die Expression von CCNB1 betrug 150 %, von CCNB2 180 %, von MKI67 198 % und von MYBL2 auf 156 % gegenüber der auf 100 % gesetzten Kontrolle.

Dieses Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt (n=2). Dargestellt sind die Mittelwerte und die einzelnen Datenpunkte.

Es zeigt sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Expression von XPR1 und der Expression von Proliferationsmarkern bei primären Endothelzellen. Hierbei scheinen die gezeigten Ergebnisse mit reduzierter Expression von XPR1 und damit in Verbindung stehender Überexpression der Proliferationsgene jedoch gegensätzlich zu den vorher gezeigten Ergebnissen von Chen et al., wo eine Überexpression von XPR1 bei Plattenepithelzellen eine Überexpression der Proliferationsmarker zu begünstigen scheint (Chen et al., 2019). Auf Grundlage dieser zuvor gezeigten Ergebnisse wurde von simultanen Prozessen und gleichem Verhalten bezüglich Expression von XPR1 und den Proliferationsmarkern ausgegangen. *Vascular endothelial* (VE)-Cadherin stellt bei Endothelzellen eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle der endothelialen Zellkontakte dar, wodurch auch bei Inflammation die Stabilität und Barrierefunktion des Endothels kontrolliert wird (Frye et al., 2015). Nach der Transfektion mit der XPR1 siRNA sollten zusätzlich Unterschiede zwischen den Zellkontakten durch die Analyse des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin untersucht werden, da ein *Knockdown* von XPR1 als Membrantransporter möglicherweise die Integrität von VE-Cadherin ebenso stören könnte. Zudem scheint VE-Cadherin über Signalwege durch PolyP beeinflusst zu werden (Dinarvand et al., 2020).

Schon in der Kontrolle war bei den HUVECs eine korrekte Ausbildung der Zellkontakte leider deutlich beeinträchtigt (Abbildung 3.12). Dieses Experiment wurde nur einmal

durchgeführt und aufgrund der stark beeinträchtigten Zellkontakte in der Transfektionskontrolle lässt sich keine sichere Aussage über den Einfluss von XPR1 auf die endotheliale Zellkontaktregulation schließen. Hierzu sollte das Experiment wiederholt werden.

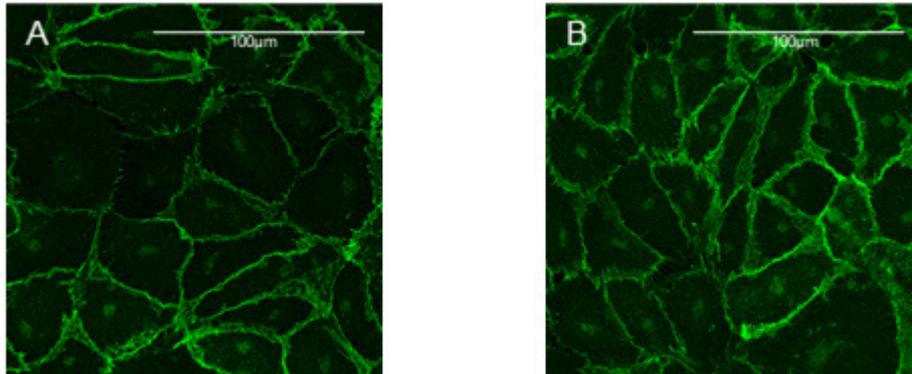


Abbildung 3.12 Zellkontakte von HUVECs mittels VE-Cadherin nach siXPR1-Transfektion

Dargestellt sind die Zellkontakte bei HUVECs mittels VE-Cadherin Färbung nach siXPR1 Transfektion für 72 h. Leider sind die endothelialen Zellkontakte in der Kontrolltransfektion nicht intakt und somit kann keine sichere Aussage über die Beeinträchtigung der Zellkontakte nach siXPR1-Transfektion getroffen werden.

Im Zellkörper von Endothelzellen finden sich die WPBs mit dem darin enthaltenen VWF. VWF ist essentiell für die Hämostase und sorgt bei Exozytose aus den WPBs und Thrombozyten für eine zelluläre primäre Blutstillung durch Bindung der Thrombozyten in Form einer Thrombozytenadhäsion (Vischer and de Moerloose, 1999). Da PolyP ebenso entscheidende Einflüsse in der Hämostase hat, hierbei jedoch bei der plasmatischen Gerinnung (Verhoef et al., 2017), sollten die WBP neben dem VWF zusätzlich auch auf PolyP-Speicher untersucht werden.

Bei der WPB-Analyse nach der siXPR1-Transfektion konnte gezeigt werden, dass nach dem *Knockdown* des *XPR1* intrazellulär weniger Bindung des Von-Willebrand-Faktor Antikörpers (VWF-Antikörper) bei den HUVECs stattfand. Ein Großteil der Zellen zeigt bei diesem Experiment kaum Bindung des spezifischen VWF-Antikörpers und hierbei besteht der Verdacht, dass zahlreiche Zellen keine WPBs mehr besitzen (Abbildung 3.13).

Ebenso wurde in diesem Experiment eine geänderte Morphologie der Mitochondrien festgestellt (Abbildung 3.13).

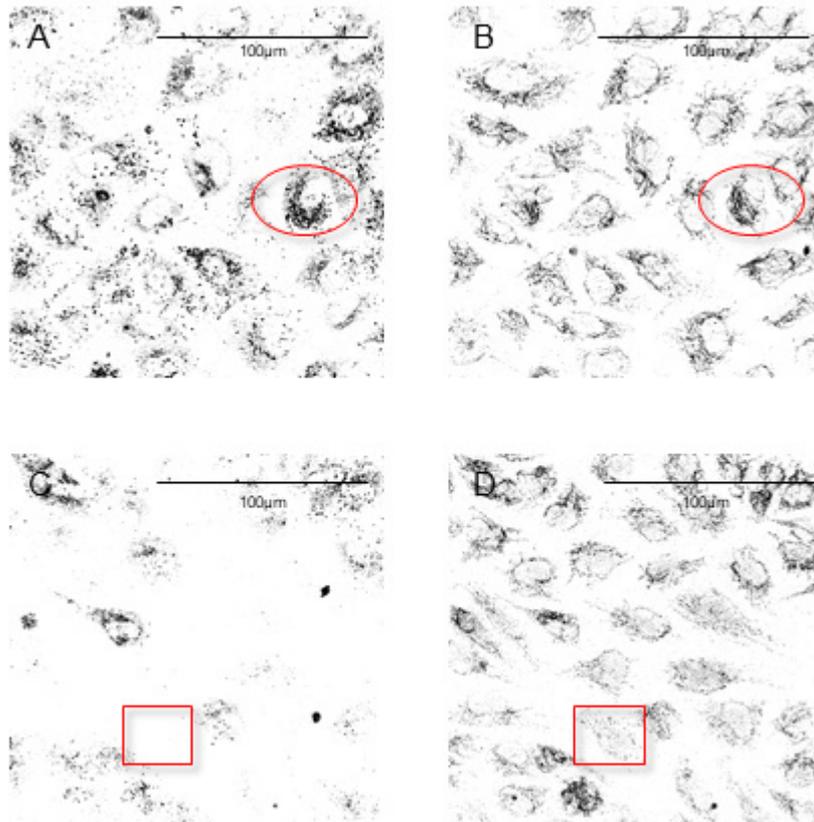


Abbildung 3.13: VWF-Expression nach siXPR1-Transfektion von HUVECs

Gezeigt sind HUVECs nach siRNA-Transfektion. A und B dienen als Kontrolle und es erfolgte eine Kontroll-siRNA-Transfektion. In Darstellung A erfolgte ein Staining mittels eines VWF-Antikörpers und es waren bei einem Großteil der Zellen zahlreiche WPBs aufgezeigt. B stellt den gleichen Bildausschnitt mittels MitoTracker dar. Bei einem unbeeinträchtigten PolyP-Haushalt und einer adäquaten Anzahl an WPBs zeigt sich eine unbeeinträchtigte Morphologie der Mitochondrien der Endothelzellen (rote Ellipsen A und B). Bei C und D erfolgte ein *XPR1-Knockdown* mittels siRNA-Transfektion. Bei C erfolgte ebenso ein Staining mittels VWF-Antikörper mit einer deutlich geminderten Anzahl von WPBs innerhalb der Endothelzellen (rotes Rechteck). D zeigt den gleichen Bildausschnitt mittels MitoTracker, wie C. Hierbei scheint es einen Zusammenhang zu geben, dass eine verminderte Anzahl an WPBs der Zellen mit einer beeinträchtigten Morphologie der Mitochondrien der Zellen in Zusammenhang steht (rote Rechtecke C und D).

Da PPX_Δ1,2 zusätzlich mit einem HIS-Tag ausgestattet ist, wurde hier erstmals nach der siXPR1-Transfektion zudem auch anstatt der gelabelten Sonde ein anti-HIS-Tag-Antikörper zur Sondendetektion genutzt. Hierbei traten verglichen mit den bisherigen Färbungen eher punktuelle Anreicherungen der Fluoreszenz intrazellulär auf (Abbildung 3.14). Verglichen mit der ebenso punktuellen Färbung des VWF-Antikörpers in Abbildung 3.13, könnte dieses eine Anreicherung von PolyP in den WPBs vermuten lassen. Eine Simultanfärbung mit HIS-Tag-Antikörper und VWF-Antikörper konnte leider aufgrund der verwendeten Antikörper nicht durchgeführt werden, um hierfür einen eindeutigen Beweis zu liefern, dass maßgebliche Konzentrationen von PolyP in den WPBs vorkommen. Denn beide Antikörper sind monoklonale Kaninchen-Antikörper (*mAb rabbit*), wodurch eine selektive Bindung der fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper nicht möglich war, um eine Unterscheidung

zwischen gebundenem VWF-Antikörper und HIS-Tag-Antikörper zu treffen.

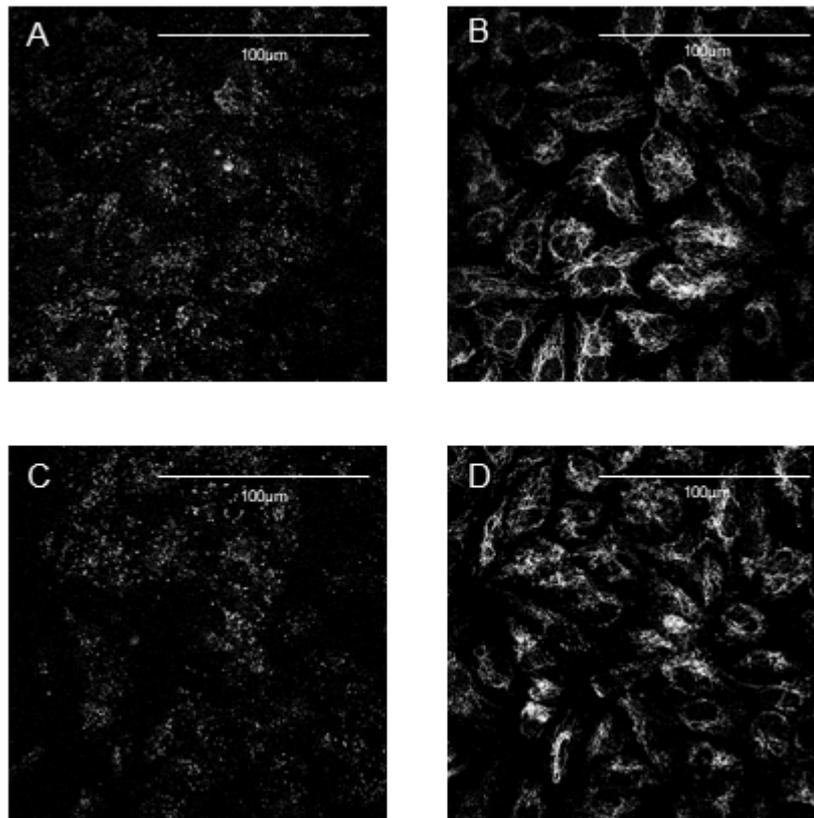


Abbildung 3.14 PolyP-Staining mittels HIS-Tag-Antikörper bei HUVECs

HUVECs nach siRNA-Transfektion direkt auf dem *Chamber Slide*. A und B dienen als Kontrolle und es erfolgte kein *Knockdown* mittels siXPR1. Bei A erfolgte ein Staining mittels ungelabeltem PPX_ Δ 1,2 und HIS-Tag-Antikörper sowie sekundär-Antikörper. Es zeigt sich eine eher punktuellere Anreicherung verglichen mit den eher flächigen Anreicherungen der regulär angewendeten, konventionellen PolyP-Sonde mittels Alexa_488 gelabeltem PPX_ Δ 1,2. Verglichen mit der Färbung der WPBs durch den VWF-Antikörper (Abbildung 3.13 A und C) könnte dies auch eine Lokalisation von PolyP in den WPBs aufzeigen. B zeigt den gleichen Bildausschnitt wie A mit Darstellung der Mitochondrien mittels MitoTracker. Bei C und D erfolgte ein *XPR1-Knockdown* mittels siXPR1-Transfektion. C zeigt ebenso eher eine mögliche punktuellere Anreicherung von PolyP, übereinstimmend mit A, jedoch in einer dezent verminderten Menge. D zeigt den gleichen Bildausschnitt wie C und es zeigt sich eine äquivalente Beeinträchtigung der Mitochondrienmorphologie verglichen mit Abbildung 3.13 D.

Generell waren in den Zellmengen nach siXPR1-Transfektion stets weniger vitale Zellen gegenüber der Kontrolle zu beobachten, bei ansonsten gleichen Wachstumsbedingungen. Es gab eine deutliche Differenz der lebenden Zellmengen zwischen siXPR1-Transfektion und Negativkontrolle bei Auszählungen der Zellkulturplatten nach Aussaat ursprünglich gleicher Zellmengen (Abbildung nicht beigefügt). Dies könnte ein Hinweis für eine reduzierte Viabilität der Endothelzellen aufzeigen. Ob dieses jedoch durch erhöhte Apoptose zu erklären ist, muss in weiteren Versuchen analysiert werden.

4 Diskussion

Seit der Erstbeschreibung von anorganischem PolyP durch Leo Liebermann 1888 in *Saccharomyces cerevisiae* (Liebermann, 1888) erfolgten bereits zahlreiche Untersuchungen, Studien und Veröffentlichungen zu diesem Thema und den multiplen endogenen sowie exogenen Einflüssen von PolyP auf Mikroorganismen (Angelova et al., 2016, Morrissey et al., 2012) bzw. die Homöostase und Hämostase (Verhoef et al., 2017, Montilla et al., 2012). Hierbei gab es auch Vergleiche zu möglichen Extraktionsprotokollen und Quantifizierungsmethoden von endogenem PolyP (Bru et al., 2016).

In Endothelzellen ist bisher unter anderem bekannt, dass PolyP Einflüsse auf die Lumenbildung bei HUVECs nimmt (Müller et al., 2018). Zudem werden mutmaßlich die Zellproliferation (Wang et al., 2003) sowie Zellwachstum und Permeabilität der Zellkontakte beeinflusst (Hassanian et al., 2015).

Eines der Hauptsymptome der chronischen Hyperglykämie ist die Beeinträchtigung der Mikrovaskularisation und damit verbunden unter anderem keine adäquate Wundheilung. Durch die erhöhten Zuckerspiegel sinken bei HUVECs die intrazellulären ATP-Spiegel und es kommt letztendlich zur Apoptose der Zellen (Ido et al., 2002). Durch die Hinzugabe von PolyP zu den HUVECs kann durch die Stabilisierung der ATP-Level eine Apoptose der Zellen vermieden werden, trotz des hyperglykämischen Milieus und durch die somit weiterhin adäquat stattfindende Lumenbildung der Endothelzellen kann die Symptomatik der Mikrovaskularisationsstörung vermieden werden (Wang et al., 2017).

Bisher thematisiert nur eine geringe Anzahl von Veröffentlichungen die Funktion von endogenem PolyP in Endothelzellen. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit dem *Malachite Green Assay* und nach spezifischem PPX Enzymverdau endogenes PolyP in Endothelzellen nachgewiesen. PPX ist ein Enzym aus *E. coli* und verdaut spezifisch PolyP im Gegensatz zur bakteriellen alkalischen Phosphatase, die vor allem ATP, aber auch PolyP als Substrat nutzt (Akiyama et al., 1993). Aufgrund des anfangs unzureichenden Verdau von PolyP durch PPX wurde die mögliche Wirksamkeit zwei verschiedener alkalischer Phosphatasen ausgetestet (Tabelle 3.1). Denn es konnte auch bei alkalischen Phosphatasen hydrolytische Aktivität für PolyP nachgewiesen werden, wobei bei der alkalischen Phosphatase aus *Schistosoma mansoni* vermutlich anti-inflammatorische und anti-thrombotische Aktivitäten durch den Abbau des PolyPs erreicht werden können (Elzoheiry et al., 2019). In diesen präliminären Experimenten konnte jedoch keine Hydrolyseaktivität der verwendeten alkalischen Phosphatasen nachgewiesen werden (Abbildung nicht beigefügt).

Erst nach Anpassung des experimentellen Setups, in Form einer ausreichenden Vorverdünnung des PolyPs, war es möglich PolyP effektiv und nachweislich zu hydrolysieren. Wahrscheinliche Ursache war der verbesserte Zugang des Enzyms an die PolyP-Ketten. Zusätzlich sorgte eine Optimierung der Anwendung weiterer verwendeter Enzyme sowie zahlreiche Austestungen verschiedener Testkits und Materialien für eine reproduzierbare Extraktion von PolyP aus Endothelzellen.

Besonders diese Schrittfolge der Extrahierung mit Verdau und die folgende Urea-PAGE führten einige Probleme mit sich und gestalteten sich im Prozess deutlich langwieriger, als erwartet. In den letzten Jahrzehnten gab es zahlreiche Veröffentlichungen zu anorganischem PolyP mit ebenso vielen Varianten zur Aufreinigung und Darstellung von PolyP. Da sowohl das QIAquick® *Gel Extraction Kit*, als auch das QIAprep® *Spin Miniprep Kit* laut Herstellerangaben zur Aufreinigung von DNA vorgesehen sind, kam es vor allem anfangs zu deutlichen Störungen in den Gelen und deren Auswertung durch einen Überschuss an DNA. Trotz Nutzung nach Herstellerangaben zeigten anfängliche DNasen I mit Hinzugabe von $MgCl_2$ und Proteinase K keine ausreichende Effektivität, um störende DNA vollständig zu entfernen (Kumble and Kornberg, 1995). Erst mit der Nutzung des TURBO *DNA-free*™ Kits der Firma Invitrogen konnte die DNA der Endothelzellen in dieser Arbeit zufriedenstellend verdaut werden. Zudem mussten Proteinase K und $MgCl_2$ nicht verwendet werden, da kein positiver Effekt darstellbar war. Die zwischenzeitliche Umstellung des verwendeten Testkits der Firma Qiagen erfolgte aufgrund einer höheren Ausbeute des extrahierten PolyPs. Die höhere Ausbeute durch das QIAprep® *Spin Miniprep Kit* basiert vermutlich auf einer höheren Bindungskapazität von bis zu 20 µg auch großer Plasmid DNA >10 kB (siehe Herstellerangaben QIAprep® *Miniprep Handbook*), im Gegensatz zu maximal 10 µg Bindungskapazität von 70 bp – 10 kB dsDNA des QIAquick® *Gel Extraction Kit* (siehe Herstellerangaben QIAquick® *Spin Handbook*). Somit scheint die höhere Bindungskapazität von DNA des Anionenaustauscherharzes auch auf die maximale Bindungskapazität von PolyP übertragbar zu sein.

Bei früheren Veröffentlichungen fanden vor allem die Methoden der Phenol-Chloroform-Aufreinigung und die Verwendung von Anionenaustauscherharzen in Säulen Anwendung in der Extraktion von PolyP. Hierbei können auch verschiedene Kettenlängen des PolyPs extrahiert werden (Bru et al., 2016). Deshalb fand auch die Kombination beider Methoden in dieser Arbeit Verwendung. Bei der anschließenden Phenol-Chloroform-Aufreinigung konnten noch weitere kurzkettigere PolyP-Polymere extrahiert werden, als bei alleiniger anionenaustauscherbasierter Extraktion. Zudem scheint trotz der höheren Bindungskapazität des Harzes aus dem QIAprep® *Spin Miniprep Kit*, im Gegensatz zum QIAquick® *Gel Extraction Kit*, ein großer Anteil des PolyPs nicht gebunden zu werden und kann somit durch die anschließende Aufreinigung des ersten

Durchlaufes der Säulen mit Hilfe einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung mit Präzipitation am Ende letztendlich noch hinzukommend extrahiert werden. Die mögliche Ausbeute des PolyPs wird gesteigert und könnte somit zudem quantifiziert werden, um einen möglichen Anhalt des endogenen Gesamtgehaltes der Endothelzellen zu ermitteln.

Vor allem anfangs gab es stark schwankende und kaum reproduzierbare Ergebnisse bei der Extraktion und Darstellung des PolyPs auf den Urea-PAGE mit keinem nachweisbarem Verdau durch PPX. Nichtsdestotrotz konnte in dieser Arbeit nach zahlreichen Versuchsreihen als bisher beste Methode zur Extraktion des endogenen PolyPs aus den Endothelzellen die Aufreinigung mittels Anionenaustauscherharz mit erhöhter Bindungskapazität sowie zusätzliche Phenol-Chloroform-Aufreinigung mit Präzipitation des ersten Säulendurchlaufes erzielt werden. Störende DNA wurde effektiv mittels TURBO *DNA-free*[™] entfernt und führte zu einer störungsfreien Darstellung vor allem langkettigeren PolyPs. Die Ursache der störenden Ladungsunterschiede der Phenol-Chloroform-Aufreinigung und den damit beeinträchtigten Lauf der Banden in der Urea-PAGE (Abbildung 3.2 weißer Pfeil) konnte nicht abschließend geklärt werden. Jedoch führte die oben genannte Methode meist zu einer sauberen Elektrophorese. Durch die Spezifität bezüglich seines Substrates konnte der Nachweis des PolyPs in den Gelen durch einen Verdau mit der eingesetzten PPX erbracht werden (Akiyama et al., 1993). Alternativ könnte als enzymatischer Nachweis mittels PPK die Konversion von PolyP zu ATP dargestellt werden (Kumble and Kornberg, 1995).

Unabhängig von der angewandten Methode der Aufreinigung und der Weiterverwendung des PolyPs, sollte stets auf den pH-Wert geachtet werden. Denn vor allem im sauren Milieu scheint PolyP sehr instabil zu sein (Harold, 1966, Bru et al., 2016). Trotz Hinzugabe gleicher Substanzen während einzelner Versuchsreihen und ähnlicher pH-Werte, fanden sich dennoch häufig schwankende Resultate, die eine Vergleichbarkeit der einzelnen Experimente erschwerten.

Primär durch den Einsatz der PolyP-Sonde PPX Δ 1,2 konnten in der Fluoreszenzmikroskopie subzelluläre Lokalisationen von PolyP in den Endothelzellen dargestellt werden. Da es aufgrund der instabilen und repetitiven Struktur des PolyPs keine einsetzbaren Antikörper gibt, findet häufig die Verwendung des PPX Δ 1,2 statt, da diese Rekombinante des PPX an PolyP bindet, dieses jedoch nicht hydrolysiert (Labberton et al., 2016). Durch die Kopplung mit Alexa $_488$ kann somit eine Bindung an PolyP mittels Fluoreszenz aufgezeigt werden. Da das Enzym PPX aus *E. coli* auch synthetisches PolyP effektiv hydrolysiert (Abbildung nicht beigefügt) und selbiges auch für andere Exopolyphosphatasen zutrifft (Zhang et al., 2016), kann davon ausgegangen werden, dass PPX Δ 1,2 somit kompetitiv durch die Hinzugabe von P70 an der Bindung an endogenes PolyP der Endothelzellen gehemmt werden kann. Da je nach hinzugefügter Konzentration

des P70 eine nahezu vollständige Hemmung des intrazellulären PolyP-Sondensignals PPX_Δ1,2 Alexa_488 erreicht werden konnte, dient dieses somit als spezifischer Nachweis für das Vorhandensein und die Lokalisationen des endogenen PolyPs *in vitro*.

Bei den Fluoreszenzmikroskopien in dieser Arbeit fanden sich bei den Zelltypen b.End3, EAhy926 und HUVEC in verschiedenen subzellulären Lokalisationen Anreicherungen von PolyP. In den Nuclei aller drei Zelltypen fanden sich pyknotische Anreicherungen, welche möglicherweise Nucleoli darstellen könnten. Denn bereits bei *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der afrikanischen Schlafkrankheit, konnten maßgebliche Mengen an PolyP in den Nucleoli der Parasiten detektiert werden (Negreiros et al., 2018, Cordeiro et al., 2019). Hierbei könnte PolyP in den Zellkernen durch die nötige Phosphorylierung zahlreicher Enzyme an der Regulation der Genexpression beteiligt sein und zum anderen eine Rolle bei der RNA-Protein-Interaktion spielen. Zudem gibt es Vermutungen, dass die membranlosen Nucleoli mit Hilfe von PolyP durch Phasentrennung innerhalb der Nuclei in ihrer kugelähnlichen Struktur gehalten werden (Negreiros et al., 2018).

Es gibt hierbei Übereinstimmungen in Bezug auf die genaue subzelluläre Lokalisation des PolyPs zwischen beispielsweise *Trypanosoma brucei* und den untersuchten Endothelzellen, was für Parallelen hinsichtlich Funktionsweisen zwischen primitiven Parasiten sowie Zellen und grundlegende Zellfunktionen des PolyPs im Zellkern sprechen könnte.

Neben den Nuclei wurde eine Akkumulation von PolyP in den Mitochondrien der Endothelzellen aufgezeigt. Hierbei zeigte sich bei allen drei untersuchten Subgruppen der Endothelzellen eine Ko-Lokalisation von PolyP sowohl direkt in den Mitochondrien, als auch in unmittelbarer örtlicher Nähe zu diesen Zellorganellen (Abbildung 3.7, 3.8, 3.9). PolyP spielt durch den ständigen Austausch mit ATP eine entscheidende Rolle für den Zellmetabolismus und den Energiehaushalt der Zellen. So wird bei HUVECs durch Hinzugabe von PolyP unter anderem ein Anstieg an ATP verursacht, was letztendlich durch verschiedene Mechanismen zu einer verstärkten Lumenbildung der Endothelzellen führt (Müller et al., 2018). Als Syntheseort für PolyP in Säugetieren und höheren Lebensformen wurden je nach Energiezustand der Zellen bereits Mitochondrien aufgezeigt (Pavlov et al., 2010). Als Enzym scheint hierbei die F_0F_1 -ATPase der Mitochondrien sowohl für Produktion, als auch Hydrolyse verantwortlich zu sein (Baev et al., 2020). Durch die in dieser Arbeit aufgezeigten Anreicherungen von PolyP in den Mitochondrien, würden diese ebenso bei den Endothelzellen als möglicher Syntheseort für das ATP aus PolyP bzw. ein möglicher Syntheseort für PolyP naheliegen. Um dieses jedoch letztendlich zu bestätigen, müssten weitere Versuche durchgeführt werden, wo zum Beispiel durch Einsatz von ATPasen schwankende Gehalte an PolyP in und um die Mitochondrien dargestellt werden könnten.

Gegensätzlich hierzu scheint es bei einigen Trypanosomen und deren Unterformen jedoch keine Ko-Lokalisation der verwendeten Polyphosphat-Bindedomäne aus *E. coli* und MitoTracker zu geben, was bei diesen gegen eine Anreicherung von PolyP in den Mitochondrien spricht (Negreiros et al., 2018). Somit zeigen sich bei der Anreicherung von PolyP in den Nuclei parallelen zwischen diesen Parasiten und den Endothelzellen, was für die essentielle Bedeutung von PolyP bei Signalwegen innerhalb der Zellkerne sprechen würde. Jedoch anscheinend Gegensätze hinsichtlich der möglichen Synthese von ATP aus PolyP als Energieform endogen.

XPR1 ist ein Oberflächenrezeptor und derzeit der einzig bekannte Exporter für Phosphat in Metazoa (Giovannini et al., 2013). Zudem scheint *XPR1* über Signalkaskaden beeinflussend auf die Proliferation von Zellen wirken zu können, da beim Plattenepithelkarzinom der Zunge die gesteigerte Aktivität von *XPR1* mit verstärkter Proliferation der Zellen zu korrelieren scheint und damit zusammenhängend ein schlechteres Outcome für die Patienten mit sich zieht (Chen et al., 2019).

Es wurde gezeigt, dass eine LOF-Mutation von XPR1 zur Akkumulation von Phosphat in Gefäßmuskelzellen und Perizyten führt, was zu einer Ablagerung von Kalziumphosphat innerhalb der Zellen führt (López-Sánchez et al., 2020). XPR1 scheint hierbei für einige Zelltypen (nachgewiesen zum Beispiel bei HAP1-Zellen) eine der zentralen Rollen für die Phosphathomöostase der Zellen zu spielen (López-Sánchez et al., 2020) und könnte in Bezug auf PolyP ebenso eine wichtige Rolle für den ausgeglichenen Zellstoffwechsel spielen. So wurde bei Thrombozyten bereits aufgezeigt, dass XPR1 auch bei der Regulation des PolyP-Gehaltes eine entscheidende Rolle einnimmt. Hierbei führt eine Gendeletion von XPR1 zu einer Akkumulation von PolyP innerhalb der Thrombozyten von Mäusen (Mailer et al., 2021). Ein steigender PolyP-Gehalt bei einem *Knockdown* von XPR1 in Endothelzellen wäre somit übereinstimmend zu diesen Ergebnissen.

Nach semi-quantitativer Bestimmung mittels *Global Background Subtraction* der Proben aus EAhy926 in der Urea-PAGE wurden erhöhte Konzentrationen an PolyP nach siXPR1-Transfektion ermittelt (Abbildung 3.10). Die Ergebnisse entsprachen zunächst den grundlegenden Erwartungen, da ein Defekt des Membranmoleküls die Retention des endogenen PolyPs zur Folge haben würde (Giovannini et al., 2013, Mailer et al., 2021). Bei Ergebnissen von Giovanni et al. 2013 wurde in HEK293T nach einem *Knockout* des *XPR1* ermittelt, dass im ursprünglich phosphatfreien Medium nach dem *Knockout* weniger Phosphat im Medium außerhalb der Zellen akkumulierte. Verglichen mit der Kontrolle ist nach *XPR1-Knockout* bei HEK293T, HeLa sowie U2OS Epithelzellen deutlich weniger Ausfluss des endogenen Phosphates detektierbar (Giovannini et al., 2013). Dieses würde ebenso für eine Akkumulation des Phosphates bzw. PolyPs intrazellulär sprechen, da durch mangelnde Aktivität von XPR1 der Export des Phosphates nicht mehr erfolgreich stattfinden

kann. Zudem sind in Zellen wie HEK- und HCT-Zelllinien Ergebnisse vorbeschrieben, dass ein *XPR1-Knockdown* zu einem Anstieg des intrazellulären ATPs und Phosphates führte (López-Sánchez et al., 2020).

Es konnte in dieser Arbeit aufgezeigt werden, dass bei einer siXPR1-Transfektion der HUVECs der *Knockdown* von XPR1 zu einer Steigerung der Expression der Proliferationsmarker *CCNB1*, *CCNB2*, *MKI67* und *MYBL2* auf bis zu dem ~2,0-fachen führt (Abbildung 3.11). Gegenätzlich jedoch zeigten Untersuchungen von W. Chen et al., dass eine gesteigerte *XPR1*-Aktivität im Zungengrund-Plattenepithelkarzinom über eine Aktivierung von NF-κB zur Steigerung der Proliferation beiträgt und ein *Silencing* des *XPR1* zu einem verminderten Tumorstadium führte (Chen et al., 2019). XPR1 wurde vor allem auch als G-Protein gekoppelter Rezeptor identifiziert, der über eine gesteigerte Produktion des cyclischen AMP die Aktivität der Proteinkinase A erhöht. Somit kann es zur gesteigerten Aktivität von NF-κB beitragen sowie zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden. Bei einem *Knockdown* des *XPR1* können gegensätzliche Effekte auftreten (Chen et al., 2019, Vaughan et al., 2012).

Das reduzierte PolyP bei einem *XPR1-Knockdown*, wie am Beispiel der EAhy926 gezeigt (Abbildung 3.10), könnte auch die Proliferation durch die aktivierende Wirkung auf mTOR beeinflussen und erhöhte Mengen an PolyP intrazellulär somit bei Malignomen zum Wachstum der Tumoren beitragen (Kulakovskaya et al., 2018). Die Einflüsse auf Proliferation und Inflammation durch direkte Aktivierung von NF-κB und mTOR durch PolyP wurden auch durch Hassanian et al. 2015 verdeutlicht (Hassanian et al., 2015). Denn bei HUVECs werden durch PolyP über Wechselwirkungen mit den Rezeptoren *Receptor for Advanced Glycation End Products* (RAGE) sowie den purinergen Rezeptor P2Y1 die Komplexe mTORC1 und mTORC2 aktiviert (Hassanian et al., 2016). Da ATP seit Jahrzehnten als essentiell für den Energiemetabolismus der Zellen angesehen wird (Bonora et al., 2012) könnte durch die erhöhten PolyP-Gehalte und den damit zusammenhängenden Anstieg des ATPs (Baev et al., 2020) zusätzlich die Proliferation begünstigt werden. Bestätigend für die These, dass möglicherweise auch ein *XPR1-Knockdown* über steigendes PolyP intrazellulär für eine Proliferation sorgen könnte, wären die Ergebnisse der qPCR der Proliferationsmarker aus der siXPR1-Transfektion der HUVECs. Denn trotz des erfolgreichen *Knockdowns* wurde eine vermehrte Aktivität der Proliferationsmarker in der qPCR detektiert (Abbildung 3.11). Ursächlich könnte die bereits oben erwähnte gesteigerte Aktivität der Proliferation über mTOR durch das endogene PolyP sein (Hassanian et al., 2015) oder die erhöhten Energielevel durch Steigerung des ATPs (Baev et al., 2020).

Der *Knockdown* von *XPR1* beeinflusste zusätzlich den endogenen Gehalt von VWF oder möglicherweise auch generell das Vorhandensein der WPBs. Denn bei der Behandlung mit

siXPR1, verglichen mit der Kontrolle, gab es im durchgeführten Experiment einen Großteil der Zellen in denen intrazellulär keine Bindung mehr des VWF-Antikörpers stattfand oder eine deutlich geminderte Bindung (Abbildung 3.13). Bei Biswas et al. wurde eine dosisabhängige vermehrte Freisetzung des VWF durch zugefügtes synthetisches PolyP festgestellt und Hinweise, dass die WPB-Exozytose an der VWF-Freisetzung beteiligt ist (Biswas et al., 2018). Ausgehend davon, dass der *XPR1-Knockdown* eine Erhöhung des intrazellulären PolyPs durch einen gestörten Export zur Folge hat, wäre dieses äquivalent zu der beobachteten VWF-Abnahme bzw. einer möglichen Freisetzung über eine Exozytose der WPBs.

Auffällig war zusätzlich in diesem experimentellen Setup die Veränderung der Mitochondrienmorphologie nach dem *Knockdown* von *XPR1*. Zuvor wurde in Versuchsreihen bereits gezeigt, dass Veränderungen des zellulären PolyP-Gehalts Einfluss auf die Mitochondrien haben kann. Der schwankende PolyP-Gehalt begünstigt die Bildung unlöslicher Kalzium-Phosphat-Präzipitate, was wiederum einen Einfluss auf das freie intrazelluläre Kalzium hat (Solesio et al., 2016). Unter zellulären Stressbedingungen könnte PolyP über die Komplexbildung mit Kalzium ein maßgeblicher Aktivator der mPTP sein und durch eine Kalzium-abhängige Öffnung der Pore die Permeabilität verändern. Hierdurch wird das mitochondriale Membranpotenzial abgebaut und die ATP-Produktion gehindert, was letztendlich auch zum Zelltod führen kann (Seidlmayer et al., 2012, Elustondo et al., 2016).

PolyP kann durch die Rolle der Mitochondrien in Bezug auf den Kalziumhaushalt, Einfluss auf den gesamten Zellmetabolismus sowie das Zellüberleben und endotheliale Dysfunktionen nehmen (Tang et al., 2014). Denn Kalzium/Calmodulin-abhängig kann auch die Genexpression der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) zur Beeinträchtigung der Barrierefunktion, der Motilität und der Ausbildung des Actin-Zytoskelettes der Endothelzellen beeinträchtigt werden (Cai et al., 2008). Dieses könnte eine der Erklärungen sein, warum zwischen den Proben mit siXPR1 und den Kontrollen eine deutliche Differenz der vitalen Zellen auffiel nach der Inkubation. Die Zellzahlen nach siXPR1-Transfektion waren stets sowie meist deutlich geringer und bei anschließenden Experimenten mussten hierbei die Zellzahlen der Kontrollen angeglichen werden, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen (Abbildung nicht beigefügt).

Es konnten mit Hilfe der siXPR1-Transfektion die Folgen auf die Proliferationsgene verdeutlicht werden und zudem können weitere Hinweise auf tiefgreifende Folgen der Zellhomöostase, des endogenen PolyP-Gehaltes und einzelne Zellorganelle gegeben werden. Die genauen Einflüsse und Konsequenzen hieraus für den Zellmetabolismus müssen jedoch durch anschließende Arbeiten genauer ergründet werden.

Relevant für die Entwicklung von humanen Therapeutika, welche in Verbindung mit PolyP stehen, scheinen aktuell vor allem der Einfluss auf die Inflammation und die Hämostase zu sein.

Aufgezeigt wurden diese Einflüsse und die Findung möglicher neuer Targets zur Therapie bisher vor allem durch exogen zugeführtes PolyP. So konnte auf zellulärer Ebene eine direkte Verbindung der Endothelzellen mit vor allem den Neutrophilen Granulozyten aufgezeigt werden. Hierbei verstärkt zugeführtes PolyP das *Rolling* der Granulozyten an der Gefäßwand mutmaßlich durch P-Selektin sowie *anti-P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1), zudem es kann zu einer erhöhten Leukozytenakkumulation und -rekretierung kommen (Du et al., 2019).

Vor allem bei kurzkettigem PolyP mit einer Länge von 45 – 70 Einheiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Vermittlung der Signalwege über NF- κ B stark pro-inflammatorisch wirkt. Dosisabhängig wurde vor allem auch die Barriere durchlässigkeit der vaskulären Endothelzellen am Beispiel der HUVECs dargestellt (Bae et al., 2012). Zudem erhöht PolyP bei der intraperitonealen Injektion die Extravasation im Mausmodell und die Migration von Leukozyten aus den Gefäßen heraus. Interessanterweise konnte dies durch die Gabe von aktiviertem Protein C vor der Verabreichung von PolyP verhindert werden. Somit scheint aktiviertes Protein C ein kompetenter Antagonist der PolyP-vermittelten Inflammation *in vivo* sowie *in vitro* zu sein und ein Protektor der zytotoxischen Wirkung (Bae et al., 2012).

Es könnten zukünftig verschiedene Ansätze zur Therapie von Inflammationen dienlich sein. Im Falle der PolyP vermittelten Entzündung könnten aktiviertes Protein C (Bae et al., 2012) und zukünftig entwickelte Antikörper oder vergleichbares gegen die P-Selektin bzw. PSGL-1-PolyP-Interaktion (Du et al., 2019) eine Milderung des Verlaufs bewirken. Des Weiteren konnte eine protektive Wirkung von Lysozym nachgewiesen werden, da durch Substitution die PolyP-vermittelte proinflammatorische Wirkung auf HUVECs, die vaskuläre Permeabilität, inflammatorische Biomarker, Migration von Leukozyten deutlich gemildert wurden sowie Produktion von NF- κ B und *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) deutlich gehemmt (Chung et al., 2016). Ob jedoch ursprünglich gesteigerte Gehalte an PolyP eine Inflammation triggern können und somit eine Ursache für den Beginn einer Inflammation sein können oder möglicherweise durch die vorher stattfindende Entzündungsreaktion der endogene Gehalt an PolyP in den Endothelzellen steigt, wodurch die Inflammation verstärkt wird, sollte durch weitere Untersuchungen analysiert werden. Hierfür könnte anfangs das zelleigene PolyP mit und ohne Entzündungsreaktion zum Beispiel mittels TNF- α verglichen werden, ob es deutliche Unterschiede im absoluten Gehalt an PolyP gibt. Da der Einfluss von PolyP zusätzlich zur Inflammation die Hämostase betrifft, könnten übergreifende Therapieansätze hierfür zukünftig gefunden werden.

Unabhängig von genannten Prozessen wurde bei PolyP nun auch eine mögliche Hinderung viraler Infektionen nachgewiesen, durch eine Blockierung der Interaktion des Spike Proteins mit dem *Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor* (ACE2-Rezeptor) bei dem Virus SARS-CoV-2. Hierbei werden die Viren nicht in die Zellen aufgenommen, wodurch eine Replikation des Virus nicht stattfinden kann und folglich eine Infektion des Organismus vermieden werden könnte (Schepler et al., 2021, Neufurth et al., 2020). PolyP könnte als mögliche Behandlungsmaßnahme durch Blockierung der ACE2-Rezeptoren bei SARS-CoV2 Infektionen dienen (Schepler et al., 2021) bzw. als mögliches Therapeutikum in Form eines PolyP-haltigen Nasensprays eine potentiell mögliche Prävention schaffen (Neufurth et al., 2020). Durch die Aufnahme der Viren entsteht unter anderem eine Endothelitis und Endothelzellendysfunktion vor allem in Lunge, Herz und Nieren bei der *Coronavirus Disease 2019* (COVID-19) (Zhang et al., 2020). Häufige Komplikationen bei Patienten mit COVID-19 ist das Auftreten von Lungenembolien und Venenthrombosen (Suh et al., 2021). Durch die Entzündungsreaktion und Endothelzellendysfunktion könnte eine Aktivierung der Thrombozyten stattfinden und erhöhte Werte an VWF und Fibrinogen wurden bei Patienten mit COVID-19 diagnostiziert (Zhang et al., 2020). Als mögliche Hypothese könnte jedoch auch durch die fortgeschrittene Endothelitis und den Untergang der Zellen eine größere Menge des PolyPs der Zellen freigesetzt werden, was zur Aktivierung von FXII führen könnte und hierbei die Embolien bzw. Thrombosen hervorruft. Auch dieses könnte durch folgende Untersuchungen weiter thematisiert werden.

5 Zusammenfassung

Anorganisches Polyphosphat (PolyP) ist ein Polymer bestehend aus wenigen bis hin zu einigen hunderten Orthophosphaten, welche durch energiereiche Phosphoanhydridbindungen verbunden sind. Beim Menschen spielt PolyP eine wichtige Rolle bei der Gerinnung, indem bei der Aktivierung von Thrombozyten an deren Zelloberfläche PolyP präsentiert wird und den Gerinnungsfaktor XII (FXII) dadurch aktiviert.

Auch andere humane Zellen besitzen PolyP, jedoch ist die Lokalisation und Funktion bei vielen Zelltypen nicht erforscht. Ziel dieser Arbeit war es endogenes PolyP in Endothelzellen (EZs) nachzuweisen und subzelluläre Lokalisation sowie Funktionen von PolyP zu analysieren.

Methodisch erfolgte zunächst die Detektion von endogenem PolyP in humaner Endothelzelllinie mittels des *Malachite Green Assays*. Ergänzend wurde hierzu PolyP in murinen und humanen Endothelzelllinien sowie *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) nach der neu überarbeiteten Methode der PolyP-Extraktion in der Urea-PAGE analysiert. Der Nachweis erfolgte hierbei jeweils durch den spezifischen Verdau des PolyPs durch die Exopolyphosphatase aus *E. coli* (PPX). Der mikroskopische *in situ* Nachweis der (sub-) zellulären Lokalisation wurde mit der PolyP-Sonde PPX_Δ1,2 durchgeführt. Die PolyP-Sonde ist eine gentechnisch modifizierte Exopolyphosphatase und bindet an PolyP, hydrolysiert dieses jedoch nicht. Die Spezifität der Färbung wurde bestätigt durch eine kompetitive Hemmung von PPX_Δ1,2 mittels synthetischem PolyP P70. Anhand konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte weiter gezeigt werden, dass PolyP vor allem in den Mitochondrien der EZs lokalisiert ist, was die Verknüpfung mit ATP aufzeigen könnte. Des Weiteren wurde eine Ko-Lokalisation von PolyP und Nucleoli-ähnlichen Strukturen aufgezeigt. Dieses könnte auf eine mögliche Rolle von PolyP bei der Genexpression hinweisen. Außerdem wurde PPX_Δ1,2 mutmaßlich in den Weibel-Palade-Körperchen (WPBs) von HUVECs angereichert, welche möglicherweise neben Von-Willebrand-Faktor (VWF) auch als Speicher für PolyP dienen könnten und somit auch die Hämostase beeinflussen.

Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1 (XPR1) ist der einzig bekannte Phosphatexporter in Metazoa und reguliert als Transmembranprotein auch den Gehalt von PolyP in Thrombozyten. Deshalb wurde eine siRNA-vermittelte Downregulation von XPR1 durchgeführt, um den endogenen Gehalt an PolyP zu modulieren und die Auswirkungen in EZs zu untersuchen. Wie erwartet akkumuliert PolyP nach dem Verlust von XPR1 auch in EZs und ein deutlicher Anstieg der mRNA der Proliferationsmarker *CCNB1*, *CCNB2*, *MKI67* sowie *MYBL2* wurde beobachtet. Dies kann ein Hinweis auf eine mögliche Funktion von

PolyP bei der Proliferation sein. Außerdem war die Morphologie der Mitochondrien beeinträchtigt und der Gehalt an VWF intrazellulär gemindert.

Hinsichtlich der Ziele dieser Arbeit konnte PolyP vor allem in den Mitochondrien der EZs nachgewiesen werden sowie mutmaßlich in Nucleoli-ähnlichen Strukturen und WPBs der HUVECs. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen XPR1 der HUVECs und dem PolyP-Gehalt der Zellen sowie der Proliferation. Weitere Funktionen von PolyP im Endothel müssen durch weitere Versuchsreihen analysiert werden.

5.1 Abstract

Inorganic polyphosphate (PolyP) is a polymer consisting of a few to several hundred orthophosphates linked by energetic phosphoanhydride bonds. In humans, polyP plays an important role in coagulation. Activated platelets presenting their polyP at their cell surface and thereby activating clotting factor XII (FXII).

Other human cells also possess polyP, but its localization and function in most other cell types has not been explored. The aim of this work was to detect endogenous polyP in endothelial cells (EZs) and to analyze subcellular localization and functions of polyP.

Methodically, endogenous polyP was first detected in human endothelial cell line using the *Malachite Green assay*. In addition, polyP was analyzed in murine and human endothelial cell lines as well as *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) using the newly revised method of polyP extraction in urea-PAGE. In each case, detection was performed by specific digestion of polyP by exopolyphosphatase from *E. coli* (PPX). Microscopic in situ detection of (sub-) cellular localization was performed using the PPX_Δ1,2 polyP-probe. The polyP-probe is a genetically modified exopolyphosphatase and binds to polyP but does not hydrolyze it. Specificity of staining was confirmed by competitive inhibition of PPX_Δ1,2 using synthetic polyP P70. Using confocal fluorescence microscopy, it was further shown that polyP is mainly localized in the mitochondria of EZs, which could reveal the linkage with ATP. Furthermore, co-localization of polyP and nucleoli-like structures was revealed. This could indicate a possible role of polyP in gene expression. In addition, PPX_Δ1,2 was putatively enriched in the Weibel-Palade-bodies (WPBs) of HUVECs, which could possibly serve as a store for polyP in addition to von-Willebrand-factor (VWF), thus also affecting hemostasis.

Xenotropic and Polytropic Retrovirus Receptor 1 (XPR1) is the only known phosphate exporter in Metazoa and as a transmembrane protein, also regulates the level of polyP in platelets. Therefore, siRNA-mediated downregulation of XPR1 was performed to modulate the endogenous level of polyP and to study its effects in EZs. As expected, polyP also

accumulated in EZs after loss of XPR1, and a marked increase in mRNA of the proliferation markers *CCNB1*, *CCNB2*, *MKI67*, as well as *MYBL2* was observed. This may indicate a possible function of polyP in proliferation. In addition, mitochondrial morphology was impaired and VWF content was decreased intracellularly.

Regarding the aims of this work, polyP was detected mainly in the mitochondria of EZs and putatively in nucleoli-like structures and WPBs of HUVECs. In addition, there is a correlation between XPR1 of HUVECs and polyP content of cells and proliferation. Additional functions of polyP in the endothelium need to be analyzed by further series of experiments.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACE2-Rezeptor	<i>Angiotensin-Converting Enzyme 2 Receptor</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
C1INH	C1-Esterase-Inhibitor
CCNB1	<i>G2/mitotic-specific Cyclin-B1</i>
CCNB2	<i>G2/mitotic-specific Cyclin-B2</i>
COVID-19	<i>Coronavirus Disease 2019</i>
cDNA	<i>complementary Desoxyribonucleic Acid</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dNTP	d-Nukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Endothelzellen	EZs
FXII	Gerinnungsfaktor XII
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HIS-Tag	6xHistidin-Tag
HMW	<i>high-molecular-weight</i>
HMWK	<i>high-molecular-weight Kininogen</i>
HUVECs	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IBGC	idiopathische Basalganglienkalzifizierung
IF	Immunfluoreszenz
InsP ₇	<i>5-Diphosphoinositol 1,2,3,4,6-Pentakisphosphate</i>
InsP ₈	<i>1,5-Bis-Diphosphoinositol 2,3,4,6-Tetrakisphosphate</i>
IP6K	<i>Inositolhexakisphosphatase Kinase</i>
LOF	<i>loss of Function</i>
min	Minute(n)
MitoTracker	MitoTracker™ Red CMXRos Fa. Invitrogen
MKI67	Marker of Proliferation Ki-67
mPTP	inneren Mitochondrienpermeabilitätübergangsspore (<i>Mitochondrial Permeability Transition Pore</i>)
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>

mTORC2	<i>Mechanistic Target of Rapamycin Complex 2</i>
MYBL2	V-Myb Myeloblastosis Viral Oncogene Homolog (Avian)-Like 2
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OD	optische Dichte
RCF	<i>relative Centrifugal Force</i>
RPM	<i>Revolutions per minute</i>
P70	Natriumpolyphosphat P70
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PDGFB	<i>Platelet-derived Growth Factor-BB</i>
PDGFRB	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor-BB</i>
PDGF-R β	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor β</i>
PFBC	primäre familiäre Hirnkalzifizierung
PolyP	anorganisches Polyphosphat
PP-InsP	inositol Pyrophosphat
PPIP5K	Diphosphoinositol Pentakisphosphate Kinase
PPK	Polyphosphatkinase
PPX	Exopolyphosphatase aus <i>Escherichia coli</i>
PPX_ Δ 1,2	PolyP-Sonde als Rekombinante der PPX, welche zwei Bindungsdomänen umfasst und PolyP nicht hydrolysiert
qPCR	<i>real-time quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung
RNAi	<i>Ribonucleic Acid interference</i>
RT	Raumtemperatur
Urea-PAGE	Urea (Harnstoff)-Polyacrylamide-Gel-Elektrophorese
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sek	Sekunden
siRNA	<i>short-interfering Ribonucleic Acid</i>
SLC20A1	<i>Solute Carrier Family 20 Member 1</i>
SLC20A2	<i>Solute Carrier Family 20 Member 2</i>
Taq	<i>Thermus aquatus</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor- α</i>
U	<i>Units</i>

VE-Cadherin	Vascular endothelial - Cadherin
VWF	Von-Willebrand-Faktor
WPB	Weibel-Palade-Körperchen
XPR1	<i>Xenotropic and Polytopic Retrovirus Receptor 1</i>

7 Literaturverzeichnis

- AKIYAMA, M., CROOKE, E. & KORNBERG, A. 1993. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 633-639.
- ALTMANN, H. J., FÜRSTENAU, E., GIELEWSKI, A. & SCHOLZ, L. 1971. Photometrische Bestimmung kleiner Phosphatmengen mit Malachitgrün. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, 256, 274-276.
- ANGELOVA, P. R., AGRAWALLA, B. K., ELUSTONDO, P. A., GORDON, J., SHIBA, T., ABRAMOV, A. Y., CHANG, Y.-T. & PAVLOV, E. V. 2014. In Situ Investigation of Mammalian Inorganic Polyphosphate Localization Using Novel Selective Fluorescent Probes JC-D7 and JC-D8. *ACS Chemical Biology*, 9, 2101-2110.
- ANGELOVA, P. R., BAEV, A. Y., BEREZHNOV, A. V. & ABRAMOV, A. Y. 2016. Role of inorganic polyphosphate in mammalian cells: from signal transduction and mitochondrial metabolism to cell death. *Biochem Soc Trans*, 44, 40-5.
- BAE, J. S., LEE, W. & REZAI, A. R. 2012. Polyphosphate elicits pro-inflammatory responses that are counteracted by activated protein C in both cellular and animal models. *J Thromb Haemost*, 10, 1145-51.
- BAEV, A. Y., ANGELOVA, P. R. & ABRAMOV, A. Y. 2020. Inorganic polyphosphate is produced and hydrolyzed in FOF1-ATP synthase of mammalian mitochondria. *Biochem J*, 477, 1515-1524.
- BATTINI, J. L., RASKO, J. E. & MILLER, A. D. 1999. A human cell-surface receptor for xenotropic and polytropic murine leukemia viruses: possible role in G protein-coupled signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1385-90.
- BISWAS, I., PANICKER, S. R., CAI, X., MEHTA-D'SOUZA, P. & REZAI, A. R. 2018. Inorganic polyphosphate amplifies HMGB1-mediated von Willebrand factor release and platelet string formation on endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 38, 1868.
- BJÖRKQVIST, J., SALA-CUNILL, A. & RENNÉ, T. 2013. Hereditary angioedema: a bradykinin-mediated swelling disorder. *Thromb Haemost*, 109, 368-74.
- BONORA, M., PATERGNANI, S., RIMESSI, A., DE MARCHI, E., SUSKI, J. M., BONONI, A., GIORGI, C., MARCHI, S., MISSIROLI, S., POLETTI, F., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2012. ATP synthesis and storage. *Purinergic Signal*, 8, 343-57.
- BRU, S., JIMÉNEZ, J., CANADELL, D., ARIÑO, J. & CLOTET, J. 2016. Improvement of biochemical methods of polyP quantification. *Microb Cell*, 4, 6-15.
- BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*, 25, 169-193.
- CAI, H., LIU, D. & GARCIA, J. G. 2008. CaM Kinase II-dependent pathophysiological signalling in endothelial cells. *Cardiovascular research*, 77, 30-34.
- CHEN, W.-C., LI, Q.-L., PAN, Q., ZHANG, H.-Y., FU, X.-Y., YAO, F., WANG, J.-N. & YANG, A.-K. 2019. Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 (XPR1) promotes progression of tongue squamous cell carcinoma (TSCC) via activation of NF- κ B signaling. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 1-12.
- CHUNG, J., KU, S. K., LEE, S. & BAE, J. S. 2016. Suppressive effects of lysozyme on polyphosphate-mediated vascular inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*, 474, 715-721.
- CLARK, J. E. & WOOD, H. G. 1987. Preparation of standards and determination of sizes of long-chain polyphosphates by gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 161, 280-290.
- CORDEIRO, C. D., AHMED, M. A., WINDLE, B. & DOCAMPO, R. 2019. NUDIX hydrolases with inorganic polyphosphate exo- and endopolyphosphatase activities in the glycosome, cytosol and nucleus of *Trypanosoma brucei*. *Biosci Rep*, 39.
- DINARVAND, P., HASSANIAN, S. M., QURESHI, S. H., MANITHODY, C., EISSENBERG, J. C., YANG, L. & REZAI, A. R. 2014. Polyphosphate amplifies proinflammatory responses of nuclear

- proteins through interaction with receptor for advanced glycation end products and P2Y1 purinergic receptor. *Blood*, 123, 935-45.
- DINARVAND, P., YANG, L., BISWAS, I., GIRI, H. & REZAIE, A. R. 2020. Plasmodium falciparum histidine rich protein HRP II inhibits the anti-inflammatory function of antithrombin. *J Thromb Haemost*, 18, 1473-1483.
- DOCAMPO, R. & MORENO, S. N. 2011. Acidocalcisomes. *Cell Calcium*, 50, 113-9.
- DU, F., WANG, Y., DING, Z., LASCHKE, M. W. & THORLACIUS, H. 2019. Microvascular Mechanisms of Polyphosphate-Induced Neutrophil-Endothelial Cell Interactions in vivo. *Eur Surg Res*, 60, 53-62.
- ELUSTONDO, P. A., MNATSAKANYAN, N., ELEONORA, Z., JONAS, E. A. & PAVLOV, E. 2016. Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Formation Requires the Participation of c-Subunit of ATP-Synthase, Polyhydroxybutyrate (PHB) and Inorganic Polyphosphate (polyP). *Biophysical Journal*, 110, 310a.
- ELZOHEIRY, M., DA'DARA, A. A., NATION, C. S., EL-BESHBISHI, S. N. & SKELLY, P. J. 2019. Schistosomes can hydrolyze proinflammatory and prothrombotic polyphosphate (polyP) via tegumental alkaline phosphatase, SmAP. *Mol Biochem Parasitol*, 232, 111190.
- FRYE, M., DIERKES, M., KÜPPERS, V., VOCKEL, M., TOMM, J., ZEUSCHNER, D., ROSSAINT, J., ZARBOCK, A., KOH, G. Y., PETERS, K., NOTTEBAUM, A. F. & VESTWEBER, D. 2015. Interfering with VE-PTP stabilizes endothelial junctions in vivo via Tie-2 in the absence of VE-cadherin. *J Exp Med*, 212, 2267-87.
- GHEBREHIWET, B., SILVERBERG, M. & KAPLAN, A. P. 1981. Activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment. *J Exp Med*, 153, 665-76.
- GIOVANNINI, D., TOUHAMI, J., CHARNET, P., SITBON, M. & BATTINI, J.-L. 2013. Inorganic phosphate export by the retrovirus receptor XPR1 in metazoans. *Cell reports*, 3, 1866-1873.
- GOMEZ GARCIA, M. R. 2014. Extraction and Quantification of Poly P, Poly P Analysis by Urea-PAGE. *Bio Protoc*, 4.
- HAROLD, F. M. 1966. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol Rev*, 30, 772-94.
- HASSANIAN, S. M., ARDESHIRYLAJIMI, A., DINARVAND, P. & REZAIE, A. R. 2016. Inorganic polyphosphate promotes cyclin D1 synthesis through activation of mTOR/Wnt/ β -catenin signaling in endothelial cells. *J Thromb Haemost*, 14, 2261-2273.
- HASSANIAN, S. M., AVAN, A. & ARDESHIRYLAJIMI, A. 2017. Inorganic polyphosphate: a key modulator of inflammation. *J Thromb Haemost*, 15, 213-218.
- HASSANIAN, S. M., DINARVAND, P., SMITH, S. A. & REZAIE, A. R. 2015. Inorganic polyphosphate elicits pro-inflammatory responses through activation of the mammalian target of rapamycin complexes 1 and 2 in vascular endothelial cells. *J Thromb Haemost*, 13, 860-71.
- IDO, Y., CARLING, D. & RUDERMAN, N. 2002. Hyperglycemia-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: inhibition by the AMP-activated protein kinase activation. *Diabetes*, 51, 159-67.
- ITAYA, K. & UI, M. 1966. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clinica chimica acta*, 14, 361-366.
- JIMENEZ-NUÑEZ, M. D., MORENO-SANCHEZ, D., HERNANDEZ-RUIZ, L., BENÍTEZ-RONDÁN, A., RAMOS-AMAYA, A., RODRÍGUEZ-BAYONA, B., MEDINA, F., BRIEVA, J. A. & RUIZ, F. A. 2012. Myeloma cells contain high levels of inorganic polyphosphate which is associated with nucleolar transcription. *Haematologica*, 97, 1264-71.
- KENNE, E., NICKEL, K. F., LONG, A. T., FUCHS, T. A., STAVROU, E. X., STAHL, F. R. & RENNE, T. 2015. Factor XII: a novel target for safe prevention of thrombosis and inflammation. *J Intern Med*, 278, 571-85.
- KULAEV, I. S. 1975. Biochemistry of inorganic polyphosphates. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 73, 131-58.

- KULAKOVSKAYA, E. V., ZEMSKOVA, M. Y. & KULAKOVSKAYA, T. V. 2018. Inorganic Polyphosphate and Cancer. *Biochemistry (Mosc)*, 83, 961-968.
- KUMBLE, K. D. & KORNBERG, A. 1995. Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 5818-5822.
- LABBERTON, L., KENNE, E., LONG, A. T., NICKEL, K. F., DI GENNARO, A., RIGG, R. A., HERNANDEZ, J. S., BUTLER, L., MAAS, C., STAVROU, E. X. & RENNE, T. 2016. Neutralizing blood-borne polyphosphate in vivo provides safe thromboprotection. *Nat Commun*, 7, 12616.
- LABBERTON, L., LONG, A. T., GENDLER, S. J., SNOZEK, C. L., STAVROU, E. X., NICKEL, K. F., MAAS, C., BLANKENBERG, S., HERNANDEZ, J. S. & RENNE, T. 2018. A Flow Cytometry-Based Assay for Procoagulant Platelet Polyphosphate. *Cytometry B Clin Cytom*, 94, 369-373.
- LI, X., GU, C., HOSTACHY, S., SAHU, S., WITWER, C., JESSEN, H. J., FIEDLER, D., WANG, H. & SHEARS, S. B. 2020. Control of XPR1-dependent cellular phosphate efflux by InsP(8) is an exemplar for functionally-exclusive inositol pyrophosphate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117, 3568-3574.
- LIEBERMANN, L. 1888. Über das Nuclein der Hefe und künstliche Darstellung eines Nucleins aus Eiweiss und Metaphosphorsäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 21, 598-607.
- LÓPEZ-SÁNCHEZ, U., TURY, S., NICOLAS, G., WILSON, M. S., JURICI, S., AYRIGNAC, X., COURGNAUD, V., SAIARDI, A., SITBON, M. & BATTINI, J. L. 2020. Interplay between primary familial brain calcification-associated SLC20A2 and XPR1 phosphate transporters requires inositol polyphosphates for control of cellular phosphate homeostasis. *J Biol Chem*, 295, 9366-9378.
- MAILER, R. K., ALLENDE, M., HEESTERMANS, M., SCHWEIZER, M., DEPPERMAN, C., FRYE, M., PULA, G., ODEBERG, J., GELDERBLUM, M., ROSE-JOHN, S., SICKMANN, A., BLANKENBERG, S., HUBER, T. B., KUBISCH, C., MAAS, C., GAMBARYAN, S., FIRSOV, D., STAVROU, E. X., BUTLER, L. M. & RENNÉ, T. 2021. Xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1 regulates procoagulant platelet polyphosphate. *Blood*, 137, 1392-1405.
- MAILER, R. K. W., HÄNEL, L., ALLENDE, M. & RENNÉ, T. 2019. Polyphosphate as a Target for Interference With Inflammation and Thrombosis. *Front Med (Lausanne)*, 6, 76.
- MATHORNE, S. W., SØRENSEN, K., FAGERBERG, C., BODE, M. & HERTZ, J. M. 2019. A novel PDGFRB sequence variant in a family with a mild form of primary familial brain calcification: a case report and a review of the literature. *BMC Neurol*, 19, 60.
- MILSTEIN, S., NGUYEN, M., MEYERS, R. & DE FOUGEROLLES, A. 2013. Measuring RNAi knockdown using qPCR. *Methods Enzymol*, 533, 57-77.
- MONTILLA, M., HERNANDEZ-RUIZ, L., GARCIA-COZAR, F. J., ALVAREZ-LADERAS, I., RODRIGUEZ-MARTORELL, J. & RUIZ, F. A. 2012. Polyphosphate binds to human von Willebrand factor in vivo and modulates its interaction with glycoprotein Ib. *J Thromb Haemost*, 10, 2315-23.
- MORENO-SANCHEZ, D., HERNANDEZ-RUIZ, L., RUIZ, F. A. & DOCAMPO, R. 2012. Polyphosphate is a novel pro-inflammatory regulator of mast cells and is located in acidocalcisomes. *J Biol Chem*, 287, 28435-44.
- MORRISSEY, J. H., CHOI, S. H. & SMITH, S. A. 2012. Polyphosphate: an ancient molecule that links platelets, coagulation, and inflammation. *Blood*, 119, 5972-9.
- MÜLLER, F., MUTCH, N. J., SCHENK, W. A., SMITH, S. A., ESTERL, L., SPRONK, H. M., SCHMIDBAUER, S., GAHL, W. A., MORRISSEY, J. H. & RENNÉ, T. 2009. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell*, 139, 1143-56.
- MÜLLER, F. & RENNÉ, T. 2008. Novel roles for factor XII-driven plasma contact activation system. *Curr Opin Hematol*, 15, 516-21.
- MÜLLER, W. E. G., ACKERMANN, M., WANG, S., NEUFURTH, M., MUÑOZ-ESPÍ, R., FENG, Q., SCHRÖDER, H. C. & WANG, X. 2018. Inorganic polyphosphate induces accelerated tube formation of HUVEC endothelial cells. *Cell Mol Life Sci*, 75, 21-32.

- NEGREIROS, R. S., LANDER, N., HUANG, G., CORDEIRO, C. D., SMITH, S. A., MORRISSEY, J. H. & DOCAMPO, R. 2018. Inorganic polyphosphate interacts with nucleolar and glycosomal proteins in trypanosomatids. *Mol Microbiol*, 110, 973-994.
- NEUFURTH, M., WANG, X., TOLBA, E., LIEBERWIRTH, I., WANG, S., SCHRÖDER, H. C. & MÜLLER, W. E. G. 2020. The inorganic polymer, polyphosphate, blocks binding of SARS-CoV-2 spike protein to ACE2 receptor at physiological concentrations. *Biochem Pharmacol*, 182, 114215.
- NICKEL, K. F., LABBERTON, L., LONG, A. T., LANGER, F., FUCHS, T. A., STAVROU, E. X., BUTLER, L. M. & RENNÉ, T. 2016. The polyphosphate/factor XII pathway in cancer-associated thrombosis: novel perspectives for safe anticoagulation in patients with malignancies. *Thromb Res*, 141 Suppl 2, S4-7.
- NICKEL, K. F., RONQUIST, G., LANGER, F., LABBERTON, L., FUCHS, T. A., BOKEMEYER, C., SAUTER, G., GRAEFEN, M., MACKMAN, N., STAVROU, E. X., RONQUIST, G. & RENNE, T. 2015. The polyphosphate-factor XII pathway drives coagulation in prostate cancer-associated thrombosis. *Blood*, 126, 1379-89.
- NICOLAS, G., POTTIER, C., MALTÊTE, D., COUTANT, S., ROVELET-LECRUX, A., LEGALLIC, S., ROUSSEAU, S., VASCHALDE, Y., GUYANT-MARÉCHAL, L., AUGUSTIN, J., MARTINAUD, O., DEFEBVRE, L., KRYSKOWIAK, P., PARIENTE, J., CLANET, M., LABAUGE, P., AYRIGNAC, X., LEFAUCHEUR, R., LE BER, I., FRÉBOURG, T., HANNEQUIN, D. & CAMPION, D. 2013. Mutation of the PDGFRB gene as a cause of idiopathic basal ganglia calcification. *Neurology*, 80, 181-7.
- PAVLOV, E., ASCHAR-SOBBI, R., CAMPANELLA, M., TURNER, R. J., GÓMEZ-GARCÍA, M. R. & ABRAMOV, A. Y. 2010. Inorganic polyphosphate and energy metabolism in mammalian cells. *J Biol Chem*, 285, 9420-9428.
- RAMOS, E. M., CARECCHIO, M., LEMOS, R., FERREIRA, J., LEGATI, A., SEARS, R. L., HSU, S. C., PANTEGHINI, C., MAGISTRELLI, L., SALSANO, E., ESPOSITO, S., TARONI, F., RICHARD, A. C., TRANCHANT, C., ANHEIM, M., AYRIGNAC, X., GOIZET, C., VIDAILHET, M., MALTETE, D., WALLON, D., FREBOURG, T., PIMENTEL, L., GESCHWIND, D. H., VANAKKER, O., GALASKO, D., FOGEL, B. L., INNES, A. M., ROSS, A., DOBYNS, W. B., ALCANTARA, D., O'DRISCOLL, M., HANNEQUIN, D., CAMPION, D., OLIVEIRA, J. R., GARAVAGLIA, B., COPPOLA, G. & NICOLAS, G. 2018. Primary brain calcification: an international study reporting novel variants and associated phenotypes. *Eur J Hum Genet*, 26, 1462-1477.
- RAMOS, E. M., OLIVEIRA, J., SOBRIDO, M. J. & COPPOLA, G. 1993. Primary Familial Brain Calcification. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., MIRZAA, G. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle Copyright © 1993-2021, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- RENNE, T. 2012. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Semin Immunopathol*, 34, 31-41.
- RUIZ, F. A., LEA, C. R., OLDFIELD, E. & DOCAMPO, R. 2004. Human platelet dense granules contain polyphosphate and are similar to acidocalcisomes of bacteria and unicellular eukaryotes. *J Biol Chem*, 279, 44250-7.
- SCHEPLER, H., WANG, X., NEUFURTH, M., WANG, S., SCHRÖDER, H. C. & MÜLLER, W. E. G. 2021. The therapeutic potential of inorganic polyphosphate: A versatile physiological polymer to control coronavirus disease (COVID-19). *Theranostics*, 11, 6193-6213.
- SEIDLMEYER, L. K., GOMEZ-GARCIA, M. R., BLATTER, L. A., PAVLOV, E. & DEDKOVA, E. N. 2012. Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *Journal of General Physiology*, 139, 321-331.
- SEKINE, S. I., NISHII, K., MASAKA, T., KURITA, H., INDEN, M. & HOZUMI, I. 2019. SLC20A2 variants cause dysfunctional phosphate transport activity in endothelial cells induced from

- Idiopathic Basal Ganglia Calcification patients-derived iPSCs. *Biochem Biophys Res Commun*, 510, 303-308.
- SMITH, S. A., CHOI, S. H., DAVIS-HARRISON, R., HUYCK, J., BOETTCHER, J., RIENSTRA, C. M. & MORRISSEY, J. H. 2010. Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 116, 4353-4359.
- SMITH, S. A. & MORRISSEY, J. H. 2007. Sensitive fluorescence detection of polyphosphate in polyacrylamide gels using 4',6'-diamidino-2-phenylindol. *Electrophoresis*, 28, 3461-5.
- SMITH, S. A. & MORRISSEY, J. H. 2008. Polyphosphate enhances fibrin clot structure. *Blood*, 112, 2810-6.
- SMITH, S. A., MUTCH, N. J., BASKAR, D., ROHLOFF, P., DOCAMPO, R. & MORRISSEY, J. H. 2006. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 903-8.
- SOLESIO, M., DEMIRKHANYAN, L., ZAKHARIAN, E. & PAVLOV, E. 2016. Contribution of inorganic polyphosphate towards regulation of mitochondrial free calcium. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860, 1317-1325.
- SUH, Y. J., HONG, H., OHANA, M., BOMPARD, F., REVEL, M. P., VALLE, C., GERVAISE, A., POISSY, J., SUSEN, S., HÉKIMIAN, G., ARTIFONI, M., PERIARD, D., CONTOU, D., DELALOYE, J., SANCHEZ, B., FANG, C., GARZILLO, G., ROBBIE, H. & YOON, S. H. 2021. Pulmonary Embolism and Deep Vein Thrombosis in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Radiology*, 298, E70-e80.
- SUMMER, H., GRAMER, R. & DROGE, P. 2009. Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *J Vis Exp*.
- TADIC, V., WESTENBERGER, A., DOMINGO, A., ALVAREZ-FISCHER, D., KLEIN, C. & KASTEN, M. 2015. Primary familial brain calcification with known gene mutations: a systematic review and challenges of phenotypic characterization. *JAMA neurology*, 72, 460-467.
- TAGLIA, I., BONIFATI, V., MIGNARRI, A., DOTTI, M. T. & FEDERICO, A. 2015. Primary familial brain calcification: update on molecular genetics. *Neurol Sci*, 36, 787-94.
- TANG, X., LUO, Y.-X., CHEN, H.-Z. & LIU, D.-P. 2014. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Frontiers in physiology*, 5, 175.
- THORNTON, B. & BASU, C. 2015. Rapid and simple method of qPCR primer design. *Methods Mol Biol*, 1275, 173-9.
- TRAVERS, R. J., SHENOI, R. A., KALATHOTTUKAREN, M. T., KIZHAKKEDATHU, J. N. & MORRISSEY, J. H. 2014. Nontoxic polyphosphate inhibitors reduce thrombosis while sparing hemostasis. *Blood*, 124, 3183-90.
- VAUGHAN, A. E., MENDOZA, R., ARANDA, R., BATTINI, J. L. & MILLER, A. D. 2012. Xpr1 is an atypical G-protein-coupled receptor that mediates xenotropic and polytropic murine retrovirus neurotoxicity. *J Virol*, 86, 1661-9.
- VERHOEF, J. J., BARENDRECHT, A. D., NICKEL, K. F., DIJKXHOORN, K., KENNE, E., LABBERTON, L., MCCARTY, O. J., SCHIFFELERS, R., HEIJNEN, H. F., HENDRICKX, A. P., SCHELLEKENS, H., FENS, M. H., DE MAAT, S., RENNE, T. & MAAS, C. 2017. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*, 129, 1707-1717.
- VISCHER, U. M. & DE MOERLOOSE, P. 1999. von Willebrand factor: from cell biology to the clinical management of von Willebrand's disease. *Crit Rev Oncol Hematol*, 30, 93-109.
- WANG, C., LI, Y., SHI, L., REN, J., PATTI, M., WANG, T., DE OLIVEIRA, J. R., SOBRIDO, M. J., QUINTÁNS, B., BAQUERO, M., CUI, X., ZHANG, X. Y., WANG, L., XU, H., WANG, J., YAO, J., DAI, X., LIU, J., ZHANG, L., MA, H., GAO, Y., MA, X., FENG, S., LIU, M., WANG, Q. K., FORSTER, I. C., ZHANG, X. & LIU, J. Y. 2012. Mutations in SLC20A2 link familial idiopathic basal ganglia calcification with phosphate homeostasis. *Nat Genet*, 44, 254-6.
- WANG, L., FRALEY, C. D., FARIDI, J., KORNBERG, A. & ROTH, R. A. 2003. Inorganic polyphosphate stimulates mammalian TOR, a kinase involved in the proliferation of mammary cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11249-54.

- WANG, X., ACKERMANN, M., NEUFURTH, M., WANG, S., LI, Q., FENG, Q., SCHRÖDER, H. C. & MÜLLER, W. E. G. 2017. Restoration of Impaired Metabolic Energy Balance (ATP Pool) and Tube Formation Potential of Endothelial Cells under "high glucose", Diabetic Conditions by the Bioinorganic Polymer Polyphosphate. *Polymers (Basel)*, 9.
- WERNER, T. P., AMRHEIN, N. & FREIMOSER, F. M. 2007. Specific localization of inorganic polyphosphate (poly P) in fungal cell walls by selective extraction and immunohistochemistry. *Fungal Genet Biol*, 44, 845-52.
- WIJEYEWICKREMA, L. C., LAMEIGNERE, E., HOR, L., DUNCAN, R. C., SHIBA, T., TRAVERS, R. J., KAPOPARA, P. R., LEI, V., SMITH, S. A., KIM, H., MORRISSEY, J. H., PIKE, R. N. & CONWAY, E. M. 2016. Polyphosphate is a novel cofactor for regulation of complement by a serpin, C1 inhibitor. *Blood*, 128, 1766-76.
- ZARB, Y., FRANZOSO, F. D. & KELLER, A. 2019. Pericytes in Primary Familial Brain Calcification. *Adv Exp Med Biol*, 1147, 247-264.
- ZHANG, A., GUO, E., QIAN, L., TANG, N. Y., WATT, R. M. & BARTLAM, M. 2016. Purification, crystallization and X-ray crystallographic analysis of a putative exopolyphosphatase from *Zymomonas mobilis*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 72, 172-8.
- ZHANG, J., TECSON, K. M. & MCCULLOUGH, P. A. 2020. Endothelial dysfunction contributes to COVID-19-associated vascular inflammation and coagulopathy. *Rev Cardiovasc Med*, 21, 315-319.
- ZHANG, Y., ULVMAR, M. H., STANCZUK, L., MARTINEZ-CORRAL, I., FRYE, M., ALITALO, K. & MAKINEN, T. 2018. Heterogeneity in VEGFR3 levels drives lymphatic vessel hyperplasia through cell-autonomous and non-cell-autonomous mechanisms. *Nat Commun*, 9, 1296.

Herstellerangaben

QIAquick® Gel Extraction Kit

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/dna-clean-up/qiaquick-gel-extraction-kit/>

QIAprep® Spin Miniprep Kit

<https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiaprep-spin-miniprep-kit/>

8 Danksagung

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

9 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.



Unterschrift:

Björn Formella