

Rolle der Serin/Threonin-Proteinkinase DAPK1 (Death Associated Protein Kinase) in der pulmonal arteriellen Hypertonie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jana Thudium

aus Waiblingen

Gießen (2022)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System

Zentrum für Innere Medizin

Gutachter: Prof. Dr. Schermuly

Gutachter: PD Dr. Rolf

Tag der Disputation:

30.03.2023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Death Associated Protein Kinase (DAPK).....	6
1.1.1. Die DAPK-Familie	7
1.1.2. Struktureller Aufbau des DAPK-Proteins.....	9
1.1.3. Regulation von DAPK1	11
1.1.4. Das DAPK-Interaktom.....	14
1.1.5. DAPK und Erkrankung.....	18
1.2. Pulmonale Hypertonie	20
1.2.1. Definition.....	20
1.2.2. Einteilung und Epidemiologie.....	20
1.2.3. Symptomatik und Therapie	22
1.2.4. Parallelen von Pulmonal-Arterieller Hypertonie und Krebsentstehung	23
1.2.5. DAPK und PAH.....	27
1.3. Zielsetzung der Arbeit.....	27
2. Material und Methoden.....	29
2.1. Material.....	29
2.1.1. Laborgeräte und -materialien	29
2.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen.....	33
2.1.3. Antikörper und weitere Substanzen	36
2.1.4. Zellen, siRNA, Plasmide und Bakterien.....	39
2.2. Methoden	40

2.2.1. Zellkultur	40
2.2.1.1. Bedingungen in der Zellkultur.....	40
2.2.1.2. Kultivieren, Splitten, Einfrieren	40
2.2.1.3. NOX/HOX-Bedingungen	41
2.2.1.4. Transfektion mit siRNA	42
2.2.1.5. Stimulation mit Wachstumsfaktoren	43
2.2.1.6 Knockdown mit DAPK-Inhibitor	43
2.2.2. Bakterien-Transformation, Plasmid-Isolation und -Transfektion	44
2.2.2.1. Bakterien-Transformation.....	44
2.2.2.2. Plasmid-Isolation.....	44
2.2.2.3. Plasmid-Transfektion	45
2.2.3. BrdU-Proliferations-Assay.....	46
2.2.4. Proteinisolation, -messung und -normalisierung.....	47
2.2.5. Western Blot-Analyse	49
2.2.5.1. Gelelektrophorese, Blotting und Blocking.....	49
2.2.5.2. Umgang mit Antikörpern und Entwicklung.....	50
2.2.6. Statistische Auswertung.....	51
3. Ergebnisse	52
3.1. NOX/HOX-Experimente.....	52
3.2. Stimulation mit Wachstumsfaktoren.....	53
3.2.1. Stimulation der nativen hPASCs	53

3.2.2. Stimulation der mit siDAPK und Negativ-Kontrolle (siNC) transfektierten hPASCs.....	54
3.3. Hemmung von DAPK mit dem DAPK-Inhibitor TC-DAPK 6	56
3.4. Transfektion mit Plasmiden.....	56
3.4.1. Proliferations-Assay	57
3.4.2. Proteinisolation, Einfluss von DAPK auf verschiedene Proteine.....	59
4. Diskussion.....	61
4.1. Diskussion der Methoden	61
4.2. Diskussion der Ergebnisse	62
4.3. Ausblick.....	67
Zusammenfassung.....	68
Summary.....	69
Abkürzungsverzeichnis.....	70
Abbildungsverzeichnis.....	73
Tabellenverzeichnis.....	74
Literaturverzeichnis	75
Ehrenwörtliche Erklärung	86
Danksagung	87

1. Einleitung

1.1. Death Associated Protein Kinase (DAPK)

Die Death Associated Protein Kinase, DAPK1 oder DAPK ist eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die zur Familie der Calcium/Calmodulin-regulierten Proteinkinasen gezählt wird [Pratibha Singh et al, 2016; Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Die 160kDa schwere Kinase besteht aus einer katalytischen Domäne, einer Calcium/Calmodulin-autoregulatorischen Domäne, 8 Ankyrin Repeats, 2 P-Loops, einer zytoskelettalen Bindungs-Domäne (ROC-COR), einer Death-Domäne und einem serinreichen C-terminalen Schwanz [Pratibha Singh et al, 2016]. Die einzelnen Domänen werden in 1.1.2. genauer beschrieben. DAPK wurde 1995 erstmals im Rahmen von IFN- γ induzierter Apoptose in HeLa-Zellen isoliert [L.P. Deiss et al, 1995]. Es stellte sich heraus, dass DAPK, je nach eingehenden Signalen, ein wichtiger Regulator für die Apoptose, Autophagozytose und Immunantwort ist [Pratibha Singh et al, 2016; Yao Lin et al, 2010]. Eine erhöhte Aktivität von DAPK resultiert in verschiedenen Zelltod-assoziierten Veränderungen, wie Zellrundung, Membran-Blebbing, Verlust des Kontaktes zur extrazellulären Matrix und der Formation von autophagozytotischen Vesikeln [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2006; Boaz Inbal, 2000; Mohamed Elbadawy et al, 2018]. Die pro-apoptotischen Funktionen können dabei durch verschiedene intrinsische und extrinsische Faktoren stimuliert werden. DAPK ist sowohl bei der Typ 1 Apoptose, die Caspase-abhängig verläuft, als auch bei einer Typ 2 Autophagozytose, welche Caspase-unabhängig ist, mit beteiligt [Pratibha Singh et al, 2016; Ruth Shiloh et al, 2014]. Vor allem bei durch ER-Stress induzierter Apoptose und Autophagozytose spielt DAPK eine wichtige Rolle [Pratibha Singh et al, 2016]. Eine Veränderung der DAPK-Expression wurde bis jetzt bei verschiedenen Erkrankungen, wie zum Beispiel Tumorerkrankungen, Metastasierung, neurodegenerativen Erkrankungen und inflammatorischer Dysregulation, beschrieben [Pratibha Singh et al, 2016; Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019]. Speziell auf die Erkenntnisse von DAPK im Tumorgeschehen soll später noch genauer eingegangen werden.

1.1.1. Die DAPK-Familie

Die DAPK-Familie ist eine wichtige Familie der Serin/Threonin-Kinasen und umfasst eine Gruppe von fünf mit dem Zelltod in Verbindung gebrachten Kinasen. Neben DAPK1 gehören ihr DRP1 (DAPK-Related Protein 1, auch DAPK2), ZIPK (Zipper Interacting Kinase, auch DAPK3), DRAK1 und DRAK2 (DAPK-Related Apoptosis Inducing Protein Kinase) an [Yao Lin et al, 2010; Shani Bialik and Adi Kimchi, 2006; Koen Temmerman et al, 2013]. Der Zusammenschluss in eine Familie erfolgt vor allem durch die großen Übereinstimmungen in der N-terminal gelegenen katalytischen Kinase-Domäne, während die Unterschiede in den extrakatalytischen Domänen zu finden sind [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019]. Die katalytische Domäne besteht bei allen Familienmitgliedern aus 11 Subdomänen [T. Kawai et al, 1998; Yijun Jin et al, 2002] und ist charakterisiert durch einen DAPK Signature Loop [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019; Valentina Tereshko et al, 2001], der allerdings nicht an der Substratbindung beteiligt ist [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2006]. Dieses exklusive Motiv findet sich nur in der DAPK-Familie wieder [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019]. Während die Kinase-Domänen von DRP1 und ZIPK eine sehr hohe Ähnlichkeit mit der von DAPK1 besitzen, nämlich 80% und 83% [Ruth Shiloh et al, 2014], stimmen die von DRAK1 und 2 nur mit rund 50% [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019] überein. Die in 1.1.2. beschriebenen Aufgaben der Kinase-Domäne gelten nicht nur für DAPK1, sondern auch für die anderen Mitglieder der Familie. Ein gemeinsames Substrat aller Familienmitglieder ist Myosin-Leichte-Kette (MLC) [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019].

Die Unterschiede der DAPK-Familienmitglieder liegen vor allem in den extrakatalytischen Domänen und ihrer Lokalisation in der Zelle.

DRP1 hat die größte Ähnlichkeit mit DAPK1, so besitzt sie eine zu 80% ähnliche katalytische Domäne und eine Ca^{2+} /CaM-Regulations-Domäne, die maßgeblich an der Regulation der katalytischen Domäne beteiligt ist. Auf diese Regulations-Domäne folgt ein einzigartiger, 40 Basen langer Schwanz, der die eigene Dimerisierung vermittelt [Boaz Inbal, 2000; Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019]. Die Funktion von DRP1 ist durch die Aktivität der katalytischen Einheit und das Vorhandensein des C-terminalen Schwanzes bestimmt [Boaz Inbal, 2000].

Die Zipper Interacting Kinase (ZIPK) besitzt, wie im Namen enthalten, eine Leucin-Zipper-Domäne, sie ist involviert in die Homodimerisierung und eine dadurch resultierende Aktivierung der Kinasefunktion [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019; T. Kawai et al, 1998]. Über die katalytische Domäne kann ZIPK an MLC binden und führt zu einer Ca^{2+} -Sensibilisierung mit nachfolgender Muskelkontraktion [Ruth Shiloh et al, 2014]. ZIPK wird im Zellkern lokalisiert [T. Kawai et al, 1998] und durch die sich zwischen den beiden Domänen befindlichen Kernlokalisierungssignale (Nuclear Localization Signal, NLS) dort eingeschleust [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019].

DRAKs besitzen ebenfalls Kernlokalisierungssignale, die ihnen die Passage in den Zellkern ermöglichen. Speziell DRAK2 ist vor allem in lymphatischen Organen stark exprimiert [Monica L. Friedrich et al, 2005].

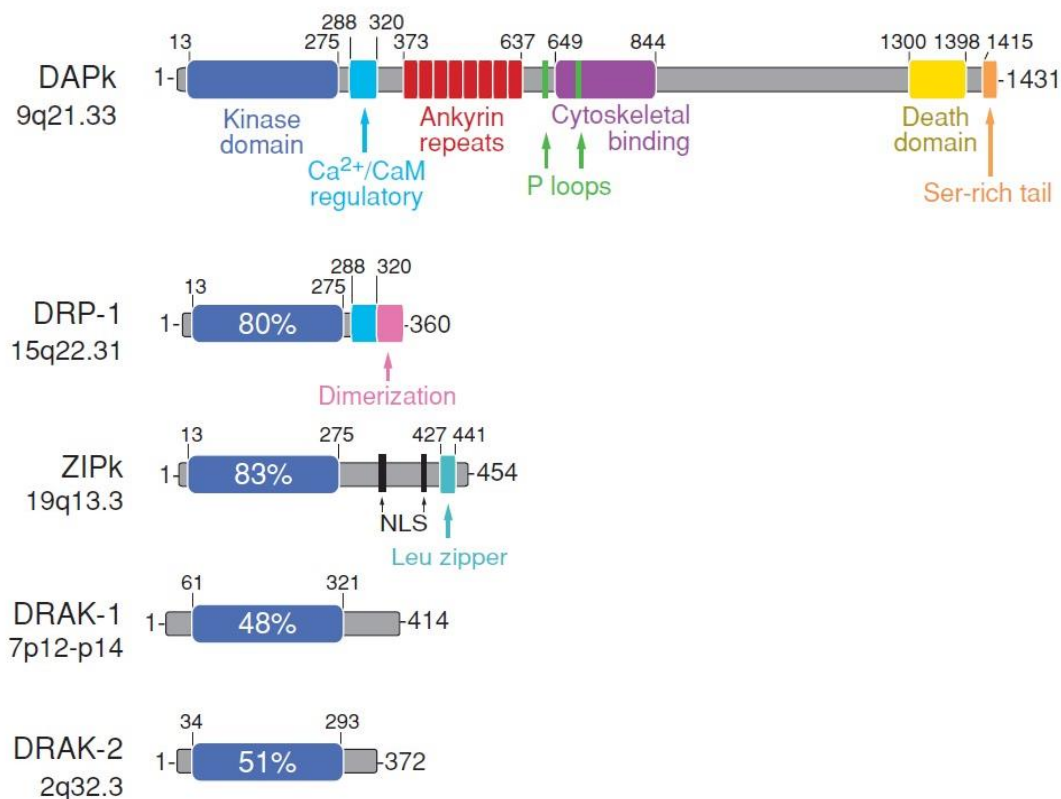


Abbildung 1: Struktur der fünf Mitglieder der DAPK-Familie

Die Prozentzahlen in der Kinase-Domäne (blau) geben an, inwieweit die Domäne mit der von DAPK1 übereinstimmt. Zudem ist ersichtlich, dass lediglich DRP1 eine zusätzliche Ca^{2+} /CaM-Regulations-Domäne wie DAPK1 besitzt. Aus Bialik et al. *The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond*, 2006.

1.1.2. Struktureller Aufbau des DAPK-Proteins

Wie bereits oben erwähnt, besteht DAPK1 aus verschiedenen Domänen. Am N-terminalen Ende befindet sich eine aus 11 Untereinheiten bestehende [Yijun Jin et al, 2002] katalytische Domäne, auch Kinase-Domäne genannt, die durch einen Basic Loop charakterisiert wird [Velentza AV et al, 2001]. Dieser DAPK Signature Loop ist ein exklusives Motiv der DAPK-Familie und kann als eine Art Fingerabdruck angesehen werden [Michael Zimmermann et al, 2010]. Er ist nicht direkt an der Substratbindung beteiligt, sondern spielt zusammen mit der autoregulatorischen Domäne eine Hauptrolle bei der Protein-Dimerisierung, der anschließenden Autophosphorylierung und der Regulation der Kinase-Aktivität [Michael Zimmermann et al, 2010; Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019]. Für eine Kinase typisch ist der Transfer einer Phosphatgruppe von ATP auf ein anderes Molekül. Die Bindungsstelle für ATP befindet sich bei DAPK1 inmitten der Kinase-Domäne im Bereich von Lysin 42 und somit führt dessen Austausch mit Alanin zum Beispiel bei der Mutation DAPK K42A zu einer verminderten ATP-Bindung und folglich auch zu einer Verminderung der Kinase-Aktivität von DAPK1 [Byong Mo Kim et al, 2016]. Eine weitere Aufgabe der Kinase-Domäne ist die Protein-Protein-Interaktion mit dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), diese Interaktion ist für die Stabilität und Aktivität von DAPK1 essentiell [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019].

Im Anschluss an die Kinase-Domäne findet sich eine autoregulatorische Calcium/Calmodulin-Domäne [Pratibha Singh et al, 2016]. Diese autoregulatorische Domäne ist maßgeblich an der Regulation von DAPK beteiligt, indem sie die katalytische Aktivität durch Bindung an den katalytischen Spalt supprimiert, dabei fungiert die Domäne als Pseudosubstrat [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014; Galit Shohat et al, 2001]. Ebenfalls ist Ser308 in der Calcium/Calmodulin-Domäne lokalisiert, dessen Phosphorylierung zur Inaktivierung von DAPK führt [Galit Shohat et al, 2001].

Die extrakatalytischen Domänen umfassen 8 Ankyrin Repeats, 2 P-Loops, eine zytoskelettale Lokalisations-Domäne (ROC-COR) und eine Death-Domäne (DD) [Pratibha Singh et al, 2016; Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014; Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019].

Die 8 Ankyrin Repeats erleichtern Protein-Protein-Kommunikationen [Yijun Jin et al, 2002]. Sie interagieren zum Beispiel mit dem DAPK1 Interacting Protein (DIP1) und implizieren auf diese Weise den Abbau von DAPK1 über den Ubiquitin-Proteasom Pathway [Yijun Jin et al, 2002]. Zudem ordnen sie zusammen mit der zytoskelettalen Bindungs-Domäne (ROC-COR) DAPK durch Interaktion an die Aktinfilamente an, ein Verlust der Domänen hat demnach eine Mislokalisierung von DAPK in der Zelle zur Folge [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019; Ofer Cohen et al, 1997].

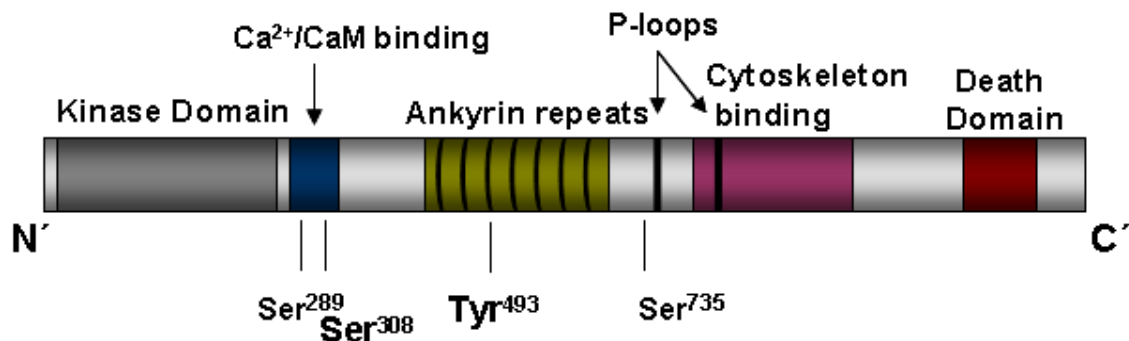


Abbildung 2: Schematische Darstellung der DAPK-Proteinstruktur
 aus Schneider-Stock et al, *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 2009

Über ein P-Loop-Motiv in der ROC-COR-Domäne wird GTP gebunden und durch eine intrinsische GTPase-Aktivität hydrolysiert [Rodrigo Carlessi et al, 2011]. Das gebundene GTP erhöht die Phosphorylierung von Ser308 und trägt so zum Aktivitätsverlust von DAPK bei [Rodrigo Carlessi et al, 2011; Ruth Shiloh et al, 2014]. Die Hydrolyse von GTP zu GDP bewirkt eine Konformationsänderung des DAPK-Proteins und zieht eine sofortige Abnahme der Autophosphorylierung von Ser308 und somit eine Aktivierung von DAPK mit sich [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014; Rodrigo Carlessi et al, 2011]. Die ROC-COR-Domäne hat jedoch nicht nur einen Einfluss auf die Regulation von DAPK, sondern auch auf zelluläre Funktionen, zum Beispiel durch Protein-Protein-Interaktion mit PIN1 [Ruth Shiloh et al, 2014].

Am C-terminalen Ende befindet sich die Death-Domäne, gefolgt von einem serinreichen 17-aa-Schwanz. Dieses ist ein typisches Phänomen bei Proteinen mit Death-Domänen [Pratibha Singh et al, 2016]. Die Death-Domäne ist größtenteils assoziiert mit Protein-Protein-Interaktionen und der Unterstützung der Kinase-Aktivität, darüber hinaus hat sie selbst apoptotische Funktionen [Pratibha Singh et al, 2016]. Sie vermit-

telt zum Beispiel die Interaktion zwischen ERK und DAPK und erhöht auf diese Weise die katalytische Aktivität von DAPK [Chun-Hau Chen et al, 2005]. Es lässt sich durch Experimente mit DAPK Δ DD-Mutanten vermuten, dass die Death-Domäne für die vollständige katalytische Aktivität von DAPK, aktiviert durch ERK, zwingend notwendig ist [Ruth Shiloh et al, 2014]. Diese Vermutung ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Ebenfalls wird PKM2, häufig in Krebszellen exprimiert, allein durch die Bindung an die Death-Domäne aktiviert [Ruth Shiloh et al, 2014]. Es wird hierfür die katalytische Funktion von DAPK nicht benötigt [I Mor et al, 2012]. Die Aktivierung von PKM2 führt zu einer erhöhten glykolytischen Rate und Laktat-Produktion [I Mor et al, 2012].

1.1.3. Regulation von DAPK1

Für einen funktionierenden Zellverband ist es wichtig, eine Balance zwischen Proliferation und Apoptose zu finden. Daher ist eine enge Kontrolle der stets anwesenden DAPK Kinase unabdingbar.

Ein wichtiger Kontrollmechanismus ist, wie oben bereits erwähnt, die Ca^{2+} /CaM-Autoregulator-Domäne. Sie supprimiert die Kinase-Funktion von DAPK, indem sie den katalytischen Spalt bindet und dort als Pseudosubstrat fungiert [Pratibha Singh et al, 2016]. Erst durch die Bindung von Calmodulin, das selbst durch Calcium aktiviert wird, kann sich die Ca^{2+} /CaM-Domäne vom katalytischen Spalt lösen und diesen für ein Substrat freigeben [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Hier ist vor allem das Zusammenspiel von Ca^{2+} /CaM und Ser308 ausschlaggebend, denn einerseits wird eine Autophosphorylierung von Ser308 durch das gebundene Calmodulin erschwert [Galit Shohat et al, 2001] und zum anderen erleichtert das dephosphorylierte Ser308 die Bindung von Ca^{2+} /CaM [Yijun Jin et al, 2006]. Durch diese erleichterte Bindung kann selbst bei einem niedrigen Calcium-Level die katalytische Aktivität von DAPK gesteigert werden [Pratibha Singh et al, 2016]. Ein weiterer Effekt der Dephosphorylierung von Ser308 ist eine Erhöhung des proteasomalen Abbaus von DAPK [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019]. Der bei ihrer Aktivierung gleichzeitig gesteigerte Abbau von DAPK schützt den Zellverband vor einer überschießenden Aktivierung von DAPK. Im inaktiven Zustand von DAPK ist Ser308 autophosphoryliert. Die Autophosphorylierung von Ser308 erfolgt durch die Nähe zur katalytischen Domäne und bewirkt umgekehrt eine erschwerte Bindung von Calmodulin, indem Ser308 die Interaktion zwischen Regula-

tor- und Kinase-Domäne stabilisiert [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Demnach müssen für eine vollständige Aktivierung der katalytischen Funktion von DAPK zwei Schritte erfolgen, erstens die Dephosphorylierung von Ser308 durch die Protein-Phosphatase 2 A (PP2A) [Ryan C. Widau et al, 2010] und zweitens die Bindung von Calmodulin. Die Dephosphorylierung von Ser308 wird durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel durch TNF- α [Yijun Jin et al, 2006], ER-Stress [D Gozuacik et al, 2008], Ischämie [Mehrdad Shamloo et al, 2005] oder Ceramide [Yijun Jin et al, 2006] stimuliert. Eine weitere Regulation der Dephosphorylierung erfolgt durch UNC5H, einem Rezeptor für Netrin-1 [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Bei Abwesenheit seines Liganden bindet er über die DD an DAPK und fördert die Interaktion mit PP2A und die sich anschließende Dephosphorylierung von Ser308 [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Bei einem Verlust der Ca²⁺/CaM-Domäne, wie es bei der Mutation DAPK Δ CaM der Fall ist, fällt dieser vor allem hemmende Regulations-Mechanismus weg und DAPK ist dauerhaft aktiviert.

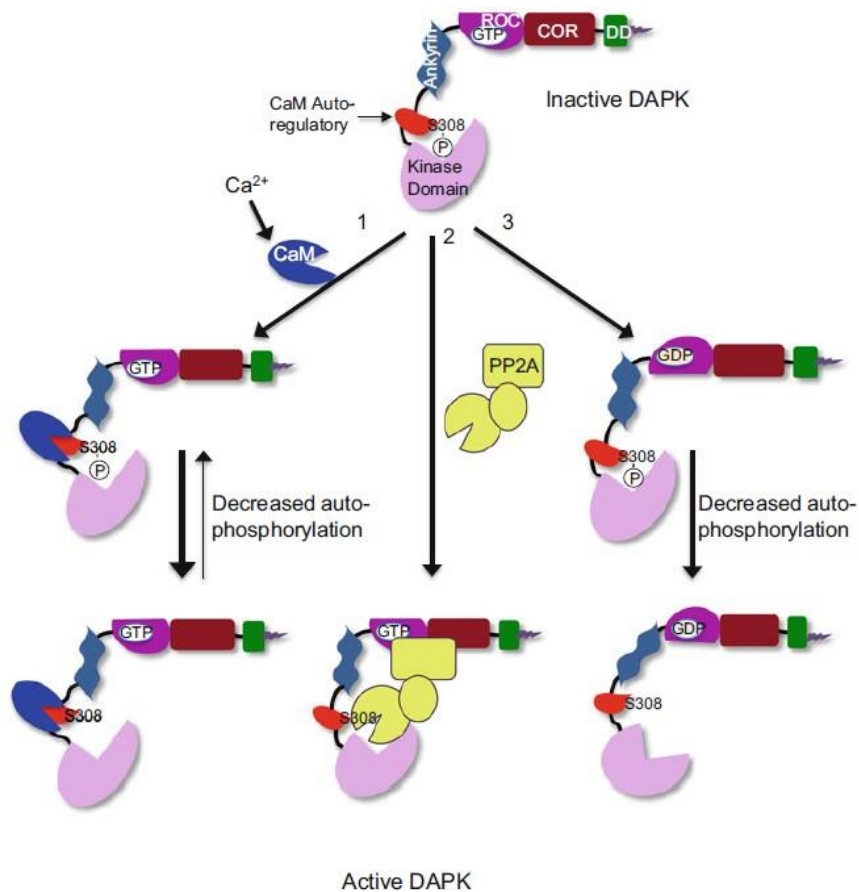


Abbildung 3: Aktivierung von DAPK

Es werden 3 Aktivierungsschritte von DAPK aufgezeigt. 1 Bindung von Calmodulin an die Ca²⁺/CaM-Regulator-Domäne mit nachfolgender Lösung der Domäne vom katalytischen Spalt und reduzierter Autophosphorylierung von Ser308. 2 Dephosphorylierung von Ser308 durch PP2A. 3 Konformationsänderung des DAPK-Proteins durch die Hydrolyse von GTP zu GDP mit resultierender reduzierter Autophosphorylierung von Ser308. Aus Shiloh et al, *The DAPK family: a structure-function analysis*, 2013

Die Bindung von GTP an die ROC-COR-Domäne ist ein weiterer Kontrollmechanismus. Wie in 1.1.2. beschrieben, erhöht das gebundene GTP die Phosphorylierung von Ser308 und trägt so zum Aktivitätsverlust von DAPK bei [Ruth Shiloh et al, 2014]. Erst durch die Hydrolyse von GTP zu GDP kommt es durch eine Konformationsänderung des DAPK-Proteins, die zu einem größeren Abstand von Ser308 zum katalytischen Zentrum führt, zu einer Abnahme der Autophosphorylierung und somit zu einer Aktivierung von DAPK [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014].

Ein weiterer Regulator von DAPK ist der Ras-Raf-MEK-ERK-Weg. Dieser Weg kann sich inhibierend, aber auch stimulierend auf DAPK auswirken. Bindet zum Beispiel ERK (Extracellular-Signal Regulated Kinases) an die DD von DAPK, so wird Ser735, angesiedelt in der ROC-Domäne, phosphoryliert und die katalytische Aktivität von DAPK gegenüber dessen Substrat MLC (Myosin Light Chain) verstärkt [Chun-Hau Chen et al, 2005]. Die Phosphorylierung von MLC ist dabei direkt abhängig von DAPK und kann zum Beispiel mit einem DAPK-Knockdown vermindert werden [Ya-Ting Chuang et al, 2008]. Bekommt die Zelle allerdings ein Proliferationssignal, so interagiert DAPK mit RSK (p90 Ribosomal S6 Kinase), einer Downstream-Kinase von ERK, und Ser289, gelegen in der Ca²⁺/CaM-Regulator-Domäne, wird phosphoryliert [Rana Anjum et al, 2005; Natalya Benderska and Regine Schneider-Stock, 2014]. Diese Phosphorylierung wirkt sich inhibierend auf die Kinase-Aktivität von DAPK aus [Rana Anjum et al, 2005].

Auswirkungen auf den Abbau von DAPK haben vor allem Protein-Interaktionen mit den Ankyrin Repeats und der Death-Domäne. Hier sind speziell das schon in 1.1.2. aufgeführte DIP1 oder Mib (Mindbomb E3 Ubiquitin Protein Ligase) [Liguo Zhang et al, 2007], sie führt über Bindung an die Ankyrin Repeats zur Ubiquitinierung und folglich zum Abbau von DAPK [Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh, 2019], außerdem TSC2 (Tuberous Sclerosis 2 Protein), das Protein bindet an die DD und vermittelt den lysosomalen Abbau von DAPK [Yao Lin et al, 2011], und schließlich KLHL20 (Kelch-like ECT2 Interacting Protein) zu nennen; letzteres bindet ebenfalls an die DD und führt über die Komplexbildung von DAPK mit KLHL20-Cul3-ROC1 E2-Ligase zur Polyubiquitinierung und einem nachgeschalteten proteasomalen Abbau von DAPK [Yu-Ru Lee et al, 2010].

Zuletzt soll noch die transkriptionale Regulation erwähnt werden. Durch Methylierung von Cytosin- und Guanin-reichen Abschnitten der DNA, sogenannten CpG-Inseln, kann

das DAPK-Gen stillgelegt werden [Natalya Benderska and Regine Schneider-Stock, 2014]. In verschiedenen Studien wird eine Korrelation zwischen dem Grad der Hypermethylierung und dem Ausmaß und des Fortschreitens der jeweils untersuchten Erkrankung vermutet [Xue-bin Wang et al, 2018; Prasant Yadav et al, 2018; Chinchu Jayaprakasha et al, 2017]. Der Verlust von DAPK scheint dabei ein wichtiger Schritt für die Aufhebung der Apoptose und die Akkumulation von genetischen Aberrationen zu sein.

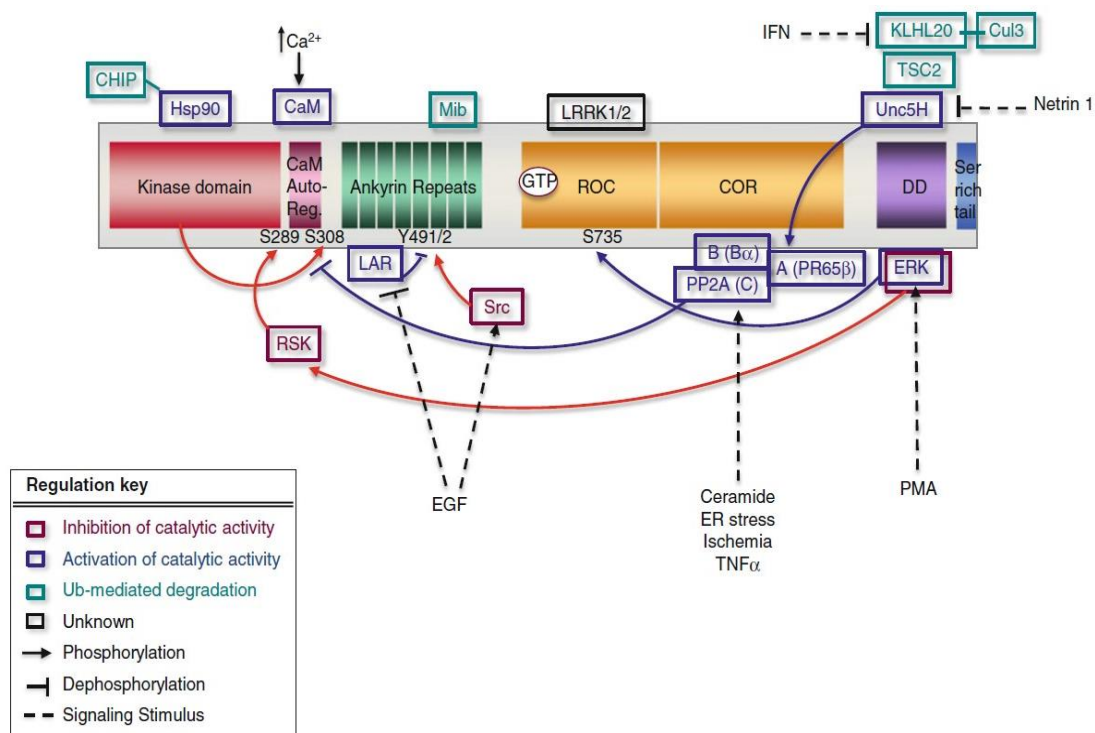


Abbildung 4: Regulations-Mechanismen von DAPK1
 Dargestellt sind verschiedene Proteine, die mit DAPK interagieren und sie auf diese Weise stimulieren bzw. inhibieren. DAPK-inhibierende Signale sind dabei in Rot, stimulierende Signale in Blau dargestellt. Ein Signal, das zum Abbau von DAPK führt, ist grün umrandet. Aus Bialik und Kimchi, *The DAP-kinase interactome*, 2014.

1.1.4. Das DAPK-Interaktom

Die zahlreichen Aufgaben von DAPK und die damit zusammenhängenden Substrate und Effektoren werden in dem breiten DAPK-Interaktom wiedergespiegelt. Obwohl sich bis heute zahlreiche Forschungsgruppen mit der Komplexität von DAPK beschäftigt

haben, sind noch einige Signalwege und Zusammenhänge ungeklärt und geben Anlass für weitere Untersuchungen.

Eine Aufgabe von DAPK-Interaktionen ist die Induktion von Apoptose und Autophagozytose, dies kann Caspase-abhängig und -unabhängig geschehen [Galit Shohat et al, 2001]. Zunächst soll der Apoptose vermehrte Beachtung geschenkt werden. Die Apoptose kann durch extrinsische oder intrinsische Stimuli ausgelöst werden [Susan Elmore, 2007]. Ein wichtiges pro-apoptotisches Protein ist p53, dieses kann einerseits direkt durch DAPK an Ser20 phosphoryliert und aktiviert oder in einer p19^{ARF}-abhängigen Weise stimuliert werden [Tal Raveh et al, 2001]. P19^{ARF} schützt dabei p53 vor dessen Abbau [Tal Raveh et al, 2001]. Dabei interagiert DAPK mit p53 über seine DD [Lei Pei et al, 2014]. Den Hinweis, dass DAPK als übergeordnetes Protein von p53 gesehen werden muss, lieferte ein Experiment von Raveh et al. mit DAPK-Knockout in MEFs. Es stellte sich heraus, dass bei DAPK^{-/-} sowohl das Level von p53 als auch das von p19^{ARF} im Vergleich zum Wild-Typ deutlich reduziert war. Im Gegensatz dazu fand man deutlich erhöhte Level nicht nur von p53 und p19^{ARF}, sondern auch von den p53-nachgeschalteten Proteinen Mdm-2 und p21 bei einer Überexpression von DAPK [Tal Raveh et al, 2001]. Ebenfalls vermittelt DAPK TNF- α -, IFN- γ - und Fas-Rezeptor-induzierte Apoptose [Pratibha Singh et al, 2016]. Die Caspase 3, ebenfalls proapoptotisch, gehört zu den exekutiven Caspasen und wird durch Spaltung der kleinen und großen Untereinheit, welche eine Konformationsänderung nach sich zieht, aktiviert [David R. McIlwain et al, 2013].

Als nächstes sollen die Interaktionen, die zur Autophagozytose führen, näher beleuchtet werden. Vor allem unter Stresskonditionen wie Hypoxie, Hungern oder oxidativem Stress wird die Autophagozytose verstärkt [Pratibha Singh et al, 2016; Vered Levin-Salomon et al, 2014]. Dabei beeinflusst DAPK den Ablauf auf zwei verschiedenen Wegen, erstens auf dem der Phosphorylierung von PKD (Protein Kinase D) [A Eisenberg-Lerner and A Kimchi, 2007] und zweitens der Phosphorylierung von Beclin-1 [Abb.5]. Die Phosphorylierung von PKD aktiviert diese und es folgt ihrerseits eine Phosphorylierung von Vsp34 (Phosphatidylinositol 3-Kinase) [Abb.5]. Die Induktion der Autophagozytose erfolgt über die weitere Aktivierung von PI3P (Phosphatidylinositol 3-Phosphat) [Pratibha Singh et al, 2016; Vered Levin-Salomon et al, 2014]. Die Interaktion von DAPK mit Beclin-1 hat ebenfalls die Aktivierung von Vsp34 zum Ziel. DAPK stört dabei die Bindung von Beclin-1 und Bcl-2 durch Phosphorylierung von Thr119 der

BH3-Untereinheit (Bcl-2 Homology Domain 2) von Beclin-1, dieses kann sich nun an Vsp34 binden und sie aktivieren [Pratibha Singh et al, 2016; Vered Levin-Salomon et al, 2014]. Die Bindung von Beclin-1 an das anti-apoptotische Protein Bcl-2 oder auch Bcl-X_L unter normalen Bedingungen hat die Inaktivierung von Beclin-1 zur Folge [Beth Levine et al, 2008]. Während oxidativen Stresses kann die Interruption von Beclin-1 und Bcl-2 auch mittels JNK (c-Jun N-terminale Kinasen), durch PKD aktiviert, vollzogen werden [Vered Levin-Salomon et al, 2014]. Die Aktivierung von PKD hat neben einer Induktion der Autophagozytose noch einen weiteren Effekt, sie aktiviert über JNK die programmierte Zellnekrose [A Eisenberg-Lerner and A Kimchi, 2007].

Ein weiterer Weg des Zelltodes geht über den NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Glutamat-Rezeptor. Eine verstärkte Interaktion zwischen DAPK und dem NMDA-Rezeptor ist bei Ischämie-bedingten neuronalen Schäden im Gehirn zu sehen [Weihong Tu et al, 2010]. Nach ischämischer Schädigung akkumuliert Glutamat an den neuronalen Synapsen und führt zur Überstimulation des Rezeptors, Folge ist ein verstärkter Ca²⁺-Einstrom, welcher letztendlich den Untergang der Nervenzellen mit sich zieht [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. DAPK, durch die Ischämie aktiviert, bindet an die regulatorische Untereinheit NR2B des NMDA-Rezeptors und führt zu einer verstärkten Rezeptor-Leitfähigkeit [Weihong Tu et al, 2010].

Auch bei der Onkogenese spielt DAPK eine Rolle, so phosphoryliert sie zum Beispiel PIN1 an Ser71 und inhibiert auf diese Weise die katalytische Aktivität und zellulären Funktionen von PIN1 in vitro und in vivo [Tae Ho Lee et al, 2011]. Im aktivierten Zustand ist PIN1 an der Zelltransformation beteiligt, dies umfasst unter anderem Zentrosom-Amplifikation, chromosomale Instabilität, abnormale Spindel-Formationen oder auch überschießendes Zellwachstum in NIH3T3-Zellen [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014; Tae Ho Lee et al, 2011; Hiromi Matsubara and Aiko Ogawa, 2014]. PIN1 könnte durch diesen Zusammenhang eine Schlüsselfunktion der Tumor-suppressiven Wirkung von DAPK darstellen [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Ebenfalls für die Onkogenese relevant ist die Interaktion von DAPK mit PKM2 (Pyruvat Kinase M2). Die Pyruvat-Kinase ist Teil der Glykolyse und konvertiert Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat und generiert dabei ein ATP. Ein erhöhtes Level von PKM2 findet sich in verschiedenen Tumorzellen wieder [Weibo Luo and Gregg L. Semenza, 2012]. Hier bewirkt diese Kinase in den Krebszellen eine gesteigerte Glucose-Aufnahme, Akkumulation von glykolytischen Metaboliten und eine metabolische Umstrukturierung [Weibo Luo and Gregg L. Se-

menza, 2012]. Auf diese Weise kann die Glykolyse und Laktatproduktion verstärkt werden [I Mor et al, 2012] und die Tumorzelle hat einen Wachstums- und Überlebensvorteil [Weibo Luo and Gregg L. Semenza, 2012]. Gua et al. beschreiben allerdings, anders als bei Krebszellen, eine verminderte PKM2-Aktivierung bei dem in PAH (Pulmonal-Arterielle Hypertonie) auftretenden gesteigerten hypoxischen Stress [Dongqing Guo et al, 2016].

Da DAPK am Actin-Zytoskelett lokalisiert ist und durch die räumliche Nähe verschiedene zytoskelettal-assoziierte Substrate besitzt, soll zuletzt noch die Interaktion von DAPK mit MLC und Tropomyosin erwähnt werden [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. Zum Beispiel kommt es durch eine verstärkte Acto-Myosin-Kontraktilität zum Membrane Blebbing [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014].

Der Einfluss von DAPK auf die Immunantwort soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher beleuchtet werden.

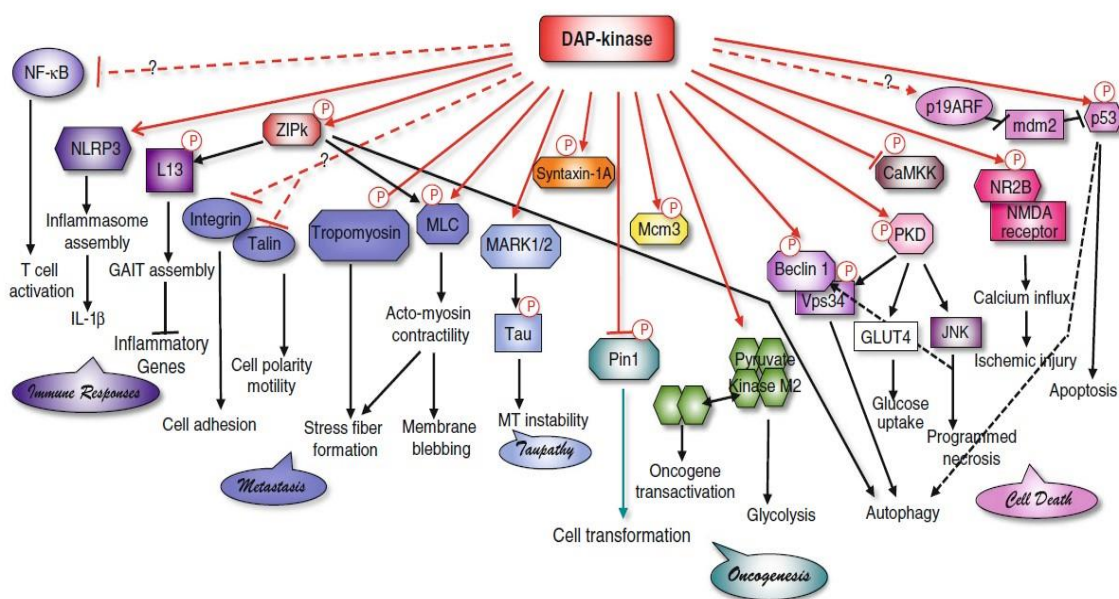


Abbildung 5: Das DAPK-Interaktom

Schematische Darstellung der Substrate von DAPK und ihren Signalwegen. Interaktionen, die abhängig sind von der Kinase-Aktivität, sind mit roten Pfeilen + P, Kinase-unabhängige Interaktionen nur mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeile spiegeln den weiteren Signalweg wider. Bei den gestrichelten Linien ist eine Abhängigkeit von DAPK noch nicht vollständig geklärt. Die verschiedenen Effektor-Gruppen sind farblich wie folgt gekennzeichnet: Immunantwort (lila), zytoskelettale Funktionen (blau), Onkogenese (grün), Apoptose und Autophagozytose (pink), noch nicht genau geklärte Effektoren (gelb, orange). Aus Bialik und Kimchi, *The DAP-kinase interactome*, 2014.

1.1.5. DAPK und Erkrankung



Abbildung 6: DAPK und Krankheit

Die vorliegende Abbildung zeigt einen Überblick, der Krankheiten, bei deren Entstehung DAPK eine Rolle spielt. Es sind neurodegenerative, kanzeröse und inflammatorische Erkrankungen vertreten. Aus Elbadawy et al., Novel Functions of Death-Associated Protein Kinases through Mitogen-Activated Protein Kinase-Related Signals, 2018

Betrachtet man die in 1.1.4. zahlreich aufgeführten Interaktionen von DAPK in der Zelle, so verwundert es nicht, dass eine Veränderung der DAPK-Expression bei einigen Krankheitsbildern wiederzufinden ist. Zum Beispiel wurde bei Patienten mit einer Alzheimer-Erkrankung ein erhöhtes Level von DAPK und eine gleichzeitig positive Korrelation von an Thr668 phosphoryliertem Amyloid Precursor Protein (APP) gefunden [Byong Mo Kim et al, 2016]. Diese Phosphorylierung von APP führt zu einem gesteigerten amyloiden Weg und damit zur vermehrten Produktion von Amyloid-beta(A β)-Peptiden, die anschließend in den neuronalen Zellen aggregieren und als neurotoxisch gelten [Byong Mo Kim et al, 2016]. DAPK könnte auf diese Weise eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Alzheimer-Erkrankung spielen und zugleich könnte ein DAPK-Inhibitor eine mögliche neue Therapieoption sein. Auch wurde DAPK in Zusammenhang mit einer ischämischen Schädigung von H9c2-Cardiomyozyten gebracht. Es ließ sich aufzeigen, dass bei einer Ischämie mit anschließender Überexpression von DAPK und deren pro-apoptischen Charakter die hemmende miR-98 einen positiven Effekt auf die Zellen hat [Chang-Lin Zhai et al, 2019]. Durch DAPK als direktes Target kann miR-98 deren Expression vermindern und durch die negative Korrelation die Apoptose inhibieren [Chang-Lin Zhai et al, 2019].

Im nachfolgenden Abschnitt soll der Zusammenhang von DAPK und Krebs-Erkrankungen näher beleuchtet werden. In frühen Stadien dieser Krankheiten besitzt die Autophagozytose eine tumorsuppressive Wirkung, indem Zellen abgebaut werden,

die zum Beispiel durch genetische Instabilität, metabolischen oder oxidativen Stress geschädigt sind [Pratibha Singh et al, 2016]. Im späteren Verlauf wird die Autophagozytose allerdings für die Tumorausbreitung benötigt [Pratibha Singh et al, 2016]. Ein Verlust von pro-apoptotischen Genen wie beispielsweise dem von p53 bietet den Krebszellen einen Selektionsvorteil [Jolyane Meloche et al, 2014]. Verschiedene Arbeiten beschreiben auch einen Verlust der DAPK-Aktivität bei Krebserkrankungen [Pratibha Singh et al, 2016; Mohamed Elbadawy et al, 2018; Shani Bialik and Adi Kimchi, 2004; Boaz Inbal et al, 1997; Futoshi Suizu et al, 2006; Nazzareno Galie et al, 2015]. Mutationen im DAPK-Gen selbst sind allerdings eher selten, andere Mechanismen wie Methylierung des Promotors, Autophosphorylierung der Ca²⁺/CaM-Domäne oder auch der Abbau von DAPK stehen im Vordergrund [S Steinmann et al, 2015]. Bei Krebserkrankungen spielt vor allem die DNA-Hypermethylierung eine wichtige Rolle [Jolyane Meloche et al, 2014; Shani Bialik and Adi Kimchi, 2004; Mohamed Elbadawy et al, 2018], es gibt jedoch große Unterschiede in der Methylierungsfrequenz zwischen den verschiedenen Krebsarten [Y Huang et al, 2014]. So wird zum Beispiel eine gesteigerte Methylierung der CpG-Inseln im DAPK-Genom bei Hypophysen-Tumoren [DJ Simpson et al, 2002], kleinzelligen Lungen-Tumoren, Kopf- und Nacken-Tumoren sowie B-Zell-Malignomen, T-Zell-Lymphomen [Shin-ichi Nakatsuka et al, 2003] und Schilddrüsen-Lymphomen [Shin-ichi Nakatsuka et al, 2000] beschrieben. Durch die Methylierung der Promotor-Sequenz wird die Transkription des DAPK-Gens gehemmt und es resultiert eine reduzierte Protein-Expression, die die Zellen vor apoptotischen Veränderungen bewahrt [Shin-ichi Nakatsuka et al, 2000]. Wie bereits in 1.1.4. angedeutet, ist DAPK für eine vollständige Antwort auf onkogene Transformationen notwendig [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2004]. Des Weiteren wurden zwei miRNAs identifiziert, miR103 und miR107, die DAPK und KLF4 als direktes Target haben und deren Expression supprimieren [Hsin-Yi Chen et al, 2012]. In kolorektalen Karzinomzellen wurde beobachtet, dass eine Metastasierung und ein schlechtes Outcome mit dem Grad der Überexpression von miR103 und miR107 und der daraus resultierenden Suppression von DAPK und KLF4 stark korrelierte [Hsin-Yi Chen et al, 2012].

Betrachtet man die vielseitigen Wechselwirkungen von DAPK innerhalb der Zellen und die Verbindung, die dieses Enzym zu einigen Krankheiten aufweist, so ist DAPK vielleicht ein Enzym, das in Zukunft als Angriffspunkt neuer Medikamente genutzt werden könnte.

1.2. Pulmonale Hypertonie

1.2.1. Definition

Unter dem Begriff der Pulmonalen Hypertonie versteht man einen hämodynamischen Zustand, der durch einen pulmonal-arteriellen Mitteldruck (PAPm) von ≥ 25 mmHg in Ruhe definiert wird [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Die Norm des PAPm liegt im Bereich von 14 ± 3 mmHg, als oberes Limit gelten 20mmHg [Amboss, Pulmonale Hypertonie und Cor pulmonale; Nazzareno Galiè et al, 2015]. Patienten mit einem PAPm zwischen 21 und 24mmHg befinden sich in einer Grauzone, deren klinische Relevanz noch nicht abschließend geklärt ist [2015 ESC/ERS Guidelines, 2016; Marius M. Hoeper et al, 2013]. Die Messung des PAPm erfolgt mittels Rechts-Herz-Katheter.

Die Pulmonal-Arterielle Hypertonie (PAH) ist eine der fünf Untergruppen der Pulmonalen Hypertonie und charakterisiert sich durch eine präkapilläre Pulmonale Hypertonie mit erhöhtem Lungengefäßwiderstand [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Per Definition müssen für die PAH drei verschiedene Kriterien erfüllt werden: erstens PAPm ≥ 25 mmHg in Ruhe, zweitens ein normaler pulmonal-arterieller Verschlussdruck (PAWP) von ≤ 15 mmHg und drittens ein pulmonal-vaskulärer Widerstand (PVR) > 240 dyn x s x cm⁻⁵ [Amboss, Pulmonale Hypertonie und Cor pulmonale; Nazzareno Galiè et al, 2015]. Zudem müssen für die Diagnosestellung der Pulmonal-Arteriellen Hypertonie andere Ursachen der Pulmonalen Hypertonie wie zum Beispiel chronisch thromboembolische Verschlüsse, Linksherzerkrankungen oder Lungenerkrankungen ausgeschlossen werden [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Bei der PAH ist vor allem die Veränderung der Gefäßwände verantwortlich für die erhöhte vaskuläre Scherspannung [Carlyne D. Cool et al, 2020].

1.2.2. Einteilung und Epidemiologie

Die Pulmonale Hypertonie lässt sich nach WHO, dies entspricht der Nizza-Einteilung von 2013, in fünf Untergruppen einteilen. Die Gruppierung erfolgt in erster Linie nach den verschiedenen Ursachen. Die nachfolgende Aufzählung entspricht der aus dem Deutschen Ärzteblatt entnommenen Abbildung 7 [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Zur ersten Gruppe, der Pulmonal-Arteriellen Hypertonie, gehören unter anderem die idiopathische PAH, hereditäre PAH und medikamentenassoziierte PAH. PAH kann auch

assoziiert sein mit HIV-Infektion, Bindegewebserkrankungen, portaler Hypertension oder auch angeborenen Herzfehlern. Die zweite Gruppe bildet zusammen mit der dritten Gruppe den größten Anteil der Pulmonalen Hypertonie [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Hier liegt der Pulmonalen Hypertonie eine Linksherz- oder Lungenerkrankung zu Grunde. Die vierte Gruppe repräsentiert die Chronisch-Thrombembolische Pulmonale Hypertonie (CTEPH). Zu ihr gehört allerdings, anders als der Name impliziert, jegliche Verlegung der Lungenstrombahn, zum Beispiel auch durch Tumore oder Entzündung. In der fünften Gruppe werden multifaktorielle Ursachen zusammengefasst wie zum Beispiel hämatologische Erkrankungen oder metabolische Störungen.

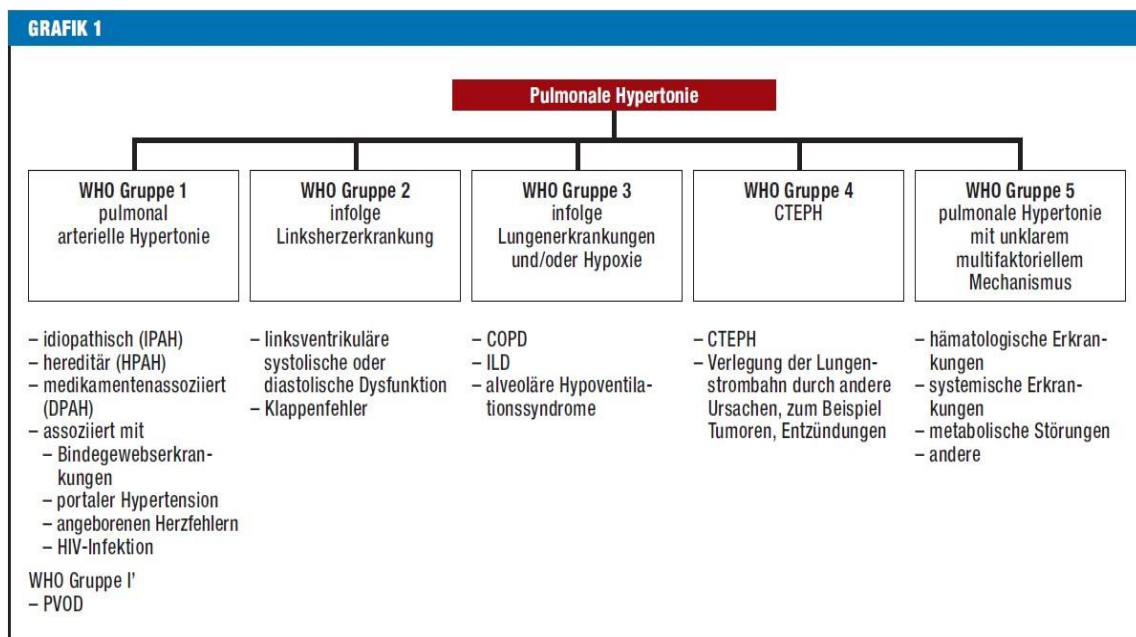


Abbildung 7: Einteilung der Pulmonalen Hypertonie

Dargestellt sind die 5 Hauptgruppen der Pulmonalen Hypertonie mit ihren häufigsten Ursachen. Aus Hoeper et al., Pulmonale Hypertonie, Deutsches Ärzteblatt Heft 5, 2017.

Abkürzungen: PAH, Pulmonal-Arterielle Hypertonie; CTEPH, Chronisch-Thrombembolische Pulmonale Hypertonie; COPD, Chronisch-Obstruktive Lungenerkrankung; ILD, Interstitielle Lungenerkrankung; HIV, Humanes Immundefizienzvirus; PVOD, Pulmonale Veno-Okklusive Erkrankung.

Von einer seltenen Krankheit kann man bei Pulmonaler Hypertonie nicht sprechen, es wird geschätzt, dass 1% der globalen Weltbevölkerung und sogar 10% der über 65-Jährigen an Pulmonaler Hypertonie leiden [MM Hoeper et al, 2016]. Die Inzidenz und Prävalenz unterscheidet sich allerdings sehr stark unter den einzelnen Gruppen der PH. Bei der Pulmonal-Arteriellen Hypertonie betrug die Inzidenz für das Jahr 2014 3,9 und die Prävalenz 25,9 pro eine Million Erwachsene [Marius M. Hoeper et al, 2015].

Dabei spielt in dieser Gruppe die idiopathische PAH-Unterform (IPAH) die größte Rolle [Marius M. Hoeper et al, 2015]. Der hämodynamische Zustand des Patienten ist dabei ein wichtiger prognostischer Faktor [Hiromi Matsubara and Aiko Ogawa, 2014]. Den größten Anteil bildet die Pulmonale Hypertonie aufgrund von Linksherz- oder Lungenerkrankungen. Die tatsächliche Inzidenz und Prävalenz lassen sich in diesen beiden Gruppen allerdings nur abschätzen. Man geht davon aus, dass etwa 50% aller Patienten mit einer Linksherzerkrankung im Laufe ihres Lebens eine Pulmonale Hypertonie entwickeln [Marius M. Hoeper et al, 2017].

1.2.3. Symptomatik und Therapie

Das Hauptsymptom aller Untergruppen der Pulmonalen Hypertonie ist die progrediente Dyspnoe [Amboss, Pulmonale Hypertonie und Cor pulmonale]. Hinzukommen können Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Der oftmals schleichende Beginn und die eher unspezifischen Symptome können eine Diagnose oftmals erschweren und verzögern. Bei Fortschreiten der Erkrankung können neben der Dyspnoe auch vermehrt Synkopen, vor allem unter Belastung, auftreten [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Ist dies schon bei geringer Belastung der Fall, so ist das ein Warnzeichen für eine gegebenenfalls lebensbedrohliche Situation [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Die Pulmonale Hypertonie führt im Verlauf der Erkrankung zum Anstieg der rechtskardialen Füllungsdrücke [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014] und folglich zu einer Rechtsherzinsuffizienz, deren Symptome Halsvenenstauung, Aszites und Ödeme sind [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Diese erhöhte Rechtsherz-Belastung mit einem zuletzt eintretenden Rechtsherz-Versagen ist die Haupttodesursache der Pulmonalen Hypertonie [Nabham Rai et al, 2018].

Da die Pulmonale Hypertonie als eine unheilbare Erkrankung gilt, liegt das Hauptaugenmerk der Therapie auf einer Symptomverbesserung und darauf, die Progredienz der Erkrankung zu verlangsamen [Marius M. Hoeper et al, 2017]. Um eine sinnvolle Therapie einzuleiten, ist es unabdingbar, die genaue Untergruppe zu definieren. Während für Gruppe zwei bis fünf die Therapie in den jeweiligen Leitlinien der Ursache zu finden ist, setzt die Therapie der PAH eher direkt bei der Bekämpfung der Symptome an [Marius M. Hoeper et al, 2017]. In Deutschland stehen im Moment für die PAH zehn Medikamente aus fünf verschiedenen Medikamentengruppen zur Verfügung, die je

nach Schwere der PAH als Mono- oder Kombinationstherapie verabreicht werden [Marius M. Hoeper et al, 2017].

1.2.4. Parallelen von Pulmonal-Arterieller Hypertonie und Krebsentstehung

Pulmonal-Arterielle Hypertonie ist gekennzeichnet durch eine exzessive Proliferation der glatten Muskelzellen (Smooth Muscle Cells, SMCs) und der Endothelzellen in den Lungenarterien [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014; S Adnot and S Eddahibi, 2007; Pradeep R. Rai et al, 2008], einer Apoptose-Resistenz der SMCs [Shen Zhang et al, 2003] und einer Expression von ebenfalls in Krebszellen vorkommenden Proteinen [M. Sean McMurtry et al, 2005; S Adnot and S Eddahibi, 2007]. Letztendlich führt diese Kombination zu einer pulmonal-arteriellen Okklusion und diese wiederum zu einem erhöhten Gefäßwiderstand, der in einer Rechtsherz-Belastung, einem Rechtsherz-Versagen und dem Tod gipfelt [Rajkumar Savai et al, 2014; Marc Humbert et al, 2004]. Die aufgeführten Mechanismen, die zur PAH führen, erinnern an die Entstehung von Krebszellen. Hanahan und Weinberg definieren acht verschiedene Eigenschaften, die in den meisten Krebszellen wiederzufinden sind: (1) Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, (2) Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, (3) Umgehung der Apoptose, (4) unbegrenztes replikatives Potential, (5) fortwährende Angiogenese, (6) Invasion von Gewebe und Metastasierung, [Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, 2000] (7) metabolische Modifikationen, (8) Umgehung der immunologischen Zerstörung [Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, 2011]. Im Hinblick auf die genannten acht Kriterien soll PAH erneut betrachtet und mögliche Parallelen aufgezeigt werden.

(1) Selbstversorgung mit Wachstumssignalen: Da sowohl PDGF als auch EGF die Proliferation von SMCs stimulieren, verwundert es nicht, dass man eine erhöhte Expression vor allem von PDGF und dessen Rezeptor bei PAH gefunden hat [Ralph Theo Schermuly et al, 2005]. Diese Tatsache wird im Therapieansatz mit Imatinib als PDGF-Inhibitor erfolgreich genutzt [Ralph Theo Schermuly et al, 2005]. Aber auch andere Wachstumsfaktoren wie Endothelin-1 und VEGF werden bei PAH verstärkt exprimiert [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Diese Konstellation versetzt die Zelle in einen hyperproliferativen Zustand. Ebenfalls wurden eine verminderte Expression an Kaliumkanälen und ein gesteigertes Membranpotential detektiert, die höchstwah-

scheinlich bei der Hyperproliferation und Apoptose-Resistenz mitwirken [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014].

(2) *Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren*: Ein wichtiger antiproliferativer Faktor ist TGF- β , dessen Signalverlust bei Krebszellen gut dokumentiert ist [Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, 2000]. Auch bei molekulargenetischer Untersuchung von pulmonal-arteriellen SMCs wurden heterozygote Mutationen des Bone Morphogenetic Protein Receptor II (BMPR-II), einem TGF- β -Rezeptor, bei 10-40% der idiopathischen PAH- und bei 58-74% der familiär belasteten PAH-Patienten gefunden [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Der Verlust des funktionierenden Rezeptors begünstigt das Zellwachstum und spielt eine wichtige Rolle bei PAH.

(3) *Umgehung der Apoptose*: Im Hinblick auf die Apoptose wurden viele verschiedene Veränderungen beobachtet. Man geht davon aus, dass die Apoptose-Resistenz ein Charakteristikum der PAH ist [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Beispiele hierfür sind die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins Bcl2 vor allem in den Endothelzellen der pulmonal-arteriellen Gefäße [Marilyne Lévy et al, 2006] und die bereits erwähnte Mutation des BMPR-II. Diese Mutation spielt nicht nur eine Rolle in der Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, sondern kommt auch bei der Apoptose-Resistenz zum Tragen. Die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Substrate des BMPR-II, können nicht mehr an ihren mutierten Rezeptor binden und verlieren so ihre Funktionen in der Inhibition der SMC-Proliferation und der Induktion der Apoptose [Shen Zhang et al, 2003]. Ebenfalls spielt die Familie der Inhibitoren der Apoptose, der zum Beispiel Survivin angehört, eine wichtige Rolle [S Adnot and S Eddahibi, 2007]. So wurde eine Überexpression von Survivin in pulmonal-arteriellen SMCs von PAH-Patienten gefunden, nicht aber in gesunden Zellen [M. Sean McMurtry et al, 2005]. Es wird vermutet, dass die Funktion von Survivin über eine Survivin-Mitochondrium-K⁺Kanal-Achse vermittelt wird [M. Sean McMurtry et al, 2005].

(4) *Unbegrenztes replikatives Potential*: Während die meisten Zellen in Krisensituationen sterben, gibt es wenige Zellen, die überleben und proliferieren [WE Wright et al, 1989]. Diese entarteten Zellen, bei PAH sind es die Endothelzellen [Rubin M. Tuder et al, 1994], besitzen eine genetische Instabilität und können plexiforme Läsionen bilden [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Zusätzlich können plexiforme Läsionen apoptose-resistente Myofibroblasten, glatte Muskelzellen oder undifferenzierte mesenchymale Zellen enthalten [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014].

(5) *Fortwährende Angiogenese*: Sowohl Endothelzellen als auch die glatten Muskelzellen der Pulmonalgefäße weisen erhöhte Level von Wachstumsfaktoren [Mohamed Izikki et al, 2009], wie VEGF und EGF auf [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Beide begünstigen eine verstärkte Angiogenese.

(6) *Invasion von Gewebe und Metastasierung*: Das Phänomen der Infiltration und Metastasierung von Krebszellen wurde bis jetzt bei PAH nicht beobachtet [S Adnot and S Eddahibi, 2007].

(7) *Metabolische Modifikationen*: Bei Krebszellen ist der sogenannte Warburg-Effekt vorzufinden. Dies bedeutet, dass die Zellen ihre Energie nicht mehr über die Atmungskette der Mitochondrien gewinnen, sondern durch eine gesteigerte Glykolyse [Otto Warburg et al, 1927; Otto Warburg, 1956]. Auch bei den pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen von PAH-Patienten konnte eine auf das Dreifache gesteigerte Glykolyse festgestellt werden [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014].

(8) *Umgehung der immunologischen Zerstörung*: Immunologische Zellen wie Leukozyten, Makrophagen und Lymphozyten finden sich nicht nur in den plexiformen Läsionen zum Beispiel bei einer idiopathischen PAH wieder [Rubin M. Tuder et al, 1994], sondern auch perivaskulär bei mit verschiedenen Bindegewebserkrankungen assoziierter PAH [Peter Dorf Müller et al, 2007]. Die Immunzellen begünstigen eine Ausschüttung verschiedener Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel VEGF, PDGF, FGF oder EGF, die eine zentrale Rolle bei PAH spielen könnten [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Die Vermutung, dass inflammatorische und autoimmune Prozesse die Entwicklung einer PAH beeinflussen könnten, wird durch diese Erkenntnisse verstärkt. [P. Dorf Müller et al, 2003].

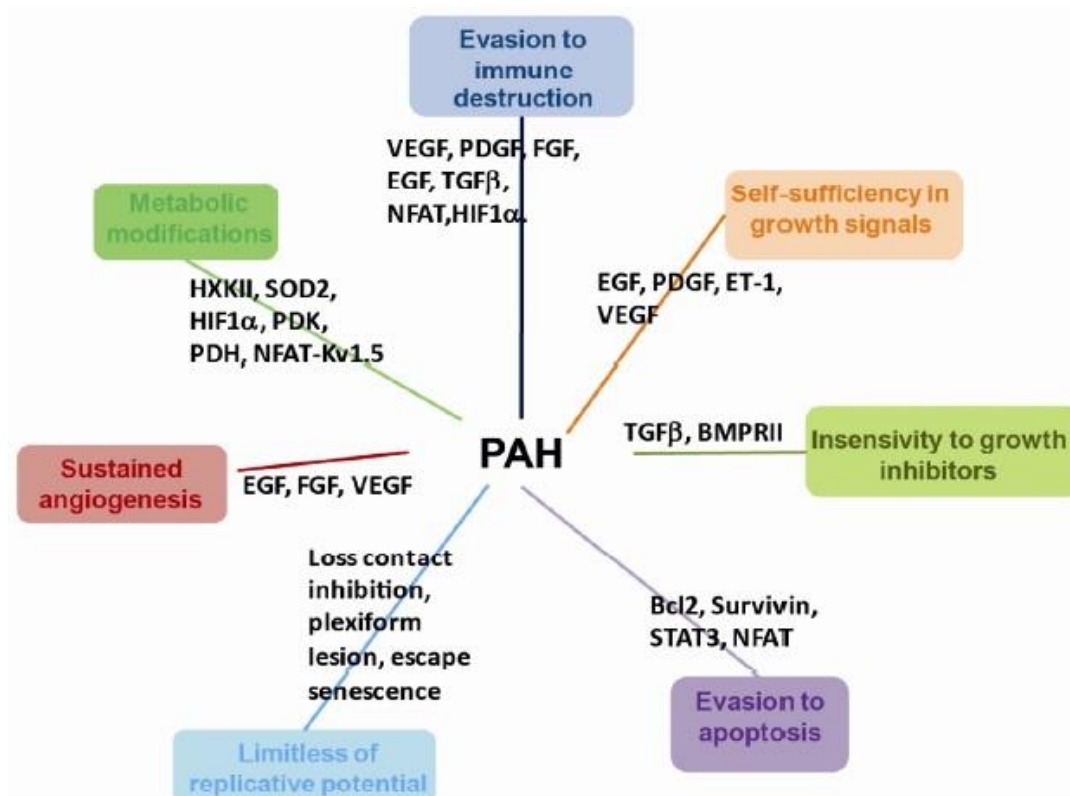


Abbildung 8: Ähnlichkeiten von PAH und Krebs

Im Schaubild sind 7 der 8 Merkmale für Krebszellen, definiert durch Hannahan und Weinberg, dargestellt, die ebenfalls auf PAH angewendet werden können. Ebenfalls werden für jede Kategorie die wichtigsten Proteine und Eigenschaften aufgezeigt. Aus Delom und Fessart, Pulmonary Arterial Hypertension and Cancer: An Update on Their Similarities, 2013

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich sieben der acht von Hannahan und Weinberg definierten Eigenschaften von Krebszellen bei Pulmonal-Arterieller Hypertonie wiederfinden. Obwohl PAH nicht zu den Krebserkrankungen gezählt werden kann, da die Zellen bei PAH vor allem nicht zur Invasion oder Metastasierung fähig sind, kann das Verhalten von Krebszellen zum besseren Verständnis der zellulären Dysregulation bei PAH beitragen [Frederic Delom and Delphine Fessart, 2014]. Die Parallelen könnten ebenfalls eine Möglichkeit in der Therapieentwicklung von PAH bieten.

1.2.5. DAPK und PAH

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine im Forschungsumfeld der Verfasserin bekannte Studien, die den Zusammenhang von DAPK und Pulmonal-Arterieller Hypertonie genauer beleuchten, mit Ausnahme der Arbeiten am eigenen Institut, dem ECCPS-Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hier wurde zu einem früheren Zeitpunkt die Expression von DAPK in pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen von IPAH-Patienten näher betrachtet und mit gesunden pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen verglichen. Dabei wurde beobachtet, dass eine deutliche Minderung des Proteinlevels von DAPK bei IPAH vorliegt. Dieses Ergebnis gab den Anstoß für weitere Untersuchungen in Bezug auf den Zusammenhang von DAPK und PAH.

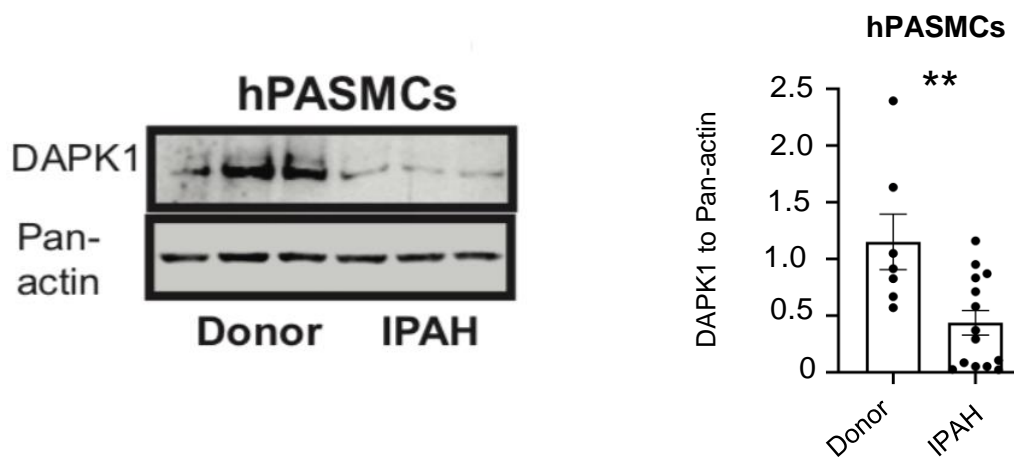


Abbildung 9: DAPK-Expression bei IPAH

Repräsentativer Western Blot und die Quantifizierung von humanen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (hPASMCs) von gesunden (Donor) und an idiopathischer Pulmonal-Arterieller Hypertonie erkrankten Patienten (IPAH). Als Ladekontrolle wurde Pan-actin verwendet.

Bereitgestellt von Caroline Smith, Doktorandin der Medizin, ECCPS Gießen

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Wie in Punkt 1.1. bereits ausführlich dargelegt, ist DAPK eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Regulation von Apoptose und Proliferation spielt. Aufgrund der Parallelen von PAH und Krebserkrankungen, deutlich aufgezeigt unter Punkt 1.2.4. dieser Arbeit, und dem Wissen darüber, dass DAPK in Krebszellen häufig dysreguliert ist, hat man, wie bereits in 1.2.5. erwähnt, den Zusammenhang von DAPK und PAH näher untersucht und dabei festgestellt, dass in

humanen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (hPASMCs) von IPAH-Patienten niedrigere DAPK-Protein-Level gefunden wurden als in gesunden Zellen. Das legt die Vermutung nahe, dass DAPK eine nicht unerhebliche Rolle bei einer PAH spielen könnte. Deshalb soll im experimentellen Teil der hier vorliegenden Arbeit zunächst der grundlegende Einfluss von DAPK in gesunden humanen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (hPASMCs) auf die Proliferation und die Expression von möglichen nachgeschalteten Proteinen näher beleuchtet werden, um damit eine Basis zu bereiten für weitere mögliche Untersuchungen über den Zusammenhang von DAPK und PAH.

In den Versuchsreihen sollten die Auswirkungen einer verminderten Expression, aber vor allem auch die einer erhöhten Expression von DAPK sowie die einer Stimulation der hPASMCs mit verschiedenen Wachstumsfaktoren experimentell untersucht werden. Zudem sollte eine NOX/HOX-Versuchsreihe einen Einblick in die DAPK-Expression unter hypoxischem Stress geben.

Der erste Teil der Versuche konzentriert sich auf die Unterexpression von DAPK: Mit Hilfe von siRNA und einem DAPK-Inhibitor wurde das Proteinlevel in den hPASMCs gesenkt und anschließend die Proliferation mittels BrdU-Proliferations-Assay überprüft. Die Zellen des siRNA-Settings wurden parallel durch verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert.

Der zweite Teil der Versuche konzentriert sich auf die Veränderungen in der Proliferation und der Expression von möglichen nachgeschalteten Proteinen durch eine DAPK-Überexpression. Hierfür wurden die hPASMCs mit vier verschiedenen Plasmiden (solitärer Vektor, DAPK, DAPK Δ CaM und DAPK K42A) transfektiert und anschließend die Proliferation mittels BrdU-Proliferations-Assay und die Protein-Expression über Western Blots untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Laborgeräte und -materialien

Terminus	Herkunft
15 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner, AUT - Kremsmünster
50 ml-Zentrifugenröhrchen	Greiner, AUT - Kremsmünster
Adhäsionsobjektträger SuperFrost® ULTRA plus	Langenbrink, CH - Bern
Alufolie	Carl Roth, DE - Karlsruhe
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, USA - Illinois
CELLGARD NU-480	ibs tecnomara, DE - Fernwald
Deckgläser	Langenbrink, CH - Bern
Direct-Q® Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, DE - Darmstadt
Entwicklungsmaschine CP 1000	Agfa, BE - Mortsel
Eppendorf Research® plus, 12-Kanal, 10 – 100 µl, (Multikanalpipette)	Eppendorf AG, DE - Hamburg
Eppendorf Research® plus, 0.5 – 10 µl, (Pipette)	Eppendorf AG, DE - Hamburg

Eppendorf Research® plus, 10 – 100 µl, (Pipette)	Eppendorf AG, DE - Hamburg
Eppendorf Research® plus, 100 – 1000 µl, (Pipette)	Eppendorf AG, DE - Hamburg
Elektrophoresekammer	Biometra, DE - Göttingen
Grade 3 mm Chr Blotting Paper	GE Healthcare, USA - Illinois
Heracell™ 150i (5% CO ₂ , 21% O ₂ , 37°C)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA - Massachusetts
Heracell™ 150i (5% CO ₂ , 5% O ₂ , 37°C)	Thermo Fisher Scientific Inc., USA - Massachusetts
Hypercassette	GE Healthcare, USA - Illinois
Infinite M200	TECAN, CH - Männedorf
Magnetrührer MR-Hei-Mix S	Heidolph, DE - Schwabach
Magnetstäbchen	Carl Roth, DE - Karlsruhe
Mikroskop DM IL	Leica, DE - Wetzlar
Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, DE - Nürnbrecht
Mikroreaktionsgefäße, DNase/RNase-	Sarstedt, DE - Nürnbrecht

frei, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA - Kalifornien
Mini-PROTEAN Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA - Kalifornien
Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab, VWR Life Science Competence, DE - Erlangen
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, UK - Lancing
Nitrocellulose-Membrane	Bio-Rad, USA - Kalifornien
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA - Massachusetts
NuPAGE 3-8% Tris-Acetat-Gel	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA - Massachusetts
Objektträger	Langenbrink, CH - Bern
Parafilm M 100 mm x 38 m	Bemis Company Inc., USA - Wisconsin
Pasteur-Pipetten Glas 230 mm	VWR, USA - Pennsylvania
Pasteur-Pipetten Plastik, 5 ml steril	VWR, USA - Pennsylvania
Pasteur-Pipetten Plastik, 5 ml lose	VWR, USA - Pennsylvania

Petrischale 60 mm rund, 100 mm rund	Sarstedt, DE - Nümbrecht
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH, DE - Biebertal
Pipettenspitze 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, DE - Nümbrecht
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA - Kalifornien
Reagiergefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, DE - Nümbrecht
Sarogold®-foil	Carl Roth, DE - Karlsruhe
Shaker WT16	Biometra GmbH, DE - Göttingen
Shaker WT17	Biometra GmbH, DE - Göttingen
Supported Nitrocellulose Membrane	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA - Kalifornien,
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA - New York
Waage (Präzisionswaage)	KERN & SOHN GmbH, DE - Balingen
Waage XS205 Dual Range (Analysenwaage)	Mettler Toledo, USA - Ohio
Wasserbad in Zellkultur	Memmert GmbH + Co. KG, DE - Schwabach

XCell SureLock™ Electrophoresis Cell	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Zellkultur 6-Well-Platten	Greiner, AUT - Kremsmünster
Zellkultur 24-Well-Platten	Greiner, AUT - Kremsmünster
Zellkultur 96-Well-Platten	Greiner, AUT - Kremsmünster
Zellschaber, klein 16 cm	Sarstedt, DE - Nümbrecht
Zellschaber, normal 25 cm	Sarstedt, DE - Nümbrecht
Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, DE - Tuttlingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, DE - Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco Biofuge	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, AUT - Kremsmünster

2.1.2. Chemikalien, Reagenzien und Lösungen

2-Propanol	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
3-8% Tris-Acetat-Gel, NuPAGE	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts

4-12% Bis-Tris-Gel, NuPAGE	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Albumin Bovin Fraction V, Protease free lyophil	SERVA Electrophoresis GmbH, DE - Heidelberg
Amersham, ECL Prime Western Blot- ting Detection Reagent	GE Healthcare, UK - Buckinghamshire
Bovines Serum Albumin, 2 mg/ml	BIO-RAD, USA - Kalifornien
CellProliferation ELISA, BrdU (colori- metrics)	ROCHE, CH - Basel
DC Protein Assay Reagent A DC Protein Assay Reagent B	BIO-RAD, USA - Kalifornien
EndoFree Plasmid Maxi Kit, Lot #154011206	QIAGEN GmbH, NLD - Venlo
Ethanol 70	SAV-LIQUID PRODUCTION GMBH, DE - Flintsbach am Inn
gibco® Distilled Water	life technologies, USA - Kalifornien
gibco® DMEM/F – 12 (1:1) (1X)	life technologies, USA - Kalifornien
Glycin PUFFERAN	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE - Karlsruhe
Halt Proteas & Phosphatase, Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts

LDS Sample Buffer (4x), NuPAGE	life technologies, USA - Kalifornien
Lipofectamin 2000 Reagent 1 mg/ml	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Methanol	Honeywell, USA - New Jersey
Milchpulver Blotting Grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE - Karlsruhe
MOPS SDS Running Buffer (20X), NuPAGE	Life technologies, USA - Kalifornien
OPTI-MEM I reduced Medium	life technologies, USA - Kalifornien
Pierce RIPA Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Phenylmethylsulfonylfluorid solution	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
Precision Prew, Protein Dual Color Standards	BIO-RAD, USA - Kalifornien
Sample Reducing Agent 10x, NuPAGE	life technologies, USA - Kalifornien
SMBM	Lonza Clonetics, CH - Basel
SMGM-Kit	Lonza Clonetics, CH - Basel
Sodium chloride	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri

Stripping Buffer WB Restore	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Tris-Acetat SDS Running Buffer (20X), NuPAGE	life technologies, USA - Kalifornien
TRIS PUFFERAN	Carl Roth GmbH + Co. KG, DE - Karlsruhe
Trypan Blue Solution	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
Trypsin/ EDTA 10x	PAN Biotech, DE - Aidenbach
Tween 20 Sigma Ultra	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
Viromer® YELLOW, Lot #VY02-02-09 Buffer YELLOW, Lot #B08-160504-VT	Lipocalyx, DE - Halle (Saale)

2.1.3. Antikörper und weitere Substanzen

Anti-Mouse IgG HRP, sek. AK	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
Anti-Rabbit IgG HRP, sek. AK	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
Bax (P-19)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
Bcl-2 (N-19)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas

Calbiochem® DAPK-Inhibitor	Merck, DE - Darmstadt
Caspase 3 (8G10)	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
Caspase 3 Cleaved (Asp 175)	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
Cleaved PARP (D214)	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
Cyclin D1 (H-295)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
Cyclin E (E-4)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
DAPK3 antibody, Polyclonal	Biorbyt, UK - Cambridge
Mdm2/ HDM2 Antibody	NOVUS BIOLOGICALS, USA - Colorado
Monoclonal ANTI-FLAG M2, Clone M2	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
P21 (C-19)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
P53	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
P53 (1C12)	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts

Pan-Actin Antibody	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
PARP (46D11)	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
PDGF beta recombinant human	PEPROTECH, DE - Hamburg
Phospho-DAPK1 (Ser308) Monoclonal Antibody (DKPS308)	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Phospho-PKM2 (Tyr105)	Cell Signaling TECHNOLOGY, USA - Massachusetts
PIN1 (H-123)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
PIN1 phospho (pSer16)	SIGMA-ALDRICH, USA - Missouri
PKM1 + PKM2, Pierce	Thermo Fisher Scientific Inc, USA - Massachusetts
Purified Mouse Anti-Human DAP Ki- nase,	BD Biosciences, USA - New Jersey
Recombinant Human IL-6	PEPROTECH, DE - Hamburg
TNF Alpha recombinant human	PEPROTECH, DE - Hamburg

2.1.4. Zellen, siRNA, Plasmide und Bakterien

Control siRNA-A: sc-37007	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
DAPK siRNA (h): sc-38976	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC., USA -Texas
hPASCs, Lot.No. 7F3560 d143	Lonza, CH - Basel
NEB 5-alpha Competent E. coli	NEW ENGLAND BIOLABS, USA – Massachusetts
Plasmidgrundgerüst: pRK5, 4754 bp - FLAG - DAPK - DAPK Δ CaM - DAPK K42A	BD Biosciences, USA - New Jersey

2.2. Methoden

Im Folgenden sollen nun die einzelnen Methoden, die für die Untersuchungsreihen im Labor verwendet wurden, näher beleuchtet werden.

2.2.1. Zellkultur

Für die hier beschriebenen Versuche wurden humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (hPASMCs) der Firma Lonza, Basel verwendet, die in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

2.2.1.1. Bedingungen in der Zellkultur

Jegliche Arbeit mit der hPASMC-Kultur fand unter sterilen Bedingungen statt. Hierzu wurden eine in einem separaten Raum stehende Sicherheitswerkbank sowie sterile Materialien und Reagenzien verwendet. Die Zellen wurden bei einer Temperatur von 37°C, einer O₂-Konzentration von 21%, sowie einer CO₂-Konzentration von 5% inkubiert.

2.2.1.2. Kultivieren, Splitten, Einfrieren

Die hPASMCs wurden in Smooth Muscle Growth Medium (SMGM) als Wachstumsmedium kultiviert. Dieses wurde zunächst mit einem SMGM-Kit von Lonza hergestellt. Hierfür wurde zu 500 ml Smooth Muscle Basal Medium (SMBM) 0,5 ml Insulin, 1 ml Human Basic Fibroblast Growth Factor (hFGF), 0,5 ml Human Epidermal Growth Factor (hEGF) und 25 ml Fetales Bovines Serum (FBS) hinzugegeben. 1 ml der in flüssigem Stickstoff konservierten Zellen wurde durch Handwärme aufgetaut und mit 1 ml, auf 37°C temperiertem, SMGM durch leichtes Auf- und Ab-Pipettieren vermischt, je 1 ml auf zwei 10 cm-Petrischalen gegeben und mit jeweils zusätzlichen 9 ml SMGM durch leichtes Bewegen verteilt. Die Kontrolle der gleichmäßigen Verteilung erfolgte mittels Lichtmikroskop. Nach 15-20 Stunden im Inkubator erfolgte der erste Medium-Wechsel. Anschließend wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

Um die Zellen zu splitten, erwärmte man zunächst eine Trypsin-Lösung, bestehend aus 5 ml Trypsin und 45 ml PTBS, und SMGM im Wasserbad auf 37°C. Anschließend wurde das Medium aus der Petrischale abgesaugt. Dieser Vorgang wurde nach Zugabe von 1 ml Trypsin wiederholt. Im Anschluss an eine erneute Zugabe von 1-2 ml Trypsin inkubierte man die Zellen für ca. 3 Minuten. Nach Beurteilung mittels Lichtmikroskop, ob die Ablösung der Zellen von der Petrischale stattgefunden hatte, wurden die Zellen zusammen mit ca. 10 ml SMGM in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Zugabe von SMGM stoppte hierbei eine weitere Trypsinisierung. Das Zentrifugenröhrchen wurde bei 1000 rpm für 1 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde nun erneut mit 1 ml SMGM gemischt und unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer und Trypan Blue die Gesamtzellzahl bestimmt. Je nach folgendem Versuch wurden die Zellen auf 10 cm-, 6 cm-Petrischalen, 6-Well- oder 96-Well-Platten weiter kultiviert.

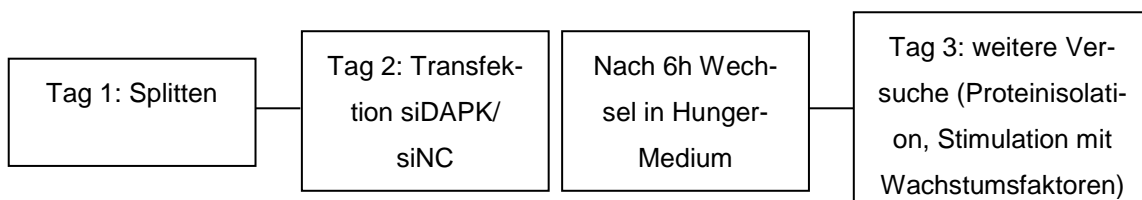
Um Zellen erneut einzufrieren, folgte man der obigen Beschreibung des Zellsplittens bis zum Punkt der Zentrifugation. Das entstandene Pellet wurde nun mit 900 µl SMGM und 100 µl DMSO suspendiert. Die Zellsuspension gab man anschließend in ein Freezing Tube und ließ sie mithilfe einer Kryobox über Nacht langsam auf -80°C herunterkühlen. Am nächsten Tag konnte der Transfer in flüssigen Stickstoff erfolgen.

2.2.1.3. NOX/HOX-Bedingungen

Für die durchgeführten Normoxie/ Hypoxie (NOX/HOX)-Experimente wurden die Zellen auf 6 cm-Petrischalen mit je 200.000 Zellen gesplittet. Während die eine Hälfte der Zellen hypoxischen Bedingungen (O₂-Konzentration 5%, CO₂-Konzentration 5%, 37°C) ausgesetzt wurde, verblieben die restlichen Zellen im Standardinkubator (O₂-Konzentration 21%, CO₂-Konzentration 5%, 37°C). Nach 12, 24, 48 und 72 Stunden wurden jeweils Proteine isoliert, bei -20°C eingefroren und anschließend gesammelt mittels Western Blot analysiert.

2.2.1.4. Transfektion mit siRNA

Um die Auswirkung von DAPK auf die Proliferation unter der Bedingung einer verringerten DAPK-Expression untersuchen zu können, wurde mithilfe der small interfering RNA-Moleküle die Expression des DAPK-Proteins vermindert. Small interfering RNA, kurz siRNA, sind einzel- oder doppelsträngige RNA-Moleküle, die selbst keine Proteine kodieren, sondern gezielt gegen eine bestimmte mRNA gerichtet sind und diese blockieren. Auf diese Weise wird eine Proteinexpression vermindert. In unserem Fall wurde eine siRNA gegen DAPK, kurz siDAPK, und eine Negativ-Kontrolle, kurz siNC, verwendet. Hierfür wurden an Tag 1 die hPASCs zunächst gesplittet und mit jeweils 4.000 Zellen pro Well (96-Well-Platte) für das nachfolgende Proliferations-Assay und 100.000 Zellen pro Well (6-Well-Platte) für eine Proteinisolation im Rahmen einer Erfolgskontrolle für weitere 24 Stunden in SMGM kultiviert. Am Folgetag konnte mit der eigentlichen Transfektion begonnen werden. Dafür wurde OPTI-MEM im Wasserbad und Lipofectamin 2000 bei Raumtemperatur erwärmt. Die small interfering RNA siDAPK und die Negativ-Kontrolle siNC ließ man langsam auf Eis auftauen. Nun konnten die 3 Lösungsansätze für die 96-Well-Platte vorbereitet werden. Lösung 1a beinhaltete pro Well 0,5 µl siDAPK und 25 µl OPTI-MEM. Lösung 1b 0,5 µl siNC und 25 µl OPTI-MEM pro Well. Für die beiden Konditionen wurde jeweils ein Tube mit Lösung 2 vorbereitet, diese enthielt 0,25 µl Lipofectamin und 25 µl OPTI-MEM pro Well. Anschließend ließ man Lösung 2 für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Im nächsten Schritt fügte man sowohl Lösung 1a mit 2 als auch Lösung 1b mit 2 zusammen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Anschließend wurden je 50 µl von 1a + 2 oder 1b + 2 in die jeweiligen Wells gegeben. Der Ablauf für die 6-Well-Platte lief identisch ab. Es wurde mit 3 µl siDAPK/ siNC und 150 µl OPTI-MEM, sowie 1,5 µl Lipofectamin und 150 µl OPTI-MEM kalkuliert. Nach 6 Stunden wurde das Medium vollständig entfernt und durch 100 µl (96-Well-Platte) und 2 ml (6-Well-Platte) SMBM als Hunger-Medium ersetzt.



2.2.1.5. Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Die Transfektion der hPASCs wurde wie oben beschrieben durchgeführt und nach 24 oder 48 Stunden mit der Stimulation begonnen. Es wurden PDGF- β , TNF- α , IL-6 und SMGM als Wachstums-Stimulantien verwendet. Zunächst wurden die bei -80°C kälte-konservierten Wachstumsfaktoren PDGF- β , TNF- α und IL-6 langsam auf Eis aufgetaut, während SMBM und SMGM im Wasserbad erwärmt wurden. Am Anfang der Versuchsreihe wurden Konzentrationen von 30 ng/ml für PDGF- β , 10 ng/ml für TNF- α und 50 ng/ml für IL-6 zur Stimulation verwendet. Die einzelnen Wachstumsfaktoren wurden auf 100 μ l SMBM angesetzt. Nach Absaugen des Mediums wurden pro Well 100 μ l der verschiedenen Wachstums-Stimulantien hinzugegeben. Eine Kontrolleinheit verblieb mit dem Hunger-Medium SMBM. Nach 24 oder 48 Stunden erfolgte ein BrdU-Proliferations-Assay. Im Laufe der Versuche wurden die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren auf 50 ng/ml für PDGF- β , 100 ng/ml für TNF- α und 100 ng/ml für IL-6 erhöht. Es erfolgte zusätzlich eine Proteinisolation und eine anschließende Western Blot-Auswertung.

2.2.1.6 Knockdown mit DAPK-Inhibitor

Die hPASCs wurden zunächst gesplittet und auf einer 96-Well-Platte für weitere 24 Stunden in SMGM kultiviert. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium abgesaugt und durch das Basalmedium SMBM ersetzt. Es erfolgte wiederum eine Inkubation von 24 Stunden. Um eine 10 mM-Lösung des DAPK-Inhibitors zu gewinnen, wurden 10 mg des Inhibitor-Pulvers in 3,6 ml DMSO gelöst. Anschließend wurde daraus mit SMBM eine 10 μ M Working Solution angesetzt. Die Working Solution bildete den Grundstock für die weitere Verdünnung mit SMBM auf 2 μ M, 1 μ M, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 20 nM und 10 nM. Parallel wurde der Inhibitor für eine Vergleichsreihe mit SMGM statt SMBM vorbereitet. Nach jeweils 1 Stunde Inkubation des Inhibitors wurde das Zellmedium abgesaugt und jeweils 100 μ l SMBM + Inhibitor oder SMGM + Inhibitor den Zellen hinzugefügt. Als Kontrollgruppen dienten Zellen, die lediglich SMBM oder SMGM als Zellmedium besaßen und weitere Gruppen mit DMSO+SMBM oder DMSO+SMGM. Nach weiteren 20 Stunden wurde ein BrdU-Proliferations-Assay durchgeführt, um die Auswirkung des Inhibitors auf das Zellwachstum auszuwerten.

2.2.2. Bakterien-Transformation, Plasmid-Isolation und -Transfektion

Für die Versuche mit einer Überexpression von DAPK und deren Mutanten Δ CaM und K42A wurden pRK5-Plasmide, bestehend aus 4754 Basenpaaren und im Besitz einer Ampicillin-Resistenz, als Vektoren verwendet.

2.2.2.1. Bakterien-Transformation

Für die Gewinnung der vier verschiedenen Plasmide wurden NEB 5-alpha-kompetente Escherichia-coli-Bakterien transformiert. Hierfür wurden die Bakterien zunächst aufgetaut und nach ca. 10 Minuten die Plasmide pRK5 FLAG DAPK, pRK5 FLAG DAPK Δ CaM, pRK5 FLAG DAPK K42A und pRK5-Vektor, hinzugegeben. Nach leichtem Auf- und Ab-Pipettieren wurden die Suspensionen 30 Minuten auf Eis stehen gelassen, anschließend für 30 Sekunden bei 42°C hitzegeschockt und erneut für 5 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 μ l raumtemperiertem SOC-Medium ließ man die Bakterien für 60 Minuten bei 37°C und 300 rpm stehen. Im weiteren Verlauf wurde die Suspension 5 Minuten bei 3.000 rpm zentrifugiert und ca. 90% des Überstandes verworfen. Es erfolgte eine erneute Suspension, mit der anschließend eine Ampicillin-haltige Agarplatte vollständig benetzt wurde. Die Platte wurde kopfüber bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit einer Pipettenspitze eine Bakterien-Kolonie aufgenommen und in 6 ml Medium, versetzt mit Ampicillin, gegeben. Bei 37°C und 220 rpm wurden die Bakterien erneut für ca. 6 Stunden inkubiert und anschließend in einen 1l-Flask mit 100 ml Medium überführt. Dieser wurde erneut über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert.

Für spätere Versuche wurde am Folgetag eine Glycerol-Kultur, bestehend aus 500 μ l Bakterienkultur und 500 μ l 50-prozentigem Glycerol, angesetzt und bei -80°C kältekonservert.

2.2.2.2. Plasmid-Isolation

Die Plasmid-Isolation erfolgte nach dem Protokoll der Firma Quiagen unter Verwendung des EndoFree Plasmid Maxi Kit an zwei Tagen.

Anfangs wurden 100 ml der vier Bakterienlösungen auf jeweils zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und diese bei 4°C und 6.000 x g 15 Minuten zentrifu-

giert. Der Überstand wurde verworfen und das erste Pellet mit 10 ml Buffer P1 resuspendiert. Diese Suspension wurde in das zweite Zentrifugenröhrchen überführt und auch dieses Pellet resuspendiert. Nach Zugaben von 10 ml Buffer P2 ließ man die Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. 10 ml auf 4°C gekühlter chilled Buffer P3 wurden nun hinzugegeben und nach erneutem Mischen die Suspension in den QIAfilter Cartridge gegeben. Bei noch nicht geöffnetem Verschluss wurde die Suspension erneut für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mittels leichten Druckes das Lysat in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen gepresst. Dem Lysat wurde nun 2,5 ml Buffer ER hinzugegeben und man ließ es für 30 Minuten auf Eis stehen. In der Zwischenzeit konnte der QIAGEN-trip-500-Filter vorbereitet werden und nach ca. 20 Minuten konnte man 10 ml Buffer QBT via Schwerkraft durchlaufen lassen. Im Anschluss wurde auch das Lysat mittels Schwerkraft gefiltert. Die Zielstrukturen, die Plasmide, verblieben dabei im Filter. Nach komplettem Durchlauf des Lysats wurde der Filter 2-mal mit je 25 ml Buffer QC Washing Buffer gewaschen. Um die Plasmide aus dem Filter zu lösen, nutzte man 15 ml Elution Buffer QN und fing die Überreste in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen auf. Diesem fügte man 10,5 ml Isopropanol hinzu und ließ es über Nacht bei 4°C stehen.

Am zweiten Tag wurden die Zentrifugenröhrchen bei 4°C und 15.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes fügte man 5 ml 70-prozentiges Ethanol hinzu und zentrifugierte erneut bei gleichen Bedingungen für 10 Minuten. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und ein weiß-flockiges Pellet blieb übrig. Das restliche Ethanol ließ man durch Lufttrocknen verdampfen. Dabei fixierte man das Zentrifugenröhrchen über Kopf. Dem übrig gebliebenen Pellet wurden 25 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben und es wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt. Die anschließende Konzentrationsmessung der Plasmide erfolgte mit einem Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer.

2.2.2.3. Plasmid-Transfektion

Für die Plasmid-Transfektion von hPASCs mit Viomer yellow wurden 4.000 Zellen pro Well auf eine 96-Well-Platte oder 100.000 Zellen pro Well auf eine 6-Well-Platte, gemäß dem in Abschnitt 2.2.1.2. beschriebenen Vorgang gesplittet und mit SMGM kultiviert. Die 6-Well-Platten wurden für spätere Proteinisolationen und die 96-Well-

Platten für BrdU-Proliferations-Assays genutzt. Die Plasmid-Konzentration und die dafür benötigte Menge an Substanzen wurden mithilfe von Tabelle 1 bestimmt. Hier gab es drei Abstufungen in niedrige, Standard- und hohe Konzentration.

Zu Beginn der Transfektion wurde SMBM im Wasserbad erwärmt und die verschiedenen zuvor gewonnenen Plasmide aufgetaut. Es erfolgte zunächst ein Medium-Wechsel der kultivierten Zellen von SMGM zu SMBM. Für die pDNA-Lösung wurde erst das benötigte Volumen der jeweiligen Plasmid-Lösung berechnet und dann die Plasmide mit Buffer yellow vermengt. Das benötigte Volumen an Buffer yellow war Tabelle 1 zu entnehmen. Für die Viomer-Lösung wurde Viomer yellow an die Wand eines Eppendorf-Gefäßes getropft und ihm anschließend Buffer yellow hinzugegeben. Ein sofortiges Mischen mittels Vortex Genie 2 für 3-5 Sekunden schloss sich daran an. Anschließend wurde die pDNA-Lösung in die Viomer-Lösung gegeben und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Die Mixtur wurde nun für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und in die verschiedenen Wells hinzugegeben. Nach ca. 5 Stunden wurden die Zellen einmal mit SMBM gewaschen und mit SMGM weiter inkubiert.

Tabelle 1: Mengenverhältnisse für Plasmid-Transfektionen mit Viomer yellow.

Well-Platte	pDNA-Lösung		Viomere-Lösung		Volumen pro Well
	Plasmid-Menge	Buffer yellow	Viomere yellow	Buffer yellow	
6 niedrig	1000 ng	90 µl	0,4 µl	9,6 µl	100 µl
6 Standard	2000 ng	180 µl	0,8 µl	19,2 µl	200 µl
6 hoch	3000 ng	270 µl	1,2 µl	28,8 µl	300 µl
96 niedrig	50 ng	4,66 µl	0,013 µl	0,32 µl	5 µl
96 Standard	100 ng	9,33 µl	0,027 µl	0,64 µl	10 µl
96 hoch	150 ng	14 µl	0,04 µl	0,96 µl	15 µl

2.2.3. BrdU-Proliferations-Assay

Um ein BrdU-Proliferations-Assay durchzuführen, wurden hPASCs mit je 4.000 Zellen pro Well auf einer 96-Well-Platte kultiviert und es fand entweder eine Stimulation

mit Wachstumsfaktoren oder eine Transfektion mit siDAPK/siNC oder Plasmiden statt. Als Vorbereitung für das Assay wurde SMBM im Wasserbad erwärmt und eine BrdU Working Solution, im Verhältnis BrdU zu SMBM 1:100, hergestellt. Nun wurde in jedes Well 10 µl BrdU Working Solution gegeben und die Zellen für weitere 4 Stunden in den Inkubator gestellt. In der Zwischenzeit wurde die Washing Solution auf 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Das Zell-Medium wurde anschließend abgesaugt und es erfolgte ein Waschgang mit 200 µl der Washing Solution pro Well. Im Anschluss daran wurde das Medium erneut vollständig abgesaugt und den Zellen 200 µl FixDenat hinzugefügt. Um die Zellen vollständig zu fixieren, ließ man die Well-Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen. Währenddessen wurde eine Lösung mit Anti-BrdU-POD Solution und Antibody D.S. im Verhältnis 1:100 angesetzt. Die Well-Platte wurde geleert und jeweils 100 µl der Anti-BrdU-POD Working Solution in die Wells gegeben, es erfolgte erneut eine Inkubation im Dunkeln für 1,5 Stunden. Bevor 100 µl des Substrates hinzugegeben wurden, erfolgte ein viermaliger Waschgang mittels Washing Solution. Nach Substrat-Zugabe war die absolute Blasenfreiheit zu beachten, um spätere Messstörungen zu minimieren. Die Well-Platte wurde vor der Auswertung nochmals im Dunkeln für 5 Minuten inkubiert. Die Messung erfolgte danach mittels Magellan-Infinite M200 mit einer Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 370 nm, Referenz 492 nm. Der Messvorgang wurde alle 5 Minuten wiederholt. Die Signifikanzauswertung erfolgte über GraphPad Prism 7 mittels unpaired t-test und one-way ANOVA.

2.2.4. Proteinisolation, -messung und -normalisierung

Die Proteinbestimmung wurde bei verschiedenen Versuchsaufbauten durchgeführt, bei den NOX/HOX-Experimenten, Stimulationen mit Wachstumsfaktoren und Transfektionen mit siDAPK/siNC oder Plasmiden.

Zu den Vorbereitungen für die Proteinisolation gehörten die Bereitstellung einer Eisbox, das Auftauen von PMSF und das Herunterkühlen der Zentrifuge auf 4°C. Zudem wurde eine RIPA-Lösung, bestehend aus 100 µl RIPA, 0,5 µl PMSF und 1 µl Protease- und Phosphatase-Inhibitor (für 6-Well-Platte) oder 200 µl, 1 µl PMSF und 2 µl Protease- und Phosphatase-Inhibitor (für 6cm-Petrischale) vorbereitet. Das Zell-Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der RIPA-

Lösung wurden die Zellen auf Eis gestellt und mit einem Gummikratzer vom Boden gelöst. Mittels Pipette wurde die Flüssigkeit in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 30 Minuten im Eis stehen gelassen. Anschließend wurden die Suspension bei 4°C und 12.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Das Lysat wurde in ein neues Gefäß pipettiert und für das weitere Vorgehen bei -80°C eingefroren.

Mittels Konzentrationsreihe wurden die einzelnen Konzentrationen der Proben bestimmt. Die Reihe (Blank, S1, S2 und S3) wurde aus RIPA, Wasser und BSA jeweils in dem in Tabelle 2 angegebenen Verhältnis angesetzt. 5 µl Lysat der einzelnen Proben wurden mit 5 µl Wasser für die Messung verdünnt.

Tabelle 2: Konzentrationsreihe für Proteinmessung

	RIPA	H ₂ O	BSA
<i>Blank</i>	5 µl	5 µl	-
<i>S1 (0,5µg/µl)</i>	5 µl	3,75 µl	1,25 µl
<i>S2 (1µg/µl)</i>	5 µl	2,5 µl	2,5 µl
<i>S3 (2µg/µl)</i>	5 µl	-	5 µl
<i>Proben</i>		5 µl	5 µl Lysat

Zu jeder Kondition wurden 25 µl DC Protein Assay Reagent A und 200 µl Reagent B hinzugegeben und nach Gebrauch eines Vortexmischers wurden sie bei Raumtemperatur und in Dunkelheit für 15 Minuten inkubiert. Je 200 µl wurden in eine 96-Well-Platte gegeben und anschließend mittels Magellan gemessen.

Zuletzt erfolgte die Normalisierung der Proben. Hierzu wurden die einzelnen Proben mit Wasser auf die niedrigste Konzentration verdünnt. 100 µl des neuen Lysats wurden mit 10 µl Sample Reducing Agent und 25 µl Loading Dye durch leichtes Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Bevor die Proben bei -80°C eingefroren wurden, ließ man sie auf Eis vollständig abkühlen. Alternativ konnte man mit den abgekühlten Proben direkt einen Western Blot starten.

2.2.5. Western Blot-Analyse

2.2.5.1. Gelelektrophorese, Blotting und Blocking

Für die Western Blot-Analyse wurden die Proteine der verschiedenen Proben wie oben beschrieben vorbereitet und wenn nötig langsam auf Eis aufgetaut. Die Gelelektrophorese-Kammer stellte man in eine große Eisbox, so dass sie fast vollständig von Eis umgeben war. Es wurde entweder ein 4-12-prozentiges Bis-Tris-Gel oder ein 3-8-prozentiges Tris-Acetat-Gel für die Gelelektrophorese verwendet. Nach Einspannen des Gels und eines Dummies gegenüberliegend wurde die innere Kammer mit MOPS SDS Running Buffer (für 4-12%) oder Tris-Acetat SDS Running Buffer (für 3-8%) vollständig und die äußere Kammer zur Hälfte gefüllt. Nach Entfernen des Gelkammes und der Reinigung der nun freiliegenden Kammern von eventuellen Gelresten wurden 30-40 µg der Proben und 5 µl des Markers, Protein Dual Color Standards, geladen. Nach Verschluss des Deckels wurde eine Spannung von 75 V angeschlossen. Bei einer zu geringen Proteinkonzentration erfolgte ein Nachladen. Wenn die bereits geladenen Proben die Unterkante der Kammer erreicht hatten, wurde die Gelelektrophorese unterbrochen, ein weiteres Probenvolumen in die Kammern pipettiert und erneut eine Spannung von 75 V angelegt. Nach Sichtbarkeit der ersten rosa Bande, Anzeichen dafür, dass das gesamte Protein im Sammelgel war, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Dauer der Gelelektrophorese orientierte sich an der Sichtbarkeit der letzten Bande des Markers und benötigte ca. 90 Minuten.

Der Gelelektrophorese schloss sich das Blotting an. Hierfür wurde das Gel vorsichtig ausgespannt und mit destilliertem Wasser gereinigt. Überflüssige Anteile wie Ladekammern, Sammelgel und seitliche Ränder wurden abgeschnitten. In die Blotting-Apparatur wurde folgendes Sandwich geschichtet: Vlies, 2 x Whatman Paper, Gel, 1 x Membran, 2 x Whatman Paper, Vlies. Zu beachten war, dass alles gut mit Blotting Buffer befeuchtet wurde und sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befanden. Die Blotting-Apparatur stellte man in eine große Eisbox und legte für 90 Minuten eine Spannung von 100 V an. Währenddessen wurde 5-prozentiger Milchpuffer, bestehend aus Milchpulver und TBST, bei Raumtemperatur erwärmt. Die Membran wurde für 60 Minuten in den Milchpuffer gelegt, sodass die gesamte Membran bedeckt war. Im Anschluss daran wurde die Membran 2- bis 3-mal mit TBST durch 5-minütiges Schwenken gewaschen.

2.2.5.2. Umgang mit Antikörpern und Entwicklung

Die gereinigte Membran wurde nach Planung der Zielgrößen, siehe Tabelle 3, zerschnitten, beschriftet und über Nacht bei 4°C auf einer Schwenkplatte in eine Primäre Antikörper-Lösung gegeben. Das Mischungsverhältnis von Primärem Antikörper und 5-prozentigem BSA ist ebenfalls Tabelle 3 zu entnehmen.

Am nächsten Tag wurde der Primäre Antikörper entfernt und die Membran 2- bis 3-mal mit TBST durch 5-minütiges Schwenken gewaschen. Der Sekundäre Antikörper, Maus oder Hase, wurde mit 5-prozentigem Milchpuffer auf 1:10.000 verdünnt und die Membran anschließend vollständig bedeckt. Nach 1 Stunde auf der Schwenkplatte wurde die Membran 6-mal mit TBST, jeweils 10-minütiges Schwenken, und 2-mal mit TBS, jeweils 5-minütiges Schwenken, gewaschen. Ziel des Waschens war, den störenden Hintergrund beim Entwickeln möglichst gering zu halten.

Tabelle 3: Verwendete Primär-AK, ihr Mischverhältnis, ihre Zielgröße und ihr Sekundär-AK

Primär-AK	Mischverhältnis mit BSA (5%ig)	Zielgröße	Sekundär-AK
Bax	1:2000	22kDa	Rb
Bcl-2	1:2000	27kDa	Rb
Caspase 3 Cleaved	1:500	17,19kDa	Rb
Cleaved PARP	1:1000	90kDa	Rb
Cyclin D1	1:1000	37kDa	Rb
Cyclin E	1:2000	50kDa	ms
DAPK 1	1:1000	160kDa	Ms
DAPK 3	1:1000	52kDa	Rb
Mdm2	1:1000	95kDa	Ms
ANTI-FLAG M2	1:1000 in 3%iger Milch	160kDa	Ms
P21	1:1000	21kDa	Rb
P53	1:2000	53kDa	Rb
P53	1:2000	53kDa	Ms
Pan-Actin	1:2000	45kDa	Rb
PARP	1:1000	120kDa	Rb
P-DAPK1	1:1000	160kDa	Ms
P-PKM2	1:1000	60kDa	Rb
PIN-1	1:1000	18kDa	Ms
PPIN-1	1:1000	18kDa	Rb
PKM 2	1:1000	60kDa	Rb

Die Entwicklung der Membranen erfolgte mittels Amersham, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent. Nach Reinigung der Arbeitsfläche wurde diese mit Frischhalte-

folie ausgelegt und die Membranstücke daraufgelegt. Die Entwickler-Lösung wurde mit Solution A und B 1:1 angerührt. Es war darauf zu achten, dass ein abgedunkeltes Zentrifugenröhrchen benutzt wurde und die Umgebung möglichst dunkel war. Anschließend wurde die Lösung auf die Membranstücke gegeben und man ließ sie für 5 Minuten unter einer Abdeckung einwirken. Währenddessen reinigte man die Filmkassette mit Ethanol. Nach Einlage der Membranstücke zwischen die Folien der Filmkassette wurde sie entwickelt. Falls keine klaren Banden zu erkennen waren, wurde die Membran nochmals 2-mal mit TBST gewaschen und die Entwicklungsschritte wiederholt.

Nach der Entwicklung wurde die Membran entweder getrocknet und somit konserviert oder gestrippt und dadurch für einen weiteren Primär-Antikörper vorbereitet. Nach einmaligem Waschen mit TBST wurde für 20-30 Minuten Stripping Buffer auf die Membran gegeben, je nachdem wie stark das Signal des vorherigen Antikörpers war. Danach schlossen sich nochmals drei Waschgänge mit TBST an. Die Membran wurde wieder über Nacht bei 4°C in den neuen Primär-Antikörper gelegt und auf eine Schwenkplatte gestellt. Der weitere Ablauf wiederholte sich wie oben beschrieben.

2.2.6. Statistische Auswertung

Sowohl die graphische Darstellung als auch die statistische Analyse wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism 7 angefertigt, wobei stets mit Mittelwerten und deren Standardabweichungen gearbeitet wurde. Die Auswertung erfolgte bei lediglich zwei Proben mittels ungepaarten T-Tests, bei mehr als zwei Proben mittels One Way ANOVA. Signifikante Unterschiede wurden je nach p-Wert mit * bis **** gekennzeichnet, * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Größere p-Werte wurden als nicht signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. NOX/HOX-Experimente

Für die durchgeführten Experimente wurden die hPASCs gemäß oben beschriebener Methode behandelt und die Proteine nach 12, 24, 48 und 72 Stunden isoliert. Die Proteine DAPK, Pan-actin als Vergleichsreferenz zwischen den einzelnen Konditionen und HIF-1 α als Hypoxiemarker wurden hierfür ausgewertet. Zunächst wurde DMEM als Medium für die Versuche genutzt. Hier zeigt sich sowohl für die normoxische, als auch für die hypoxische Kondition eine leichte Erhöhung der DAPK-Expression. Zwischen den einzelnen Konditionen fällt nur zum Zeitpunkt von 72 Stunden ein deutlicher Unterschied an DAPK-Protein auf. Die Frage stellte sich, ob DMEM selbst für die Zellen toxisch wirkte oder die Hungersituation der Zellen Grund für die Hochregulation der DAPK-Expression war. Das NOX/HOX-Experiment wurde daher mit verändertem Medium wiederholt. Als Hungermedium wurde diesmal SMBM eingesetzt.

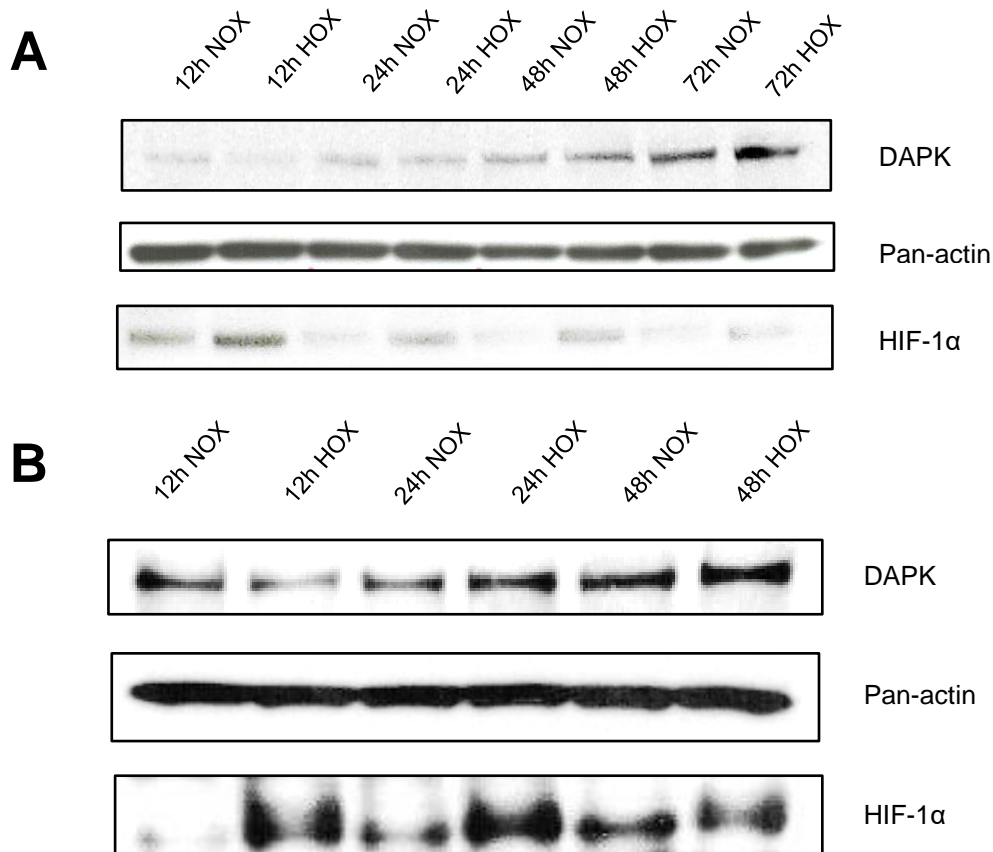


Abbildung 10: hPASCs d143, NOX/HOX-Konditionen

Die Zellen wurden nach dem Splitten mit je 200.000 Zellen auf 6cm-Petrischalen kultiviert. **A** Als Medium wurde DMEM genutzt und die Proteine nach 12, 24, 48 und 72 Stunden isoliert. **B** Nährmedium war SMBM. Die Proteinisolierung fand nach 12, 24 und 48 Stunden statt.

Auch unter neuem Medium ist sowohl bei Normoxie ein leichter und bei Hypoxie ein deutlicher Anstieg von DAPK-Protein zu verzeichnen. Dies kann als Anzeichen dafür gewertet werden, dass die Hungersituation der Zellen selbst eine Indikation zur vermehrten DAPK-Expression darstellt. HIF-1 α ist bei beiden Durchführungen unter Hypoxie verstärkt exprimiert, sodass von einem gelungenen Hypoxie-Setting ausgegangen werden kann.

3.2. Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Das Wachstum der hPASMCs wurde nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren sowohl bei unbehandelten Zellen als auch bei siDAPK-/ siNC-transfektierten Zellen mittels BrdU-Proliferations-Assay ermittelt.

3.2.1. Stimulation der nativen hPASMCs

Die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren Platelet Derived Growth Factor β (PDGF- β), Tumornekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 6 (IL-6) und dem Wachstumsmedium SMGM erfolgte nach der in 2.2.1.5. beschriebenen Methode. Als Referenz wurde SMBM als Medium verwendet. Die Proteine wurden nach 24, 48 und 72 Stunden Stimulation isoliert und ausgewertet. Es lässt sich zeigen, dass die Expression des DAPK-Proteins unter Wachstumsstimulation mit PDGF- β , TNF- α und IL-6 im Vergleich zu SMBM an allen 3 Zeitpunkten deutlich vermindert ist. SMGM zeigt eine ähnliche Tendenz, allerdings weniger stark ausgeprägt. Bei SMBM ist über die gesamte Zeitdauer ein annähernd gleiches Level an Proteinexpression zu sehen. Ebenfalls zu vermerken ist eine über die 3 Zeitpunkte stetige Abnahme der DAPK-Proteinexpression in den Konditionen PDGF- β , TNF- α , IL-6 und SMGM.

Die hier gemachte Beobachtung einer verminderten Expression von DAPK unter Proliferation bestätigt die allgemeine Annahme, dass pro-apoptische Enzyme in Phasen starken Wachstums gehemmt werden.

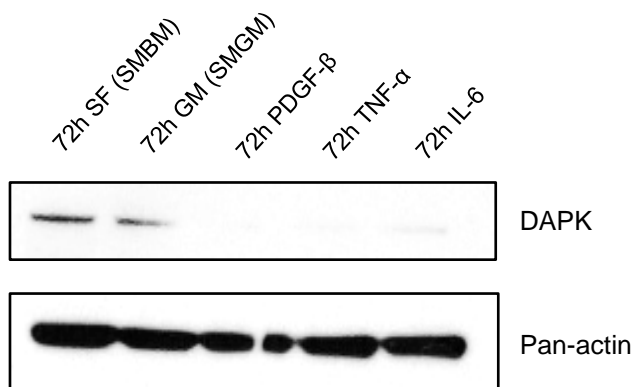
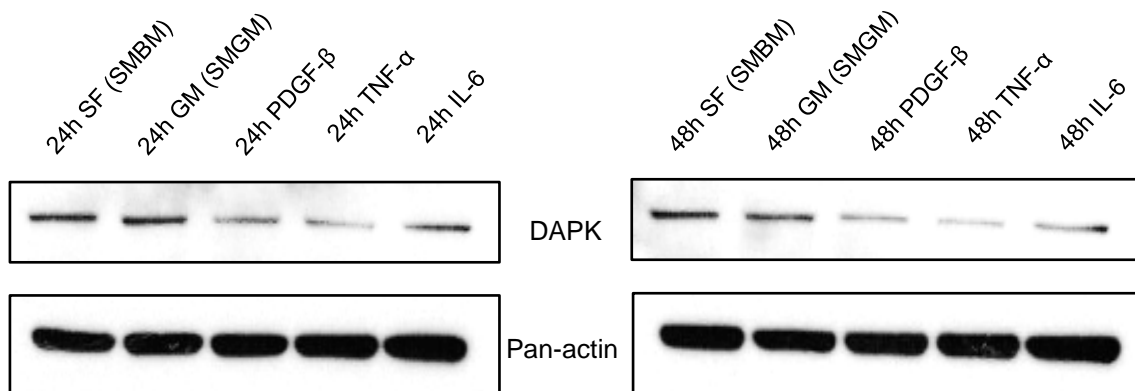


Abbildung 11: Stimulation von hPAS-MCs mit Wachstumsfaktoren

Für die Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-β, TNF-α, IL-6 und dem Wachstumsmedium SMGM wurden je 100.000 Zellen auf eine 6-Well-Platte gesplittet und anschließend stimuliert. Als Referenz wurde SMBM als serumfreies Medium verwendet. Nach 24, 48 und 72 Stunden Stimulation wurden die Proteine isoliert und die Expression von DAPK und Pan-actin ausgewertet. repräsentativer Westernblot, n=2

3.2.2. Stimulation der mit siDAPK und Negativ-Kontrolle (siNC) transfektierten hPASMCs

Um der Vermutung eines Zusammenhanges zwischen Proliferation und verminderter DAPK-Expression näher zu kommen, wurden die Zellen mit siDAPK und siNC transfektiert und erst dann stimuliert. In der Theorie wurde erwartet, dass die Proliferation der hPASMCs durch den Knockdown von DAPK via siDAPK deutlich erhöht sein würde. Allerdings konnte dies in den durchgeführten Versuchen nicht bestätigt werden. Lediglich für TNF-α bei einer Stimulation von 24 Stunden ist ein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen siDAPK und siNC zu erkennen. Jedoch ist in dieser Konstellation die Proliferation bei siDAPK-Bedingung nicht erhöht, sondern vermindert. Selbst nach Erhöhung der Konzentrationen der Wachstumsfaktoren von 30 ng/ml auf 50 ng/ml für PDGF-β, von 10 ng/ml auf 100 ng/ml für TNF-α und von 50 ng/ml auf 100 ng/ml für IL-6 und einer verlängerten Stimulation von 48 Stunden lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen siDAPK und siNC-Bedingung aufzeigen.

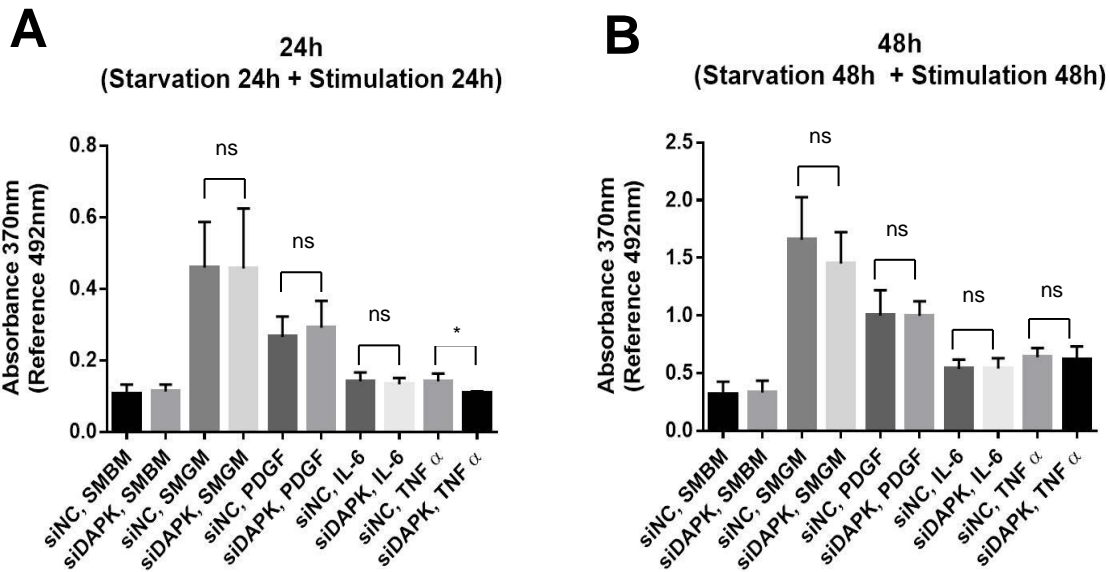


Abbildung 12: BrdU-Proliferations-Assay mit siDAPK-/ siNC-Transfektion von hPASCs

A Die transfektierten Zellen wurden mit einer Konzentration von 30ng/ml für PDGF- β , 10ng/ml für TNF- α und 50ng/ml für IL-6 für 24 Stunden stimuliert. **B** Erhöhte Konzentration der Wachstumsfaktoren von 50ng/ml für PDGF- β , 100ng/ml für TNF- α und 100ng/ml für IL-6 und einer 48 stündigen Stimulation. Anschließend wurde ein BrdU-Proliferations-Assay durchgeführt und die verschiedenen Konditionen mittels Unpaired T-Test analysiert. * $p < 0,0258$, ns nicht signifikant.

Um sicherzustellen, dass die Ergebnisse nicht von einer fehlgeschlagenen Transfektion ausgingen, wurden parallel zu den BrdU-Proliferations-Assays Zellen für eine Proteinisolation transfektiert. Die Western Blots zeigen, dass vor allem nach 24 Stunden ein deutlicher Unterschied in den Proteinleveln von DAPK zwischen siDAPK- und siNC-Kondition vorzufinden sind.

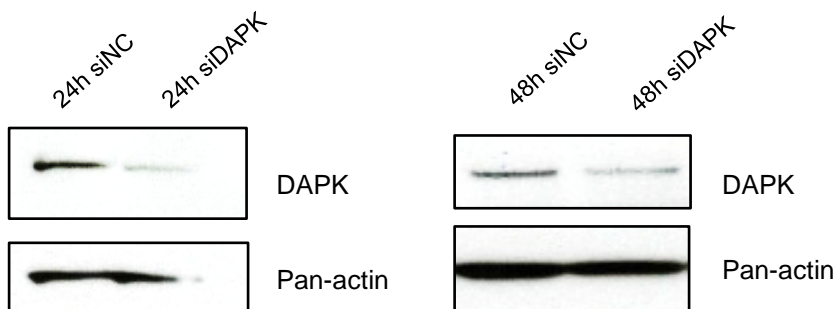


Abbildung 13: Erfolgskontrolle Transfektion mit siDAPK/ siNC

Nach der Transfektion von hPASCs mit siDAPK und siNC wurden nach 24 und 48 Stunden Proteine isoliert, um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen. repräsentativer Westernblot, $n=2$

3.3. Hemmung von DAPK mit dem DAPK-Inhibitor TC-DAPK 6

Als Inhibitor wurde der hochspezifische DAPK-Inhibitor (4Z)-4-(3-Pyridylmethylene)-2-styryl-oxazol-5-one (TC-DAPK 6) verwendet ($IC_{50} = 69 \text{ nM}$ und 225 nM gegen DAPK1 und DAPK3) [Masako Okamoto et al, 2009]. In der Theorie wurde überlegt, dass auch der Knockdown von DAPK mittels Inhibitor eine gesteigerte Proliferation der hPASCs hervorrufen müsste, da die pro-apoptotische Wirkung von DAPK gehemmt würde. In den durchgeführten Versuchen konnte diese Erwartung allerdings nicht bestätigt werden. Weder beim Versuchsaufbau mit SMBM noch mit SMGM kann ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen aufgezeigt werden.

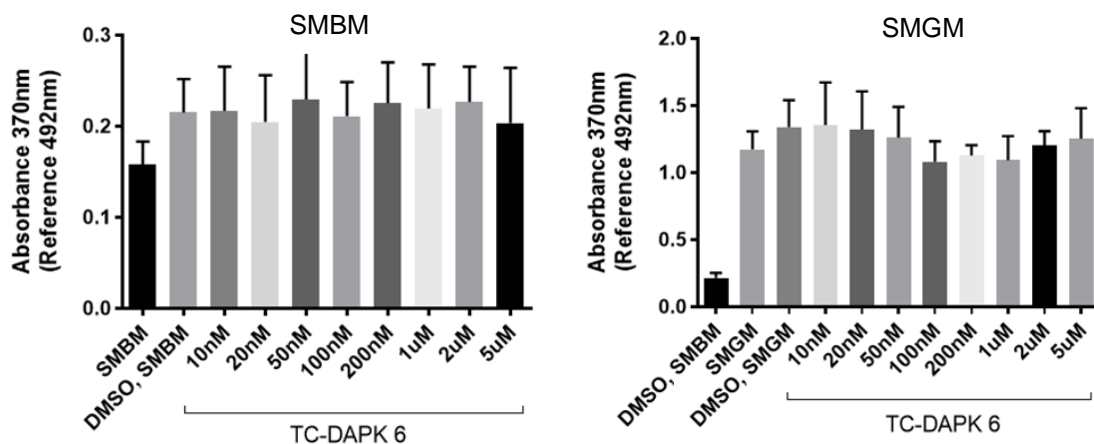


Abbildung 14: DAPK-Inhibitor Versuchsreihe mit dem hochselektivem DAPK Inhibitor (4Z)-4-(3-Pyridylmethylene)-2-styryl-oxazol-5-one (TC-DAPK 6) in verschiedenen Konzentrationen von 10nM bis 5µM. Lösung des Inhibitor Pulvers in DMSO auf 10mM, weitere Verdünnung mit SMBM oder SMGM.

3.4. Transfektion mit Plasmiden

Die Verwendung von Viomer yellow ermöglichte eine, selbst für große Moleküle wie DAPK mit 160 kDa geeignete Transfektion ohne Verwendung von Viren als Träger. Die Transfektion wurde dadurch stark vereinfacht und auf ein niedrigeres Sicherheitslevel gebracht. Zunächst musste die Methode und die verschiedenen Mengen an Plasmiden, vgl. Tabelle 1, ausgetestet werden. Es wurden Mengen von 1, 2 und 3 µg Plasmid transfektiert und mittels Proteinisolation und Western Blot ausgewertet. Da nur DAPK und deren Mutationen ΔCaM und K42A FLAG besitzen, ist bei dem alleinigen Vektor keine Proteinbande bei einer Entwicklung mit Anti-FLAG zu sehen. Ebenfalls ist

die etwas tiefer liegende Bande bei DAPK Δ CaM, vor allem ersichtlich bei 1 μ g und 3 μ g, zu erwähnen. Der Erfolg der Transfektion wird ebenfalls durch die Überexpression von DAPK verdeutlicht. Da zwischen 2 μ g und 3 μ g Plasmid kein großer Unterschied der DAPK-Expression zu sehen ist, entschloss ich mich, die nachfolgenden Western Blot-Versuche mit einer Menge von 2 μ g durchzuführen.

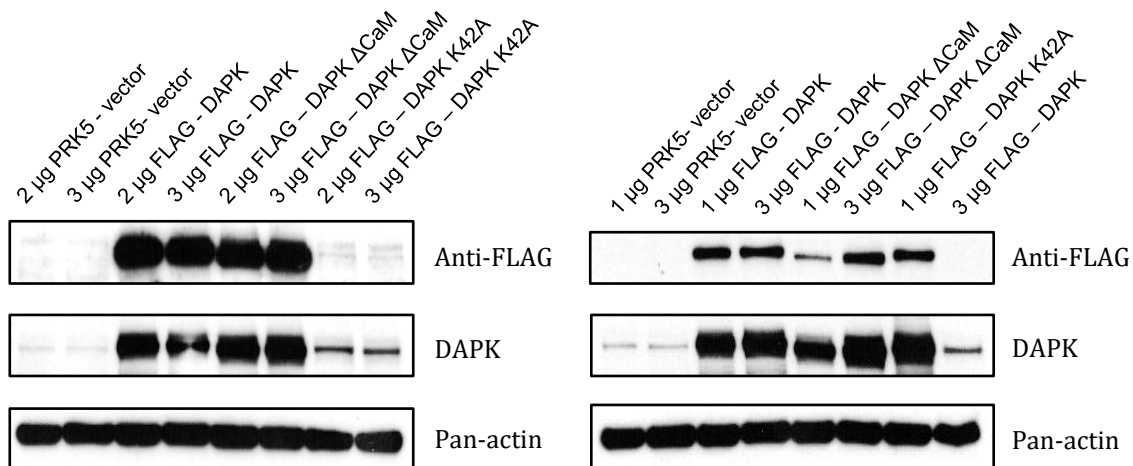


Abbildung 15: Kontrolle der Transfektion mit verschiedenen Mengen an Plasmiden

Es wurden Mengen von 1, 2 und 3 μ g Plasmid transfektiert und mittels Proteinisolierung und Western Blot ausgewertet. Da nur DAPK und dessen Mutationen Δ CaM und K42A FLAG besitzen, ist bei dem alleinigen Vektor keine Proteinbande bei einer Entwicklung mit Anti-FLAG zu sehen. Ebenfalls ist die etwas tiefer liegende Bande bei DAPK Δ CaM, vor allem ersichtlich bei 1 und 3 μ g, zu erwähnen. Der Erfolg der Transkription wird ebenfalls durch die Überexpression von DAPK verdeutlicht. Als Ladekontrolle wurde Pan-actin gewählt.

repräsentativer Westernblot, n=2

3.4.1. Proliferations-Assay

Bei den Proliferations-Assays, durchgeführt wie oben beschrieben, wurden die Zellen mit einer Menge von 50 ng und 150 ng Plasmid transfektiert. Dies entsprach laut Tabelle 1 einer niedrigen und hohen Konzentration. Es ist, vor allem bei einer Menge von 150ng, ersichtlich, dass sowohl eine Transfektion mit DAPK als auch eine mit deren dauerhaft aktiven Mutation DAPK Δ CaM eine Proliferation der hPASCs vermindern, es überwiegt vermutlich der pro-apoptotische Effekt. Dies gilt sowohl im Vergleich zum blanken Vektor als auch zur katalytisch nicht aktiven DAPK-Mutation K42A. Zudem lässt sich bei 50 ng ein Trend erkennen, dass die Transfektion mit DAPK Δ CaM eine

stärkere pro-apoptotische Auswirkung hat als die mit DAPK. Dieser Trend kann sich bei einer Transfektionsmenge von 150 ng allerdings nicht bestätigen.

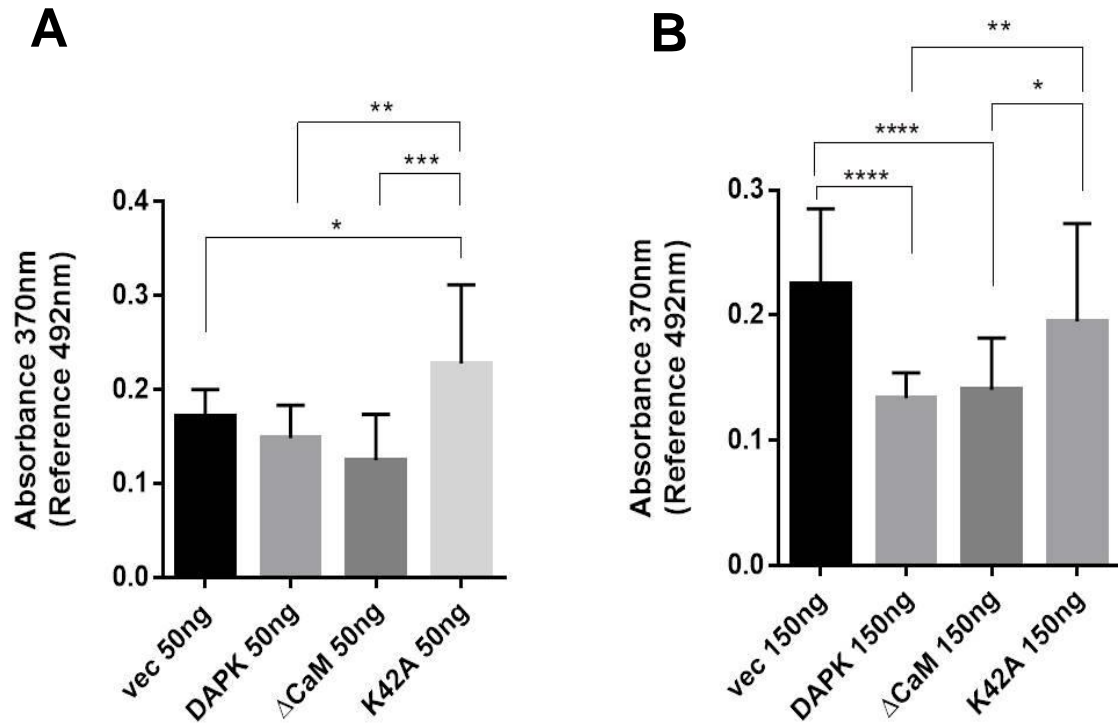


Abbildung 16: BrdU-Proliferations-Assay nach Plasmid-Transfektion

A Die Transfektion wurde mit je 50ng der Plasmide (Vektor, DAPK, DAPK Δ CaM und DAPK K42A) durchgeführt. $n=5$

B Die Transfektion wurde mit je 150ng der Plasmide (Vektor, DAPK, DAPK Δ CaM und DAPK K42A) durchgeführt. $n=6$

Die Auswertung erfolgte mit one way ANOVA * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

3.4.2. Proteinisolation, Einfluss von DAPK auf verschiedene Proteine

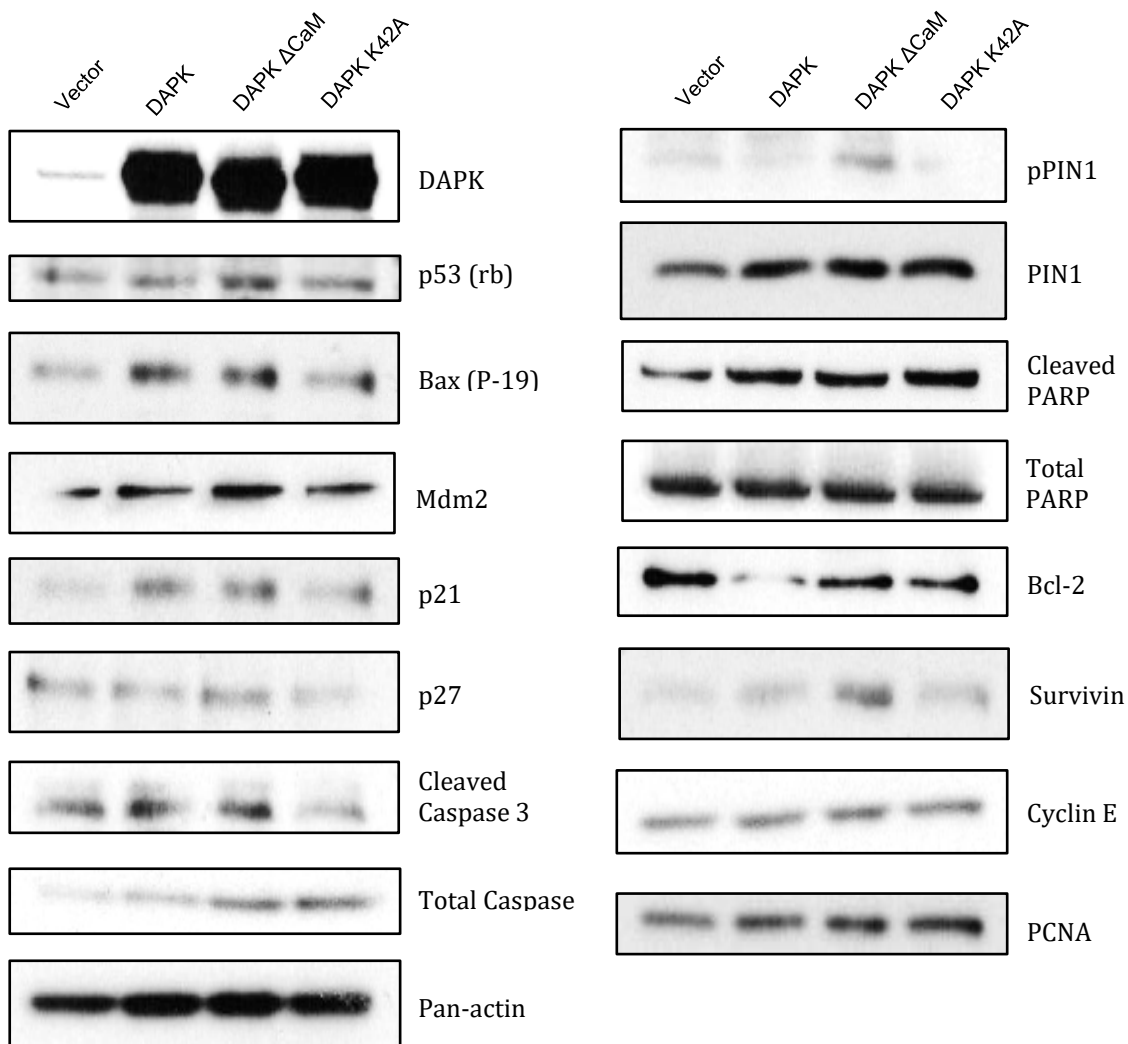


Abbildung 17: Einfluss von DAPK-Überexpression durch Plasmid-Transfektion auf hPASCs
 Nach der Transfektion und Proteinisolation wurden verschiedene pro- und anti-apoptische Proteine auf ihre Expression überprüft. Es wird deutlich, dass vor allem die pro-apoptischen Proteine bei einer DAPK-Überexpression ebenfalls vermehrt exprimiert werden. Als Ladekontrolle wurde Pan-actin verwendet. repräsentativer Westernblot, n=2

Bei den Western Blots der transfektierten hPASCs mit DAPK und deren Mutationen Δ CaM und K42A wird die pro-apoptische Funktion von DAPK deutlich. Es ist ersichtlich, dass die pro-apoptischen Proteine wie zum Beispiel p53, Bax, p21 und gespaltene Caspase 3 bei den beiden aktiven Konditionen, DAPK und DAPK Δ CaM, ebenfalls vermehrt exprimiert werden. Doch nicht nur bei den beiden katalytisch aktiven

DAPK-Überexpressionen kann man eine verstärkte Expression von pro-apoptischen Proteinen sehen, sondern auch bei DAPK K42A. Hier sind p53, Bax und p21 ebenfalls leicht erhöht. Grund dafür könnte eine Bindung über andere Abschnitte des DAPK-Moleküls, wie zum Beispiel der Death-Domäne, sein. Durch die erhöhte Konzentration von p53 wird physiologisch ebenfalls die Expression von Mdm2 verstärkt. Mdm2 ist ein Negativ-Kontrollprotein für p53 und führt durch Ubiquitinierung zu dessen Abbau [Dr. Frank Antwerpes und Julia Offe]. Bei p27 zeigt sich eine diskrete Erhöhung des Proteinlevels in der Kondition DAPK Δ CaM im Vergleich zu den anderen Konditionen. Es lässt sich allerdings nicht nur eine Veränderung bei den pro-apoptischen Proteinen erkennen, bei Bcl-2 als anti-apoptischem Marker ist eine deutliche Reduktion bei DAPK-Überexpression zu verzeichnen. Survivin, ein anti-apoptisches Protein, zeigt eine deutliche Erhöhung des Proteinlevels in der Kondition DAPK Δ CaM. Während es bei der Expression von PIN1 keinen deutlichen Unterschied in den verschiedenen Konditionen gibt, ist ein starker Anstieg des phosphorylierten PIN1 bei der Kondition DAPK Δ CaM zu sehen. Durch die Phosphorylierung an Ser71 wird die katalytische Aktivität von PIN1 inhibiert und die nukleare Lokalisation von PIN1 beeinflusst [Yijun Jin et al, 2006]. Auf diese Weise wird die Amplifikation der Zentrosome und die Zell-Transformation, induziert durch PIN1, beeinflusst [Yijun Jin et al, 2006]. Bei Cyclin E, PARP und gespaltenem PARP ist kein Unterschied in den verschiedenen Konditionen zu sehen.

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

Die durchgeführten Experimente basieren auf Versuchen mit humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (hPASMCs). Diese bilden eine gute Ergänzung zu eventuell nachfolgenden in-vivo-Experimenten. Zellkulturen haben den großen Vorteil, dass eine geringe Anzahl an Zellen aus einer definierten Zelllinie beobachtet werden können, es gibt keine Störungen durch Zell-Zell-Interaktionen zwischen zwei verschiedenen Zelltypen, wie sie in einem normalen Gewebe vorkommen [Sabine Schmitz, 2020]. Durch die Einfachheit können verschiedene Hypothesen von Wirkprinzipien leichter aufgestellt werden. Der Umgang mit den Zellen ist meist wesentlich einfacher als bei In-vivo-Experimenten. So können Zellkulturen leicht bestimmten Rahmenbedingungen, wie zum Beispiel Unterschieden im Nährstoffgehalt, in der Temperatur [Maike Niet, 2016] oder im O₂-Gehalt ausgesetzt werden. Aber auch andere Manipulationen wie eine Stimulation, Inhibition oder Transfektion lassen sich bei In-vitro-Versuchen vereinfacht durchführen. Die Zellkulturmodelle haben allerdings nicht nur Vorteile, so kann es leicht zu Kontaminationen der Zelllinie kommen, da der meist hohe Nährstoffgehalt der Zellmedien nicht nur einen Nährboden für die isolierten Zellen bietet, sondern auch für verschiedene Mikroorganismen [Sabine Schmitz, 2020]. Es ist somit höchste Priorität, auf einen sterilen Umgang mit den Zellen zu achten [Sabine Schmitz, 2020]. Erst durch die Entdeckung des Penicillins 1928 konnte die In-vitro-Kultivierung in den verschiedenen Laboren etabliert werden; auch heute werden häufig unterstützend verschiedene Antibiotika dem Nährmedium beigefügt um die Kontaminationsgefahr zu minimieren [Sabine Schmitz, 2020]. Auch kann das Fehlen der oben erwähnten Zell-Zell-Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen von Nachteil sein. So kann zum Beispiel niemand voraussagen, ob sich die beobachteten Ergebnisse auch auf einen Zellverband projizieren lassen, da die Bedingungen nicht der In-vivo-Situation entsprechen [Maike Niet, 2016].

Es kann zusammengefasst werden, dass die Arbeit mit Zellkulturen eine gute Möglichkeit für erste Hypothesen und deren Überprüfung bietet. Durch die reduzierten Einwirkungen auf die Zellen im Gegensatz zu denen im lebenden Organismus können einzelne Vorgänge leichter genauer betrachtet werden. Allerdings ist die Zellkultur begrenzt in ihren Möglichkeiten, ein Geschehen in einem Gewebe widerzuspiegeln, somit

folgen den mit Zellkulturen gewonnenen Grundkenntnissen meist In-vivo-Experimente, um diese Erkenntnisse zu überprüfen und zu erweitern.

Im Rahmen der Zellkultur-Experimente soll die Methode der Transfektion mit Plasmiden via Viromer yellow näher betrachtet werden. Diese Form der Plasmid-Transfektion ermöglicht es, große Proteine wie DAPK (160 kDa) vollkommen ohne aktiven viralen Träger in hPASCs zu integrieren. Es ergeben sich dadurch große Vorteile, zum einen ist die Sicherheitsstufe herabgesetzt, da nicht mit funktionsfähigen Viren gearbeitet wird, das Verfahren kann also auch in Standardlaboren der Stufe I durchgeführt werden. Zum anderen ist die Durchführung der Transfektion erheblich vereinfacht. Wahrscheinlich muss aber davon ausgegangen werden, dass die Erfolgsquote der Plasmid-Transfektion, auf die Gesamtheit der Zellen bezogen, gemindert ist.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Für diese Arbeit wurden verschiedene Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse nun nacheinander diskutiert werden sollen. Den Anfang bilden die NOX/HOX-Experimente. Die Hypoxie-Kondition versetzt die Zellen unter oxidativen Stress und induziert deren Tod [Pratibha Singh et al, 2016; Vered Levin-Salomon et al, 2014]. Es ist also zu erwarten, dass pro-apoptische Proteine unter dieser Konstellation vermehrt exprimiert werden. Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass das DAPK-Proteinlevel in der Hypoxie-Kondition im Vergleich zur Normoxie deutlich verstärkt sei. Bereits 2012 konnte in verschiedenen Gerhirnarealen, die unter Hypoxie versetzt wurden eine signifikante Steigerung von DAPK mRNA gezeigt werden [Nicolas Martin et al, 2012]. In den vorliegenden Versuchen wird sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie ein stetiger Anstieg des DAPK-Proteinlevels beobachtet, das im Vergleich aber auf ähnlichem Niveau liegt. Die Versuche wurden jeweils mit DMEM und SMBM als Medium durchgeführt. Hier zeigt sich jedoch kein wesentlicher Unterschied. Es stellt sich nun die Frage, ob andere Kompensationsmechanismen zum Tragen kommen, oder ob nicht die Hungersituation selbst eine Induktion von DAPK herbeiführt. Das knappe Nährstoffangebot könnte die Zelle ebenfalls in eine pro-apoptische Situation bringen. Um dieses Phänomen näher zu beleuchten, sollten in Zukunft weitere Versuche mit unterschiedlichen Nährmedien durchgeführt werden.

Als nächstes soll die Stimulation der hPASCs mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren näher betrachtet werden. Die Überlegung war, dass die Expression des proapoptischen Enzyms DAPK unter Stimulation der Zellen mit Wachstumsfaktoren aufgrund physiologischer Wirkungsweisen reduziert sein müsse, um die Zellen proliferieren zu lassen. Zunächst wurde also das Proteinlevel von DAPK unter Wachstumsstimulation (PDGF- β , TNF- α , IL-6, SMGM) genauer betrachtet. Hier sieht man, wie erwartet, ein deutlich niedrigeres Level von DAPK in den Konditionen PDGF- β , TNF- α und IL-6 im Vergleich zum Basalmedium. Über den zeitlichen Verlauf von 72 Stunden sinkt das Proteinlevel der mit den drei Wachstumsfaktoren stimulierten Gruppen erwartungsgemäß weiter ab. Auch die Kondition SMGM zeigt ein Absinken des Proteinlevels von DAPK, allerdings zu einem deutlich späteren Zeitpunkt.

Um den Zusammenhang zwischen DAPK und der Stimulation mit Wachstumsfaktoren weiter zu beleuchten, wurde in den darauf folgenden Versuchen DAPK mittels siRNA unterdrückt. Man erwartete, dass die Proliferation der hPASCs bei siDAPK durch die Hemmung von DAPK stärker ausgeprägt sein sollte. Zur Auswertung der Proliferation wurde ein BrdU-Proliferations-Assay verwendet. Betrachtet man die Ergebnisse, so kann obige Annahme jedoch nicht bestätigt werden. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation der hPASCs bei siNC- bzw. siDAPK-Bedingung in den verschiedenen Stimulationen. Dies könnte mehrere Gründe haben. Eine naheliegende Fehlerquelle wäre eine misslungene Transfektion, diese Möglichkeit wurde allerdings minimiert, indem parallel zu den Proliferations-Versuchen weitere Zellen transfektiert wurden und anschließend eine Proteinisolation erfolgte. Hier kann ein deutlicher Unterschied im Proteinlevel von DAPK in den beiden Konditionen siNC und siDAPK gesehen werden. Ein weiterer Grund für das Ausbleiben der eigentlich erwarteten höheren Proliferationsrate bei siDAPK könnte sein, dass die Unterdrückung von DAPK mittels siRNA nicht schwer ins Gewicht fällt, da, wie oben beschrieben, grundsätzlich unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren eine Reduktion des DAPK-Proteinlevels vorzuliegen scheint. Ebenso könnten aber auch noch bisher unbekannte Kompensationsmechanismen zum tragen kommen.

Neben siRNA wurde als weitere Möglichkeit für einen DAPK-Knockdown der niedermolekularen Inhibitor TC-DAPK6 eingesetzt. Für diesen gilt $IC_{50} = 69$ nM, ab einer Konzentration von 225 nM ist er nicht nur gegen DAPK1 gerichtet, sondern auch gegen DAPK3 [Masako Okamoto et al, 2009]. Auch dieser Versuch wurde im Hinblick auf den

Einfluss einer DAPK-Hemmung auf die Proliferation der hPASCs durchgeführt. Die Erwartung ging dorthin, dass die Inhibition von DAPK via Inhibitor das Zellwachstum verstärkt, vor allem sollte dies bei Inhibitor-Konzentrationen größer 69 nM der Fall sein. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der Experimente, so ist sowohl bei Kultivierung mit SMBM als auch mit SMGM keine Signifikanz in der Zellproliferation zu verzeichnen. Allerdings ist es nicht verwunderlich, dass in der Kondition mit SMBM kein verstärktes Wachstum vorzufinden ist, da das Medium an sich die Zellen nicht zum Wachstum anregen soll. SMBM gilt als Basalmedium und erhält die Zellen lediglich am Leben. Mit dem Medium SMGM, einem Wachstumsmedium, verhält es sich hingegen anders, hier sollten die Zellen zum Wachstum angeregt sein. Aber auch hier findet sich keine signifikante Veränderung der Zellproliferation.

Eine wichtige Versuchsreihe bilden die Experimente mit Plasmid-Transfektionen. Auch diese Transfektionen wurden mit dem Ziel durchgeführt, nähere Kenntnisse über die Auswirkung von DAPK auf die Proliferation zu gewinnen. Hierzu wurden neben DAPK zwei verschiedene Mutationen von DAPK, DAPK Δ CaM und DAPK K42A, verwendet. Die aufgeführten Mutationen von DAPK wurden bereits 2001 in einer Studie zur Apoptose in embryonalen Fibroblasten von Ratten näher beleuchtet [Tal Raveh et al., 2001]. Durch den Verlust der Autoregulator-Einheit CaM bei DAPK Δ CaM verliert DAPK einen Aktivitäts-Kontrollpunkt [Shani Bialik and Adi Kimchi, 2014]. DAPK Δ CaM spiegelt daher die dauerhaft aktive Mutation von DAPK wider. Im Gegensatz dazu hat bei DAPK K42A der Austausch von Lysin zu Alanin an Stelle 42, inmitten der katalytischen Domäne, die Folge, dass die katalytische Funktion von DAPK gestört wird [Byong Mo Kim et al, 2016]. Als Referenz in dieser Versuchsreihe dient der reine Vektor. Die Erwartungen an die Proliferations-Versuche können wie folgt beschrieben werden: Eine DAPK-Überexpression mit der Kinase in Reinform sollte, ebenso wie die in ihrer Funktion noch gesteigerte Mutation DAPK Δ CaM eine deutliche Reduktion der Proliferation zur Folge haben. Man kann annehmen, dass ebenfalls der Unterschied zwischen den beiden Konditionen DAPK und DAPK Δ CaM deutlich sein müsste. Im Gegensatz dazu sollte die Proliferation unter der Bedingung der katalytisch-inaktiven Mutation DAPK K42A im Vergleich zu der der Transfektion mit dem alleinigen Vektor, der keine Veränderung der physiologischen DAPK-Expression bewirkt, erhöht sein. Die vorliegenden BrdU-Proliferations-Assays können die Vermutungen weitestgehend bestätigen. Vor allem bei einer Plasmid-Konzentration von 50 ng kann man eine, zwar nicht signifikante, aber dennoch vorhandene stufenweise Abnahme der Proliferation

unter Vektor-, DAPK- und DAPK Δ CaM-Bedingung sehen. Vergleicht man die drei Konditionen mit DAPK K42A, bei der die Proliferation leicht gesteigert ist, so kann man jeweils einen signifikanten Unterschied erkennen. Besonders deutlich wird dieser, wenn man die Extreme DAPK Δ CaM und DAPK K42A miteinander vergleicht. Die Erhöhung der Plasmid-Konzentration auf 150 ng kann den Unterschied nicht weiter verdeutlichen. Hier zeigt sich zwar ein signifikanter Unterschied der Proliferation zwischen den Bedingungen Vektor und DAPK oder Vektor und DAPK Δ CaM, allerdings ist die Abstufung dieser beiden DAPK-Überexpressionen nicht mehr erkennbar. Auch im Vergleich von Vektor und DAPK K42A ist keine klare Tendenz ersichtlich. Die Gründe hierfür sind nicht geklärt. Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei den Transfektions-Versuchen sowohl bei 50 ng als auch bei 150 ng die erwartete Reduktion der Proliferation in den Konditionen DAPK und DAPK Δ CaM beobachtet werden kann.

Die Transfektion der hPASCs mit den verschiedenen Plasmiden bildet allerdings nicht nur die Grundlage für Versuche zur Proliferation dieser Zellen, sondern auch für Expressions-Versuche verschiedener möglicher DAPK nachstehender Proteine. Die Expression wurde mittels Western Blot überprüft. Da DAPK zu den pro-apoptotischen Kinasen gehört [Pratibha Singh et al, 2016; Yao Lin et al, 2010], ist zu erwarten, dass bei einer Überexpression von DAPK verschiedene nachfolgende pro-apoptotische Proteine vermehrt und anti-apoptotische Proteine vermindert exprimiert werden. Bereits 2001 zeigten Tal Raveh und sein Team in embryonalen Fibroblasten von Ratten eine deutlich gesteigerte Apoptose bei DAPK Δ CaM im Vergleich zum Wildtyp und vor allem im Vergleich zu DAPK K42A [Tal Raveh et al., 2001]. Im Großen und Ganzen kann die pro-apoptotische Funktion von DAPK in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden. So sind zum Beispiel p53, p21, Bax und gespaltene Caspase 3 als gängige pro-apoptotische Proteine in den beiden Konditionen DAPK und DAPK Δ CaM deutlich erhöht. Vor allem p53 zeigt dabei eine Expressionssteigerung von Vektor- zu DAPK-Bedingung und von DAPK- zu DAPK Δ CaM-Bedingung. Dass das Maximum der Expression bei der dauerhaft aktiven Variante von DAPK, bei DAPK Δ CaM, zu finden ist, entspricht den Erwartungen. Es fällt jedoch wider Erwarten auch auf, dass die genannten Proteine ebenfalls bei der katalytisch inaktiven Form von DAPK, DAPK K42A, in ihrer Konzentration eine leichte Erhöhung aufzeigen. Der Grund hierfür könnte eine Wechselwirkung mit der Death-Domäne sein, der selbst pro-apoptotische Funktionen zugeschrieben werden [Pratibha Singh et al, 2016]. Diese Interaktionen sind jedoch noch nicht genau geklärt und es bedarf weiterer Forschungen. Um eine eventuelle Interakti-

on aufzudecken, könnte man die Versuche mit DAPK Δ DD als weiterer Variante von DAPK fortführen. Durch die bereits erwähnte erhöhte Konzentration von p53 wird physiologischer Weise ebenfalls die Expression von Mdm2, als negatives Kontrollprotein, verstärkt [Tal Raveh et al, 2001]. Je nach Proteinlevel kann p27 sowohl Apoptose als auch Proliferation beeinflussen [Maryam Abbastabar et al, 2018]. Die Studienlage über p27 zeigt jedoch unterschiedliche Ergebnisse. Zum einen wird eine gesteigerte Apoptose bei einem niedrigen und eine gesteigerte Proliferation bei einem erhöhten Level von p27 beschrieben [Maryam Abbastabar et al, 2018]. Zum anderen zeigten Fujieda und sein Team eine gesteigerte Apoptose in p27 positiven oralen und oropharyngealen Karzinomzellen. Ebenso zeigte sich hier eine erhöhte Bax Expression [Shigeharu Fujieda et al, 1999]. In den vorliegenden Versuchen zeigt sich eine diskrete Erhöhung des Proteinlevels von p27 in der Kondition DAPK Δ CaM im Vergleich zu den anderen Konditionen. Dieses könnte zu den Vermutungen von Fujieda passen, dass p27 eine Verbindung zur p53/Bax Kaskade hat. Gemäß den vorangestellten Überlegungen sollte in den Zellen allerdings nicht nur eine Veränderung in der Konzentration der pro-apoptotischen Proteine zu finden sein, sondern auch bei den anti-apoptotischen Proteinen. Schaut man sich Bcl-2 als Marker an, so kann man eine deutliche Reduktion dieses Proteins bei einer DAPK-Überexpression erkennen. Weiter wurde auch das Proteinlevel von Survivin untersucht. Survivin gilt als anti-apoptotisches Protein, dass in verschiedenen Tumoren vermehrt exprimiert wird [Alain C. Mita et al, 2008]. Dabei zeigt sich eine negative Korrelation zu p53 [Asra Mirza et al, 2002]. Man würde daher eine Reduktion von Survivin bei einer DAPK Überexpression und einem nachfolgendem Anstieg von p53 erwarten. In den vorliegenden Versuchen zeigt sich allerdings eine Erhöhung des Proteinlevels von Survivin in der Kondition DAPK Δ CaM. Die beiden weiteren DAPK-Konditionen zeigen im Vergleich zum Vektor keinen Unterschied. Der Zusammenhang zwischen DAPK und Survivin muss in Zukunft noch genauer beleuchtet werden. Während es bei der Expression von PIN1 keinen deutlichen Unterschied in den verschiedenen Konditionen gibt, ist ein starker Anstieg des phosphorylierten PIN1 unter DAPK Δ CaM-Bedingung zu sehen. Durch die Phosphorylierung an Ser71 durch DAPK wird die katalytische Aktivität von PIN1 inhibiert und die nukleare Lokalisation von PIN1 beeinflusst [Yijun Jin et al, 2006].

4.3. Ausblick

Die durchgeführten Versuche geben einen kleinen Einblick in die pro-apoptotische Funktion von DAPK, sowohl aufgezeigt durch verminderte Expression von DAPK in einer Wachstumssituation oder durch eine verminderte Proliferation bei DAPK-Überexpression als auch durch die veränderte Expression nachstehender Proteine unter dem Einfluss von DAPK. Allerdings wurden hier nur Versuche hinsichtlich der Messung der Proliferation und der Konzentration bestimmter Proteine durchgeführt, während die Apoptose nur indirekt beobachtet wurde. Um diese genauer zu verifizieren, sollten daher weitere Versuchsreihen mit Apoptose-Assays durchgeführt werden. Auch hierbei kann die Verwendung der Plasmide und eine dementsprechende Überexpression von DAPK nützlich sein.

Sowohl die hier vorliegende Arbeit als auch viele andere wissenschaftliche Studien zeigen mittels vielfältiger Manipulationen von DAPK den großen Einfluss dieses Enzyms auf die Zell-Proliferation beziehungsweise auf die Zell-Apoptose auf. So fand man unter anderem heraus, dass in verschiedenen Tumoren wie auch bei Pulmonal-Arterieller Hypertonie eine Unterexpression von DAPK vorliegt, welche das unkontrollierte Zellwachstum begünstigen könnte. Daraus resultiert die Hoffnung, dass bei solchen Patienten eine wieder normalisierte DAPK-Expression demnach den Krankheitsverlauf verlangsamen oder gar stoppen könnte. Obgleich noch viele Forschungen nötig sein werden, verwundert es daher nicht, dass DAPK jetzt schon als möglicher Angriffspunkt von neuen Therapieoptionen gesehen wird.

Zusammenfassung

Die todesassoziierte Proteinkinase 1 (DAPK, DAPK1) ist eine durch Kalzium regulierte Serin/Threonin-Kinase mit mehreren Domänen, die nachweislich eine Schlüsselrolle für Zellapoptose und Zellautophagie spielt. Es wurde berichtet, dass der Tumorsuppressor DAPK bei vielen Krebsarten spezifisch herunterreguliert wird. DAPK ist an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt, die hauptsächlich zu ihren tumorunterdrückenden Funktionen führen. Die Rolle von DAPK bei der Regulierung der vaskulären Zellproliferation wurde nie untersucht.

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Expression und den Einfluss von DAPK auf die proliferative und apoptotische Reaktion in menschlichen glatten Muskelzellen der Lungenarterien (PASMCs) zu untersuchen. Es wurde eine deutliche Verringerung des DAPK-Proteins in PAH-humanen PASMCs im Vergleich zu Spenderzellen ohne PAH festgestellt. Interessanterweise war das DAPK-Protein in hypoxischen hPASMCs akkumuliert. Im Gegensatz dazu nahm die DAPK-Proteinexpression in Zellen, die mit verschiedenen proliferativen und proinflammatorischen Wachstumsfaktoren (PDGF-BB, TNF α , IL6) stimuliert wurden, deutlich und zeitabhängig ab. Des Weiteren wurde die Verstärkung (Plasmid-Überexpression) und der Verlust (siRNA-Transfektion) des DAPK-Gens untersucht. Die Deletion von DAPK (siDAPK) und die anschließende Stimulierung durch Wachstumsfaktoren veränderte das Proliferationspotenzial humaner PASMCs im Vergleich zu den transfektierten Kontrollzellen (siNC) nicht. Experimente mit dem niedermolekularen Inhibitor TC-DAPK6 sowohl unter basalen als auch unter wachstumsstimulierenden Bedingungen untermauerten die Annahme, dass die Blockade von DAPK die proliferative Reaktion humaner PASMCs nicht weiter verringert. Die Überexpression von DAPK mit den Konstrukten, die für Wildtyp-DAPK und konstitutiv-aktives DAPK/ Δ CaM kodieren, führte zu einer deutlichen und signifikanten Verringerung der Proliferation humaner PASMCs, wie durch BrdU-Proliferationsassays und das Expressionsprofil von Zellzyklusinhibitoren (p27, p21) belegt wurde. Ebenso verstärkte die exogene Überexpression von DAPK die Expression von pro-apoptotischem p53 und Bax und verringerte die Expression von anti-apoptotischen Bcl2-Proteinen.

Insgesamt deuten unsere Daten darauf hin, dass die gezielte Beeinflussung von DAPK im Zusammenhang mit PAH und insbesondere die Wiederherstellung der DAPK-Expression und -Aktivität in PAH-PASMCs ein vielversprechender Ansatz für künftige therapeutische Interventionen sein könnte.

Summary

Death associated protein kinase 1 (DAPK, DAPK1) is a multi-domain serine/threonine kinase regulated by calcium, which has been established to play a key role for cell apoptosis and cell autophagy. Tumor suppressor DAPK1 was reported to be specifically downregulated in many types of cancer. DAPK contributes to a wide variety of cellular events, which mainly converge to its tumor-suppressing functions. The role of DAPK in the regulation of vascular cell proliferation was never examined.

The aim of the present study was to elucidate the expression and the impact of DAPK on proliferative and apoptotic response in human pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). A clear reduction of DAPK protein in PAH-human PASMCs in comparison to donor non-PAH control cells was detected. Interestingly, DAPK protein was accumulated in hypoxic hPASMCs. In contrast, DAPK protein expression was markedly and time-dependently declined in cells stimulated with various pro-proliferative and pro-inflammatory growth factors (PDGF-BB, TNF α , IL6). The gain (plasmid overexpression) and loss (siRNA transfection) approaches of DAPK1 gene were further employed. Depletion of DAPK (siDAPK) followed by growth factor stimulations did not modulate the proliferation potential of human PASMCs, in comparison to control (siNC) transfected cells. Experiments using small molecule inhibitor TC-DAPK6 both under basal and growth-stimulatory conditions supported the notion that the blockage of DAPK does not further diminish the proliferative response of human PASMCs. DAPK overexpression with the constructs encoding for wild-type DAPK and constitutive-active DAPK/ Δ CaM resulted in a clear and significant human PASMC proliferation, as indicated by BrdU proliferation assays and the expression profile of cell cycle inhibitors (p27, p21). Similarly, DAPK exogenous overexpression enhanced the expression of pro-apoptotic p53 and Bax and diminished the expression of anti-apoptotic Bcl2 proteins.

Taken together, our data indicate that targeting of DAPK in the context of PAH and more specifically the restoration of DAPK expression and activity in PAH-PASMCs may serve as one the promising approaches for future therapeutical interventions.

Abkürzungsverzeichnis

-	Minus
%	Prozent
+	Plus
<	Kleiner
>	Größer
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µg/µl	Mikrogramm pro Mikroliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
AK	Antikörper
AUT	Österreich
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CH	Schweiz
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COR	C-terminal of ROC domain
CTEPH	Chronisch-Thrombembolische Pulmonale Hypertonie
DAPK/ DAPK 1	Death associated Protein Kinase 1
DD	Death Domäne
DE	Deutschland
DIP1	DAPK interacting protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dyn	Dynorphine
E. coli	Escherichia coli
ECCPS	Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System
ECL	enhanced chemiluminescence
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
FBS	Fetales Bovines Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
h	Stunde
hEGF	Human Epidermal Growth Factor
hFGF	Human Basic Fibroblast Growth Factor
HIF-1α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1-alpha
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HOX	Hypoxie
hPASC	Human pulmonary arterial smooth muscle cells
IFN	Interferon
IL-6	Interleukin 6
ILD	Interstitielle Lungenerkrankung
IPAH	Idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLF4	Krüppel-like factor 4
KLHL 20	Kelch-like ECT2 interacting protein
l	Liter
m	Meter
Mdm2	Maus-Doppel-Minute-2-Homolog
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
Mib1	mindbomb E3 ubiquitin protein ligase
ml	Milliliter
MLC	Myosin-Leichte-Kette
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger RNA
Ms	Mouse, Maus
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NOX	Normoxie
ns	Nicht signifikant
O ₂	Sauerstoff
OPTI-MEM	Optimiertes-Minimal Essential Medium
PAH	Pulmonal Arterielle Hypertonie
PAPm	Mittlerer pulmonal-arterieller Druck
PARP	Poly(ADP-ribose)-Polymerase
PAWP	Pulmonal arterieller Verschlussdruck
PDGF- β	Platelet Derived Growth Factor β
pDNA/ pDNS	Plasmid Desoxyribonucleinsäure
PKM 1 + PKM 2	Pyruvatkinase-Isoenzyme M1 / M2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prim.	Primär
PVOD	Pulmonale veno-okklusive Erkrankung
PVR	Pulmonal-vaskulärer Widerstand
Rb	Rabbit, Hase
RIPA	RadiolmmunoPrecipitation Assay
RNA/ RNS	ribonucleic acid/ Ribonucleinsäure
ROC	Ras of complex proteins domain
rpm	revolutions per minute
RSK	p90 ribosomal S6 kinase
s	Sekunde
Sek.	Sekundär
Ser	Serin
siDAPK	Small interfering RNA DAPK
siNC	Small interfering RNA Negativ Kontrolle
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SMBM	Smooth Muscle Cell Growth Basal Medium
SMGM	Smooth Muscle Cell Growth Medium
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tris-buffered saline with Tween20

TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TSC 2	tuberous sclerosis 2 protein
Tyr	Tyrosin
USA	United States of America
V	Volt
VEGF	Vascular Epidermal Growth Factor
WB	Western Blot
x g	Mal Erdbeschleunigung
Δ	Delta

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur der fünf Mitglieder der DAPK-Familie	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der DAPK-Proteinstruktur	10
Abbildung 3: Aktivierung von DAPK.....	12
Abbildung 4: Regulations-Mechanismen von DAPK1	14
Abbildung 5: Das DAPK-Interaktom.....	17
Abbildung 6: DAPK und Krankheit.....	18
Abbildung 7: Einteilung der Pulmonalen Hypertonie	21
Abbildung 8: Ähnlichkeiten von PAH und Krebs	26
Abbildung 9: DAPK-Expression bei IPAH	27
Abbildung 10: hPASCs d143, NOX/HOX-Konditionen	52
Abbildung 11: Stimulation von hPASCs mit Wachstumsfaktoren	54
Abbildung 12: BrdU-Proliferations-Assay mit siDAPK-/ siNC-Transfektion von hPASCs.....	55
Abbildung 13: Erfolgskontrolle Transfektion mit siDAPK/ siNC	55
Abbildung 14: DAPK-Inhibitor.....	56
Abbildung 15: Kontrolle der Transfektion mit verschiedenen Mengen an Plasmiden ..	57
Abbildung 16: BrdU-Proliferations-Assay nach Plasmid-Transfektion.....	58
Abbildung 17: Einfluss von DAPK-Überexpression durch Plasmid-Transfektion auf hPASCs.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mengenverhältnisse für Plasmid-Transfektionen mit Viromer yellow.	46
Tabelle 2: Konzentrationsreihe für Proteinmessung	48
Tabelle 3: Verwendete Primär-AK, ihr Mischverhältnis, ihre Zielgröße und ihr Sekundär-AK.....	50

Literaturverzeichnis

2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal* (2016) 37, 67–119. DOI:10.1093/eurheartj/ehv317.

A Eisenberg-Lerner and A Kimchi. DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress. *Cell death and differentiation* 2007 Nov;14(11):1908-15. Epub 2007 Aug 17.

Ahmed Karam Farag and Eun Joo Roh. Death-associated protein kinase (DAPK) family modulators: Current and future therapeutic outcomes. *Med Res Rev* 2019 Jan;39(1):349-385. DOI: 10.1002/med.21518.

Alain C Mita, Monica M Mita, Steffan T Nawrocki, Francis J Giles. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5000-5. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0746.

Amboss. Pulmonale Hypertonie und Cor pulmonale, unter <https://next.amboss.com/de/article/w50hmg?q=Pulmonale%20Hypertonie%20und%20Cor%20pulmonale#Z875c5372966567b569d3b7b1070c4c9e> (aufgerufen am 16.02.2021)

Asra Mirza, Marnie McGuirk, Tish N Hockenberry, QunWu, Hena Ashar, Stuart Black, Shu Fen Wen, Luquan Wang, Paul Kirschmeier, W Robert Bishop, Loretta L Nielsen, Cecil B Pickett and Suxing Liu. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene* 2002 Apr 18;21(17):2613-22. DOI: 10.1038/sj.onc.1205353.

Beth Levine, Sangita C. Sinha and Guido Kroemer. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy* 2008 Jul 1;4(5):600-606. DOI: 10.4161/auto.6260.

Boaz Inbal, Gidi Shani, Ofer Cohen, Joseph L. Kissil and Adi Kimchi. Death-associated protein kinase-related protein 1, a novel serine/threonine kinase involved in apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 2000 Feb;20(3):1044-54.

Boaz Inbal, Ofer Cohen, Sylvie Polak-Charcon, Juri Kopolovic, Ezra Vadai, Lea Eisenbach and Adi Kimchi. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature* 1997 Nov 13;390(6656):180-4. DOI: 10.1038/36599

Byong Mo Kim, Mi-Hyeon You, Chun-Hau Chen, Jaehong Suh, Rudolph E. Tanzi and Tae Ho Lee. Inhibition of death-associated protein kinase 1 attenuates the phosphorylation and

- amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. *Human molecular genetics* 2016 Jun 15;25(12):2498-2513. DOI: 10.1093/hmg/ddw114
- Carlyne D. Cool, Wolfgang M. Kuebler, Harm Jan Bogaard, Edda Spiekerkoetter, Mark R. Nicolls MD and Norbert F. Voelkel. The Hallmarks of Severe Pulmonary Arterial Hypertension The Cancer Hypothesis - Ten years later. *American Journal of physiology. Lung cellular and physiological physiologie* 2020 Feb 5. DOI: 10.1152/ajplung.00476.2019.
- Chang-Lin Zhai, Guan-Min Tang, Gang Qian, Hui-Lin Hu, Shi-Jun Wang, Dong Yin et al. MicroRNA-98 Attenuates Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury Through Inhibiting DAPK1 Expression. *IUBMB life* 2019 Feb;71(2):166-176. DOI: 10.1002/iub.1879.
- Chinchu Jayaprakasha, Vinay Koshy Varghesea, Ravishankara Bellampallia, Raghu Radhakrishnanb, Satadru Rayc, Shama Prasada Kabekkodu et al. Hypermethylation of Death-Associated Protein Kinase (DAPK1) and its association with oral carcinogenesis - An experimental and meta-analysis study. *Archives of oral biology* 2017 Aug;80:117-129. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.03.024.
- Chun-Hau Chen, Won-Jing Wang, Jean-Cheng Kuo, Hsiao-Chien Tsai, Jia-Ren Lin, Zee-Fen Chang and Ruey-Hwa Chen. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *The EMBO Journal* 2005 Jan 26;24(2):294-304. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600510
- D Gozuacik, S Bialik, T Raveh, G Mitou, G Shohat, H Sabanay, N Mizushima, T Yoshimori and A Kimchi. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. *Cell death and differentiation* 2008 Dec;15(12):1875-86. DOI: 10.1038/cdd.2008.121.
- David R. Mcllwain, Thorsten Berger and Tak W. Mak. Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013 Apr 1;5(4):a008656. DOI: 10.1101/cshperspect.a008656.
- DJ Simpson, RN Clayton and WE Farrell. Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene* 2002 Feb 14;21(8):1217-24. DOI: 10.1038/sj.onc.1205195.
- Dongqing Guo , Junzhong Gua, Hui Jiang, Asif Ahmed, Zhiren Zhang and Yuchun Gu. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Journal of cellular and molecular cardiology* 2016 Feb;91:179-87. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.01.009.

- Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011 Mar 4;144(5):646-74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000 Jan 7;100(1):57-70. DOI:10.1016/s0092-8674(00)81683-9.
- Dr. Frank Antwerpes und Julia Offe. Mdm2, unter <https://flexikon.doccheck.com/de/Mdm2>, (abgerufen am 08.02.2020)
- Frederic Delom and Delphine Fessart. Pulmonary Arterial Hypertension and Cancer: An Update on Their Similarities. *Annual Research & Review in Biology* 2014, 4(1): 20-37. DOI: 10.9734/ARRB/2014/5296.
- Futoshi Suizu, Akihide Ryo, Gerburg Wulf, Jormay Lim and Kun Ping Lu. Pin1 Regulates Centrosome Duplication, and Its Overexpression Induces Centrosome Amplification, Chromosome Instability and Oncogenesis. *Molecular and cellular biology* 2006 Feb;26(4):1463-79. DOI:10.1128/MCB.26.4.1463-1479.2006.
- Galit Shohat, Taly Spivak-Kroizman, Ofer Cohen, Shani Bialik, Gidi Shani, Hanna Berrisi, Miriam Eisenstein and Adi Kimchi. The Pro-apoptotic Function of Death-associated Protein Kinase is Controlled by a Unique Inhibitory Autophosphorylation-based Mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2001 Dec 14;276(50):47460-7. DOI: 10.1074/jbc.M105133200
- Hiroshi Matsubara and Aiko Ogawa. Treatment of idiopathic/hereditary pulmonary arterial hypertension. *Journal of cardiology* 2014 Oct;64(4):243-9. DOI: 10.1016/j.jcc. 2014.06.009.
- Hsin-Yi Chen, Yu-Min Lin, Hsiang-Ching Chung, Yaw-Dong Lang, Ching-Jung Lin, John Huang et al. miR-103/107 Promote Metastasis of Colorectal Cancer by Targeting the Metastasis Suppressors DAPK and KLF4. *Cancer research* 2012 Jul 15;72(14):3631-41. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0667.
- I Mor, R Carlessi, T Ast, E Feinstein and A Kimchi. Death-associated protein kinase increases glycolytic rate through binding and activation of pyruvate kinase. *Oncogene* 2012 Feb 9;31(6):683-93. DOI: 10.1038/onc.2011.264.
- Jolyane Meloche, Aude Pflieger, Mylène Vaillancourt, Roxane Paulin, François Potus, Sotirios Zervopoulos et al. Role for DNA Damage Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2014 Feb 18;129(7):786-97. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006167.

- Joseph L Kissil, Elena Feinstein, Ofer Cohen, Peter A Jones, Yvonne C Tsai, Margaret A Knowles et al. DAP-kinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. *Oncogene* 1997 Jul 24;15(4):403-7. DOI: 10.1038/sj.onc.1201172.
- Koen Temmerman, Bertrand Simon and Matthias Wilmanns. Structural and functional diversity in the activity and regulation of DAPK-related protein kinases. *The FEBS Journal* 2013 Nov;280(21):5533-50. DOI: 10.1111/febs.12384.
- L.P. Deiss, E. Feinstein, H. Berissi, O. Cohen and A. Kimchi. 1995. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the γ interferon-induced cell death. *Genes Dev.* 9, 15–30. DOI: 10.1101/gad.9.1.15
- Lei Pei, You Shang, Huijuan Jin, Shan Wang, Na Wei, Honglin Yan. DAPK1–p53 Interaction Converges Necrotic and Apoptotic Pathways of Ischemic Neuronal Death. *The Journal of Neuroscience* 2014 May 7;34(19):6546-56. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5119-13.2014.
- Liguo Zhang, Kenneth P. Nephew, and Patricia J. Gallagher. Regulation of death-associated protein kinase. Stabilization by HSP90 heterocomplexes. *The Journal of biological chemistry* 2007 Apr 20;282(16):11795-804. DOI: 10.1074/jbc.M610430200
- M. Sean McMurtry, Stephen L. Archer, Dario C. Altieri, Sebastien Bonnet, Alois Haromy, Gwyneth Harry et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *The Journal of clinical investigation* 2005 Jun;115(6):1479-91. DOI:10.1172/JCI23203
- Maike Niet (01.08.2016). Die Hirnforschung nutzt verschiedene wissenschaftliche Methoden. Hier stellen wir Ihnen zentrale Arbeitstechniken vor. Zum Beispiel die Zellkultur. Abgerufen am 07.04.2021 von <https://www.dasgehirn.info/grundlagen/methoden/zellkulturen>
- Marc Humbert, Nicholas W. Morrell, Stephen L. Archer, Kurt R. Stenmark, Margaret R. MacLean, Irene M. Lang et al. Cellular and Molecular Pathobiology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of American College of Cardiology* 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):13S-24S. DOI:10.1016/j.jacc.2004.02.029.
- Marilyne Lévy, Christelle Maurey, David S. Celermajer, MBBS, Pascal R. Vouhé, Claire Danel, Damien Bonnet et al. Congenital Heart Disease Impaired Apoptosis of Pulmonary Endothelial Cells is Associated with Intimal Proliferation and Irreversibility of Pulmonary Hypertension in Congenital Heart Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2007 Feb 20;49(7):803-10. DOI:10.1016/j.jacc.2006.09.049.

- Marius M. Hoeper, Doerte Huscher and David Pittrow. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *International Journal of Cardiology*, 2015 Nov 09, 203:612-613. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.11.001
- Marius M. Hoeper, Harm Jan Bogaard, Robin Condliffe, Robert Frantz, Dinesh Khanna, Marcin Kurzyna et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of American College of Cardiology* 2013 Dec 24;62(25 Suppl):D42-50. DOI: 10.1016/j.jacc.2013.10.032.
- Marius M. Hoeper, Hossein-Ardeschir Ghofrani, Ekkehard Grünig, Hans Klose, Horst Olschewski und Stephan Rosenkranz. Pulmonale Hypertonie. *Deutsches Ärzteblatt*. 2017 Feb 3;5: 73-84.
- Maryam Abbastabar, Maryam Kheyrollah, Khalil Azizian, Nazanin Bagherlou, Sadra Samavarchi Tehrani , Mahmood Maniati, Ansar Karimian. Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair (Amst)*. 2018 Sep;69:63-72. DOI: 10.1016/j.dnarep.2018.07.008.
- Masako Okamoto, Kiyoshi Takayama, Tomoko Shimizu, Kazuhiro Ishida, Osamu Takahashi, and Toshio Furuya. Identification of Death-Associated Protein Kinases Inhibitors Using Structure-Based Virtual Screening. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009 August 11 Vol. 52, No. 22. DOI: 10.1021/jm901191q
- Mehrdad Shamloo, Liza Soriano, Tadeusz Wieloch, Karoly Nikolich, Roman Urfer, and Donna Oksenberg. Death-associated Protein Kinase Is Activated by Dephosphorylation in Response to Cerebral Ischemia. *The Journal of Biological Chemistry* 2005 Dec 23;280(51):42290-9. DOI 10.1074/jbc.M505804200
- Michael Zimmermann, Cédric Atmanene, Qingyan Xu, Laetitia Fouillen, Alain Van Dorsselaer, Dominique Bonnet, et al. Homodimerization of the Death-Associated Protein Kinase Catalytic Domain: Development of a New Small Molecule Fluorescent Reporter. *PLoS One* 2010 Nov 30;5(11):e14120. DOI: 10.1371/journal.pone.0014120
- MM Hoeper, M Humbert, R Souza, M Idrees, SM Kawut, K Sliwa-Hahnle et al. A global view of pulmonary hypertension. *The Lancet. Respiratory medicine* 2016 Apr;4(4):306-22. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00543-3.
- Mohamed Elbadawy, Tatsuya Usui, Hideyuki Yamawaki and Kazuaki Sasaki. Novel Functions of Death-Associated Protein Kinases through Mitogen-Activated Protein Kinase-Related

- Signals. International Journal of Molecular Science 2018 Oct 4;19(10). pii: E3031. DOI: 10.3390/ijms19103031.
- Mohamed Izikki, Christophe Guignabert, Elie Fadel, Marc Humbert, Ly Tu, Patricia Zadigue et al. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of clinical investigation* 2009 Mar;119(3):512-23. DOI: 10.1172/JCI35070.
- Monica L. Friedrich, Ben G. Wen, Gretchen Bain, Barbara L. Kee, Carol Katayama, Cornelis Murre, et al. DRAK2, a lymphoid-enriched DAP kinase, regulates the TCR activation threshold during thymocyte selection. *International Immunology* 2005 Nov;17(11):1379-90. DOI:10.1093/intimm/dxh315
- Nabham Rai, Swathi Veeroju , Yves Schymura, Wiebke Janssen, Astrid Wietelmann , Baktybek Kojonazarov et al. Effect of Riociguat and Sildenafil on Right Heart Remodeling and Function in Pressure Overload Induced Model of Pulmonary Arterial Banding. *BioMed research international* 2018 Dec 16;2018:7491284. DOI: 10.1155/2018/7491284.
- Natalya Benderska and Regine Schneider-Stock. Transcription control of DAPK. *Apoptosis* (2014) 19:298–305 DOI 10.1007/s10495-013-0931-6.
- Nazzareno Galiè, Marc Humbert, Jean-Luc Vachiery, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2015; 46: 903–975. doi: 10.1183/13993003.01032-201
- Nicolas Martin, Carine Bossenmeyer-Pourie´, Violette Koziel, Rozat Jazi, Sandra Audonnet, Paul Vert, Jean-Louis Gue´ant, Jean-Luc Daval, Gre´gory Pourie. Non-Injurious Neonatal Hypoxia Confers Resistance to Brain Senescence in Aged Male Rats. *PLoS One*; San Francisco Bd. 7, Aug. 11, Nov 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0048828
- Ofer Cohen, Elena Feinstein and Adi Kimchi. DAP-kinase is a Ca²⁺/calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *The EMBO Journal* 1997 Mar 3;16(5):998-1008.
- Otto Warburg, Franz Wind, and Erwin Negelein. The metabolism of tumors in the body. *Journal of General Physiology* 1927 Mar 7; 8(6): 519–530. DOI: 10.1085/jgp.8.6.519.
- Otto Warburg. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 1956 Feb 24;123:309-314

- P. Dorfmueller, F. Perros, K. Balabanian and M. Humbert. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* 2003; 22: 358–363. DOI: 10.1183/09031936.03.00038903.
- Peter Dorfmueller, Marc Humbert, Frédéric Perros, Olivier Sanchez, Gérald Simonneau, Klaus-Michael Müller et al. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Human pathology* 2007 Jun;38(6):893-902. DOI:10.1016/j.humpath.2006.11.022.
- Pradeep R. Rai, Carlyne D. Cool, Judy A. C. King, Troy Stevens, Nana Burns, Robert A. Winn et al. The Cancer Paradigm of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 2008 Sep 15;178(6):558-64. doi: 10.1164/rccm.200709-1369PP.
- Prasant Yadav, Mirza Masroor, Kajal Nandi, R C M Kaza, S K Jain, Nita Khurana et al. Promoter Methylation of BRCA1, DAPK1 and RASSF1A is Associated with Increased Mortality among Indian Women with Breast Cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention* 2018 Feb 26;19(2):443-448. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.2.443.
- Pratibha Singh, Palaniyandi Ramanan and Priti Talwar. Death Associated Protein Kinase 1 (DAPK1): A Regulator of Apoptosis and Autophagy. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2016 Jun;9:46. DOI: 10.3389/fnmol.2016.00046
- Rajkumar Savai, Hamza M Al-Tamari, Daniel Sedding, Baktybek Kojonazarov, Christian Muecke, Rebecca Teske et al. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nature medicine* 2014 Nov;20(11):1289-300. DOI: 10.1038/nm.3695.
- Ralph Theo Schermuly, Eva Dony, Hossein Ardeschir Ghofrani, Soni Pullamsetti, Rajkumar Savai, Markus Roth et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *The Journal of clinical investigation* 2005 Oct;115(10):2811-21. DOI:10.1172/JCI24838.
- Rana Anjum, Philippe P. Roux, Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, and John Blenis. The Tumor Suppressor DAP Kinase Is a Target of RSK-Mediated Survival Signaling. *Current Biology* 2005 Oct 15(19):1762–1767. doi:10.1016/j.cub.2005.08.050.
- Rodrigo Carlessi, Vered Levin-Salomon, Sara Ciprut, Shani Bialik, Hanna Berissi, Shira Albeck, Yoav Peleg and Adi Kimch. GTP binding to the ROC domain of DAP-kinase regulates its function through intramolecular signaling. *EMBO reports* 2011 Sep 1;12(9):917-23. doi: 10.1038/embor.2011.126.

- Rubin M. Tuder, Bertron Groves, David B. Badesch, and Norbert F. Voelkel. Exuberant Endothelial Cell Growth and Elements of Inflammation Are Present in Plexiform Lesions of Pulmonary Hypertension. *The American journal of pathology* 1994 Feb;144(2):275-85.
- Ruth Shiloh, Shani Bialik and Adi Kimchi. The DAPK family: a structure- function analysis. *Apoptosis* 2014 Feb;19(2):286-97. DOI: 10.1007/s10495-013-0924-5.
- Ryan C. Widau, Yijun Jin, Shelley A. Dixon, Brian E. Wadzinski, and Patricia J. Gallagher. Protein Phosphatase 2A (PP2A) Holoenzymes Regulate Death-associated Protein Kinase (DAPK) in Ceramide-induced Anoikis. *The Journal of Biological Chemistry* 2010 Apr 30;285(18):13827-38. DOI: 10.1074/jbc.M109.085076.
- S Adnot and S Eddahibi. Lessons from oncology to understand and treat pulmonary hypertension. *International journal of clinical practice. Supplement* 2007 Dec;(158):19-25. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007.01618.x.
- S Fujieda, M Inuzuka, N Tanaka, H Sunaga, G K Fan, T Ito, C Sugimoto, H Tsuzuki, H Saito. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 1999 Jun 21;84(3):315-20. DOI: 10.1002/(sici)1097-0215(19990621)84:3<315::aid-ijc20>3.0.co;2-u.
- S Steinmann, K Scheibe, K Erlenbach-Wuensch, C Neufert and R Schneider-Stock. Death-associated protein kinase: A molecule with functional antagonistic duality and a potential role in inflammatory bowel disease (Review). *International Journal of oncology* 2015 Jul;47(1):5-15. DOI: 10.3892/ijo.2015.2998.
- Sabine Schmitz (2020). *Der Experimentator: Zellkultur* (4. Auflage). Springer-Verlag GmbH Deutschland.
- Shani Bialik and Adi Kimchi. DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Seminars in cancer biology* 2004 Aug;14(4):283-94. DOI: 10.1016/j.semcancer.2004.04.008
- Shani Bialik and Adi Kimchi. The DAP-kinase interactome. *Apoptosis* 2014 Feb;19(2):316-28. DOI: 10.1007/s10495-013-0926-3
- Shani Bialik and Adi Kimchi. The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond. *The Annual Review of Biochemistry* 2006;75:189-210. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142615

- Shen Zhang, Ivana Fantozzi, Donna D. Tigno, Eunhee S. Yi, Oleksandr Platoshyn, Patricia A. Thistlethwaite et al. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 2003 Sep;285(3):L740-54. DOI:10.1152/ajplung.00284.2002.
- Shin-ichi Nakatsuka, Tetsuya Takakuwa, Yasuhiko Tomita, Hideaki Miwa, Fumio Matsuzuka, and Katsuyuki Aozasa. Role of Hypermethylation of DAP-Kinase CpG Island in the Development of Thyroid Lymphoma. *Lab investigation; a journal of technical methods and pathology* 2000 Nov;80(11):1651-5. DOI:10.1038/labinvest.3780175
- Shin-ichi Nakatsuka, Tetsuya Takakuwa, Yasuhiko Tomita, Yoshihiko Hoshida, Mieko Nishiu, Motoko Yamaguchi et al. Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase CpG island is frequent not only in B-cell but also in T- and natural killer (NK)/T-cell malignancies. *Cancer science* 2003 Jan;94(1):87-91. DOI:10.1111/j.1349-7006.2003.tb01357.x.
- Susan Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007 ; 35(4): 495–516.
- T. Kawai, M. Matsumoto, K. Takeda, H. Sanjo and S. Akira. Zip kinase, a novel serine/threonine kinase which mediates apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* 1998 Mar;18(3):1642-51.
- Tae Ho Lee, Chun-Hau Chen, Futoshi Suizu, Pengyu Huang, Cordelia Schiene-Fischer, Sebastian Daum. Death Associated Protein Kinase 1 Phosphorylates Pin1 and Inhibits its Prolyl Isomerase Activity and Cellular Function. *Molecular Cell* 2011 Apr 22;42(2):147-59. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.03.005.
- Tal Raveh, Gustavo Droguett, Marshall S. Horwitz, Ronald A. DePinho and Adi Kimchi. DAP kinase activates a p19ARF/p53-mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. *Nature cell biology* 2001 Jan;3(1):1-7.
- Valentina Tereshko, Marianna Teplova, Joseph Brunzelle, D. Martin Watterson and Martin Egli. Crystal structures of the catalytic domain of human protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression. *Nature structural Biology* 2001 Oct;8(10):899-907.
- Velentza AV, Schumacher AM, Weiss C, Egli M, Watterson DM. A protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression: Structure, activity, and discovery of peptide substrates. *The Journal of biological chemistry* 2001 Oct 19;276(42):38956-65.

- Vered Levin-Salomon, Shani Bialik and Adi Kimchi. DAP-kinase and autophagy. *Apoptosis* 2014 Feb;19(2):346-56. DOI: 10.1007/s10495-013-0918-3.
- WE Wright, OM Pereira-Smith, JW Shay. Reversible Cellular Senescence: Implications for Immortalization of Normal Human Diploid Fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 1989 Jul;9(7):3088-92. DOI:10.1128/mcb.9.7.3088
- Weibo Luo and Gregg L. Semenza. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. *Trends in endocrinology and metabolism* 2012 Nov;23(11):560-6. DOI: 10.1016/j.tem.2012.06.010.
- Weihong Tu, Xin Xu, Lisheng Peng, Xiaofen Zhong, Wenfeng Zhang, Mangala M.Soundarapandian et al. DAPK1 Interaction with NMDA Receptor NR2B Subunits Mediates Brain Damage in Stroke. *Cell* 2010 Jan 22;140(2):222-34. DOI: 10.1016/j.cell.2009.12.055.
- Xue-bin Wang, Ning-hua Cui, Xia-nan Liu, Jun-fen Ma, Qing-hua Zhu, Shu-ren Guo et al. Identification of DAPK1 Promoter Hypermethylation as a Biomarker for Intra-Epithelial Lesion and Cervical Cancer: A Meta-Analysis of Published Studies, TCGA, and GEO Datasets. *Frontiers in genetics* 2018 Jul 17;9:258. doi: 10.3389/fgene.2018.00258.
- Y Huang, L Chen, L Guo, TR Hupp and Y Lin. Evaluating DAPK as a therapeutic target. *Apoptosis* 2014 Feb;19(2):371-86. DOI: 10.1007/s10495-013-0919-2.
- Yao Lin, Paul Henderson, Susanne Pettersson, Jack Satsangi, Ted Hupp and Craig Stevens. Tuberous sclerosis-2 (TSC2) regulates the stability of death-associated protein kinase-1 (DAPK) through lysosome-dependent degradation pathway. *The FEBS Journal* 2011 Jan;278(2):354-70. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07959.x.
- Yao Lin, Ted R. Hupp and Craig Stevens. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *The FEBS Journal* 2010 Jan;277(1):48-57. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07411.x.
- Ya-Ting Chuang, Li-Wen Fang, Ming-Hsien Lin-Feng, Ruey-Hwa Chen and Ming-Zong Lai. The Tumor Suppressor Death-Associated Protein Kinase Targets to TCR-Stimulated NF- κ B Activation. *Journal of immunology* 2008 Mar 1;180(5):3238-49. DOI: 10.4049/jimmunol.180.5.3238.
- Yijun Jin, Emily K. Blue, and Patricia J. Gallagher. Control of death-associated protein kinase (DAPK) activity by phosphorylation and proteasomal degradation. *The Journal of Biological Chemistry* 2006 Dec 22;281(51):39033-40. DOI:10.1074/jbc.M605097200.

Yijun Jin, Emily K. Blue, Shelley Dixon, Zhili Shao, and Patricia J. Gallagher. A Death-associated Protein Kinase (DAPK)-interacting Protein, DIP-1, is an E3 Ubiquitin Ligase That Promotes Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis and Regulates the Cellular Levels of DAPK. *The Journal of biological chemistry* 2002 Dec 6;277(49):46980-6. DOI: 10.1074/jbc.M208585200.

Yu-Ru Lee, Wei-Chien Yuan, Hsuan-Chung Ho, Chun-Hau Chen, Hsiu-Ming Shih and Ruey-Hwa Chen. The Cullin 3 substrate adaptor KLHL20 mediates DAPK ubiquitination to control interferon responses. *The EMBO Journal* 2010 May 19;29(10):1748-61. DOI: 10.1038/emboj.2010.62.

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Danksagung

*Ich möchte allen danken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben;
ein besonderer Dank gilt meiner Mama, Ralph und Tatyana.*