

**Identifizierung neuer Signalwege in der Pathogenese
pulmonaler Hypertonie bei chronisch obstruktiver
Lungenerkrankung**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Inna Tschipakow geb. Schevtschenko
aus Semipalatinsk/Kasachstan

Gießen (2022)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität

Cardio-Pulmonary Institute, Zentrum für Innere Medizin II

Gutachter: Prof. Dr. Weißmann

Gutachter: Dr. med. univ. Matt

Tag der Disputation: 28. Juni 2023

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs *International Giessen Graduate Centre for the Life Sciences* (GGL) am *Cardio-Pulmonary Institute* (CPI) der Justus-Liebig-Universität Gießen, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik II/V, angefertigt. Das Thema wurde von Herrn Prof. Dr. Weißmann vergeben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pulmonale Hypertonie (PH)	1
1.1.1	Definition und Klassifikation von PH	1
1.1.2	Ursachen und Pathogenese von PH	3
1.2	COPD	5
1.2.1	Definition und Klassifikation von COPD	5
1.2.2	Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung von COPD	9
1.2.3	Ursachen und Pathogenese von COPD	10
1.3	Pathomechanismen des Gefäßumbaus in COPD-PH	12
1.3.1	Endotheliale Dysfunktion	13
1.3.2	Immunsystem	15
1.3.3	Wachstumsfaktoren	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Chemikalien	20
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.4	Enzyme, Marker und Größenstandards	23
2.1.5	Kits und Assays	24
2.1.6	Primer	24
2.1.7	Antikörper	26
2.1.8	SiRNAs	27
2.1.9	Puffer und Lösungen	27
2.1.10	Medien und Seren	29
2.1.11	Zellen	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Auswahl und Charakterisierung humaner Proben	30

2.2.2	Auswahl der spezifischen Gene und Primer-Design	32
2.2.3	RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen.....	33
2.2.4	Quantitative Echtzeit-PCR (RTqPCR).....	34
2.2.5	Proteinextraktion	35
2.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot	35
2.2.7	Histologische Färbetechniken.....	36
2.2.8	Zellkultur-Experimente	38
2.2.9	Proliferationsassay	40
2.2.10	Statistische Analyse und Datenverarbeitung	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Expressionsanalyse von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in den Lungen von COPD-Patienten.....	42
3.2	Expressionsanalyse von SHH-Signalweg-assoziierten Genen in den Lungen von COPD-Patienten.....	45
3.3	Expression von Proliferationsmarkern in COPD-Lungen.....	49
3.4	Molekulare Untersuchung des Einflusses von CSE auf die hPASMC ...	50
3.4.1	Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen.....	50
3.4.2	Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Expression von SHH-Signalweg-assoziierten Genen.....	52
3.4.3	Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC.....	53
3.4.4	Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC	55
3.4.5	Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Expression von SHH-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC	56
3.4.6	Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC	57
3.5	<i>Knockdown</i> -Experimente an hPASMC.....	60
3.5.1	Wechselwirkungen zwischen ETV5, SHH und SPRY2 in hPASMC	60
3.5.2	Einfluss von ETV5, SPRY2 bzw. SHH auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASMC	61

3.5.3	Einfluss von ETV5, SPRY2 bzw. SHH auf die Proliferation von hPASMC nach chronischer CSE-Stimulation	62
3.6	Effekte von hEC auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC nach akuter CSE-Stimulation	63
4	Diskussion	66
4.1	Expressionsanalyse von FGF-Genfamilie und damit assoziierten Signalwegen in COPD-PH	66
4.2	Wirkungen von CSE auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC	72
4.2.1	Effekte einer akuten CSE-Exposition auf die Genexpression	73
4.2.2	Effekte chronischer CSE-Exposition auf die Genexpression	75
4.2.3	Effekte der akuten und chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC.....	77
4.3	Effekte von hEC auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC	79
4.4	Kritische Aspekte der verwendeten Modelle.....	82
4.4.1	Das humane Gewebe	82
4.4.2	Das Zellmodell	83
4.5	Ausblick auf weiterführende Experimente.....	84
5	Zusammenfassung	86
6	Summary	88
7	Abkürzungen	89
8	Abbildungsverzeichnis	93
9	Tabellenverzeichnis	96
10	Literaturverzeichnis	97
11	Anhang	126

11.1	RTqPCR.....	126
11.2	Western Blots.....	126
11.3	Veröffentlichungen.....	135
11.4	Poster Präsentationen.....	135
12	Ehrenwörtliche Erklärung.....	136
13	Danksagung.....	137

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie (PH)

1.1.1 Definition und Klassifikation von PH

Die pulmonale Hypertonie (PH) wird definiert als eine Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Druckes (*mean pulmonary arterial pressure*, mPAP) auf >20 mmHg und als ein Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstands (*pulmonary vascular resistance*, PVR) auf ≥ 3 Wood-Einheiten in Ruhe [1, 2].

Die Einteilung der PH-Erkrankungen in fünf Kategorien (Tab. 1) basiert auf Ähnlichkeiten im klinischen Verlauf, pathologischen Befunden, hämodynamischen Charakteristika und therapeutischen Merkmalen [3]. Die PH ist eine multifaktorielle Erkrankung, welche eigenständig oder als Folge anderer Erkrankungen auftreten kann. Alle Formen der PH sind durch die strukturellen Veränderungen der pulmonalen Vaskulatur charakterisiert, die mit den Umbauprozessen (*Remodeling*) assoziiert sind [4].

Zur Gruppe 1 der PH gehört die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) (Tab. 1). Diese Form ist charakterisiert durch pathologische Veränderungen, die besonders in den kleinen, distalen pulmonalen Arterien (Arteriolen) auftreten [5].

Die zweite Gruppe der PH ist durch die Erkrankungen des linken Herzens definiert (Tab. 1) [2]. Zu den pathologischen Merkmalen dieser Gruppe zählen eine Vergrößerung und Verdickung der pulmonalen Venen und der distalen Pulmonalarterien, eine Dilatation der pulmonalen Kapillaren, ein interstitielles Ödem, eine alveoläre Hämorrhagie (Blutung) sowie eine Vergrößerung von lymphatischen Gefäßen und Lymphknoten [6].

Die PH assoziiert mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie wird der Gruppe 3 zugeordnet und ist der Gegenstand dieser Arbeit. Charakteristische Ursache für diese PH-Form ist eine mangelhafte Sauerstoffversorgung der Lunge. Diese wird u. a. durch die Lungenerkrankungen (z. B. chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) und interstitielle Lungenerkrankungen) mit Einschränkung der Atmung, Schlafapnoe oder den Aufenthalt in großen Höhen hervorgerufen [3]. Die Pathomechanismen dieser Form der PH sind vielfältig. Als solche zählen die Vasokonstriktion, der mechanische Stress durch Hyperventilation der Lungen, der Verlust

Einleitung

von Kapillaren, die Inflammation sowie die Einwirkung von verschiedenen Noxen z. B. Zigarettenrauch [6]. Charakteristisch für COPD-Patienten im Endstadium mit PH sind die Hypertrophie von glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC), die Fibrose und die Elastose in der Intima der kleinen pulmonalen Arterien [7].

Tabelle 1: Klinische Einteilung der PH (verändert nach Simonneau et al. 2019 [2])

<p>I. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)</p> <ol style="list-style-type: none">1. Idiopathische PAH (IPAH)2. Hereditäre PAH<ol style="list-style-type: none">2.1. Knochenmorphogenetisches Protein (bone morphogenic protein, BMP) Rezeptor Typ 2 Mutation2.2. Andere Mutationen3. Arzneimittel und Toxin-induziert4. Assoziierte PAH, bei<ol style="list-style-type: none">4.1. Bindegewebserkrankung (Kollagenose)4.2. Humaner Immunodefizienz -Virus (HIV)-Infektion4.3. Portaler Hypertonie4.4. Angeborenem Herzfehler4.5. Schistosomiasis5. PAH bei Langzeitantwort auf Calciumkanal-Blocker6. Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen7. Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
<p>II. PH bei Erkrankung des linken Herzens</p> <ol style="list-style-type: none">1. Systolische Dysfunktion2. Diastolische Dysfunktion3. Herzklappenerkrankung4. angeborene/erworbene Linksherz-Einfluss-/Ausflusstrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien
<p>III. PH bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie</p> <ol style="list-style-type: none">1. COPD2. Interstitielle Lungenerkrankung3. Andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen4. Schlafapnoe-Syndrom5. Alveoläres Hypoventilationssyndrom6. Chronische Höhenkrankheit7. Pulmonale Fehlentwicklung
<p>IV. PH aufgrund pulmonalarterieller Obstruktionen</p> <ol style="list-style-type: none">1. Chronisch thromboembolische PH (CTEPH)2. Pulmonalarterielle Obstruktionen assoziiert mit<ol style="list-style-type: none">2.1 Angiosarkom2.2 Anderen intravaskulären Tumoren2.3 Arteriitis (Entzündungen der Arterien)2.4 Angeborenen pulmonalarteriellen Stenosen (Blutungen)2.5 Parasitären Erkrankungen (z. B. zystische Echinokokkose)
<p>V. PH mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen</p> <ol style="list-style-type: none">1. Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämatologische Anämie, myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszellenhistozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen4. Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronische Niereninsuffizienz, segmentale PH5. Komplexe angeborene Herzerkrankungen

Ein Zusammenhang wurde zwischen dem Schweregrad der PH in COPD-Patienten und Genpolymorphismen wie z. B. Serotonin Genpolymorphismus in der Literatur beschrieben [8].

Die Prävalenz von PH im fortgeschrittenen Stadium der COPD (schwergradige Form) beträgt etwa 50% [9]. Generell gilt die PH dieser Kategorie als mild bis moderat, mit mPAP-Werten von 21 bis 34 mmHg [10]. Die PH führt zu einer Druckbelastung der rechten Herzkammer, welche in einer Rechtsherzhypertrophie (in 40 bis 70% der COPD-Fälle [11]) resultieren kann. Die adaptive Hypertrophie wirkt zunächst dem hohen PVR entgegen und hält die Pumpfunktion des Herzens aufrecht. Eine andauernde Druckbelastung kann jedoch zu einer Dilatation der rechten Herzkammer und schließlich zu einer Rechtsherzinsuffizienz führen [12]. Die Rechtsherzinsuffizienz tritt bei Patienten mit einer schweren PH auf und ist nur selten bei COPD-Patienten zu beobachten. Eine schlechtere Prognose und eine erhöhte Mortalität bei COPD-Patienten wird durch PH verursacht [13]. Bei der interstitiellen Lungenerkrankung liegt die Prävalenz der PH zwischen 32 und 39% [6].

Die PH-Erkrankungen der Gruppe 4 und 5 sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

1.1.2 Ursachen und Pathogenese von PH

Die Ursachen von PH sind vielfältig, dazu zählen die genetische Prädisposition, die chronische Exposition gegenüber Noxen (z. B. Zigarettenrauch, siehe Abschnitt 1.3) und die Einnahme von bestimmten Medikamenten. Als genetische Ursache für die Entstehung von PH ist u. a. die Mutation im knochenmorphogenetischen Protein-Rezeptor 2 Gen (*bone morphogenetic protein receptor 2*, BMPR2) bekannt. Der BMPR2 gehört zur Familie der transformierenden Wachstumsfaktor- β Rezeptoren (*transforming growth factor β receptor*, TGF- β R). Zu den biologischen Funktionen des BMPR2 gehört u. a. die Regulation der Proliferation der vaskulären Endothelzellen (EC) und SMC. Die Mutation im BMPR2-Gen kommt in 11 bis 40% der Patienten mit der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) vor [14, 15]. Sie tritt hauptsächlich in der extrazellulären Ligand-bindenden Domäne, in der zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase Domäne oder in der carboxy-terminalen Domäne des Rezeptors auf. Seltener treten bei Patienten mit IPAH und vererbter (hereditärer) hämorrhagischer Teleangiektasie (Erkrankung der Kapillargefäße der Haut) die spezifischen Mutationen im Serin/Threonin-Proteinkinase Rezeptor R3 und Endoglin auf, die beide

Einleitung

Mitglieder der TGF- β R-Familie sind [16, 17]. Außerdem gibt es Hinweise auf einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Serotonin-Signalweg und der PH. Das Serotonin wird von Thrombozyten sekretiert und fungiert als ein Vasokonstriktor und Mitogen. Es fördert die Hyperplasie und die Hypertrophie von SMC und bindet dabei an G-Protein gekoppelte Rezeptoren auf der Zelloberfläche von SMC. Die Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Erhöhung der Kontraktion von SMC über die Hemmung der Adenylylcyclasen und des zyklischen Adenosinmonophosphats. Die proliferativen Effekte des Serotonins wurden in verschiedenen PH-Erkrankungen z. B. IPAH, hereditärer PAH und angeborener PH nachgewiesen [18].

Im Zusammenhang mit dem Auftreten von PH stehen Zigarettenrauch, Medikamente (z. B. Bleomycin, Interferone, Anorektika und Opioide), toxisches Rapsöl und Benfluorex. Des Weiteren wurde der Konsum von synthetisch hergestellten Substanzen z. B. Amphetaminen und Metamphetaminen mit der Entstehung von PH assoziiert [6].

Die genauen Mechanismen, welche die Entstehung von PH initiieren, sind noch nicht komplett entschlüsselt. Die PH wird jedoch mit einer anhaltenden pulmonalen Vasokonstriktion, proliferativen und obstruktiven Umbauprozessen in der Gefäßwand, einem Verschluss von kleinen bis mittelgroßen Arterien und Arteriolen sowie einer Inflammation in Verbindung gebracht. Eine erhöhte Vasokonstriktion entsteht durch eine abnormale Expression oder Funktion der Kaliumkanäle in den SMC und durch endotheliale Dysfunktion. Die endotheliale Dysfunktion beeinflusst die Produktion von Vasodilatoren und anti-proliferativen Mediatoren wie z. B. Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) und Prostazyklin. Bei Patienten mit PAH findet man zudem reduzierte Plasmaspiegel von weiteren vasodilatatorischen und anti-proliferativen Substanzen wie z. B. dem vasoaktiven intestinalen Peptid. Die Vasokonstriktoren und die pro-proliferativen Substanzen wie Thromboxan A₂ und Endothelin-1 (ET-1) sind dagegen bei PAH-Patienten erhöht. Diese Dysbalance zwischen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Substanzen erhöht zum einen den Gefäßtonus und fördert zum anderen den vaskulären Umbau durch proliferative Veränderungen in den EC, SMC und Fibroblasten. In der *Tunica adventitia* wird vermehrt Kollagen, Elastin, Fibronectin und Tenascin eingelagert. Außerdem spielen die inflammatorischen Zellen und Thrombozyten (über den Serotonin-Signalweg) eine Rolle in der PAH Pathogenese [6]. Dafür sprechen die thrombotischen Veränderungen, die in den

kleinen distalen und proximalen pulmonalen Arterien von PAH Patienten festgestellt wurden [6].

1.2 COPD

1.2.1 Definition und Klassifikation von COPD

Der Begriff COPD fasst zwei Krankheitsformen zusammen: eine progressive Entzündung der Atemwege (chronische Bronchitis) und eine Destruktion des Lungenparenchyms (Emphysem). Beide Krankheitsformen können zeitgleich auftreten oder sich im Laufe der Zeit unabhängig voneinander entwickeln. Die COPD geht mit Symptomen wie chronischem Husten, Auswurf und Atemnot einher und nimmt meist einen schleichenden Verlauf. Sie beginnt oft mit einem harmlosen Husten und wird von den Betroffenen nicht selten erst Jahre später, wenn sich die Symptome verschlechtern, wahrgenommen [19].

Die pathologischen Veränderungen in den Atemwegen und Alveolen verursachen eine Verengung der Atemwege (Atemwegsobstruktion), die nicht vollständig reversibel ist. Die Atemwegsobstruktion ist mit einer Inflammation der Atemwege verbunden, welche durch das Einatmen von schädlichen Partikeln wie z. B. Zigarettenrauch oder Gasen hervorgerufen wird. Laut Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) liegt eine chronische Bronchitis vor, wenn Husten und Mukushypersekretion in einem Zeitraum von mindestens drei Monaten und in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Jahren auftreten [19]. Charakteristisch ist die Entzündung der Bronchiolen sowie die Schädigung des Epithels der zentralen Atemwege und der schleimproduzierenden Drüsenzellen. Diese Ereignisse führen schließlich zu vermehrter Schleimproduktion, vermindertem Zilienschlag und gesteigerter Permeabilität des Epithels. Die erhöhte Permeabilität resultiert in einem Lungenödem mit einer Behinderung des Gasaustausches und darauffolgender Hypoxämie [20]. Die Schleimproduktion trägt im fortgeschrittenen Stadium der COPD zur Verschlechterung des Krankheitsbildes (Exazerbation) bei und ist mit einer Verminderung der Lungenfunktion verbunden [16, 21].

Die Aufblähung der Alveolen und die chronisch-inflammatorischen Prozesse können eine Zerstörung des Lungenparenchyms mit einer erheblichen Reduktion des elastischen Gerüsts der Lunge verursachen. Hierdurch kommt es zu einer Beeinträchtigung des Gasaustausches

Einleitung

und zu einer zunehmenden Unterversorgung mit Sauerstoff [22]. Das Emphysem ist durch eine abnormale Vergrößerung der Lufträume distal der terminalen Bronchiolen charakterisiert und geht mit einer Destruktion der alveolären Wände einher. Eine Reduktion der Elastizität der Lunge und ein verringerter (maximaler) expiratorischer Luftstrom sind die Konsequenzen. Es wird zwischen dem zentroazinären, dem panazinären und dem bullösen Emphysem unterschieden [21]. Das zentroazinäre Emphysem betrifft die oberen Lungenlappen und ist durch eine Schädigung der respiratorischen Bronchiolen charakterisiert. Diese Form des Emphysems steht im Zusammenhang mit Rauchen von Tabak. Das panazinäre Emphysem findet sich in den Azini, die aus Alveolen und Alveolargängen (*Ductus alveolares*) bestehen. Das panazinäre Emphysem zeichnet sich durch Erweiterung und Zerstörung des gesamten Azinus aus [21]. Der Hauptgrund für diese Form des Emphysems ist ein Mangel des Alpha-1-Antitrypsins (AAT). Ein Zusammenhang wurde zwischen dem Schweregrad des Emphysems und den Packungsjahren (Zahl der täglich konsumierten Zigarettenpackungen multipliziert mit der Zahl der Raucherjahre) festgestellt [21]. Ein Emphysem kommt bei 40% der Raucher vor, kann aber auch bei Individuen mit einer normalen Lungenfunktion auftreten [23].

Der Schweregrad der Atemwegsobstruktion korreliert mit der Intensität des Rauchens [21]. Raucher weisen im Vergleich zu Nichtrauchern häufiger respiratorische Beschwerden, Störungen in der Lungenfunktion und eine höhere Abfallrate des forcierten Expirationsvolumens in einer Sekunde (FEV1) auf [24]. Die Abnahme des FEV1-Wertes ist bei starken Rauchern mit milder bis mittelgradiger COPD stärker als bei leichten Rauchern [25]. Die Reduktion des FEV1-Wertes wird durch die Rauchentwöhnung verlangsamt [26]. COPD gilt als eine systemische Erkrankung, welche von kardiovaskulären Erkrankungen, systemischer Inflammation, Skelettmuskelschwäche (Atrophie), Fehlfunktion des Diaphragmas, metabolischem Syndrom, Osteoporose und psychischer Depression begleitet wird (Abb. 1). Zu den kardiovaskulären Begleiterkrankungen von COPD zählen die PH, die Arteriosklerose von Koronararterien (Herzkranzgefäße) und die Herzinsuffizienz. Von Patienten mit einer schweren Form der COPD, welche sich einer Lungenvolumenreduktion oder einer Lungentransplantation unterziehen ließen, wiesen etwa 50,2% eine milde PH, 9,8% eine mittelgradige und 3,7% eine schwere PH auf [27]. Die PH ist mit einem erhöhten Risiko für Krankenhausaufenthalte verbunden und ist ein wichtiger prognostischer Faktor für

Einleitung

COPD-Patienten [28]. Der Einfluss von PH auf die Mortalität von COPD-Patienten ist unabhängig von dem Alter und der Lungenfunktion [7].

Im Plasma und Sputum von Patienten im fortgeschrittenen COPD-Stadium sind erhöhte Zytokin- (Interleukin (IL)-1 β , -6, -8 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Chemokin-, Akute-Phase Protein-Spiegel und eine erhöhte Gesamtleukozytenzahl nachweisbar. Die Intensität der systemischen Inflammation steigt während einer Exazerbationsphase und ist mit einer beschleunigten Abnahme der Lungenfunktion verbunden [29]. Die Ursache der systemischen Inflammation bei COPD-Patienten ist nicht bekannt, das Rauchen von Zigaretten, die Lungenüberblähung, die Hypoxie oder die Skelettmuskelschwäche werden als mögliche Ursachen diskutiert [30]. Eine inflammatorische Reaktion mit einer erhöhten Gesamtleukozytenzahl tritt bei Rauchern mit und ohne COPD auf, bei Rauchern mit COPD ist diese jedoch stärker ausgeprägt [23].

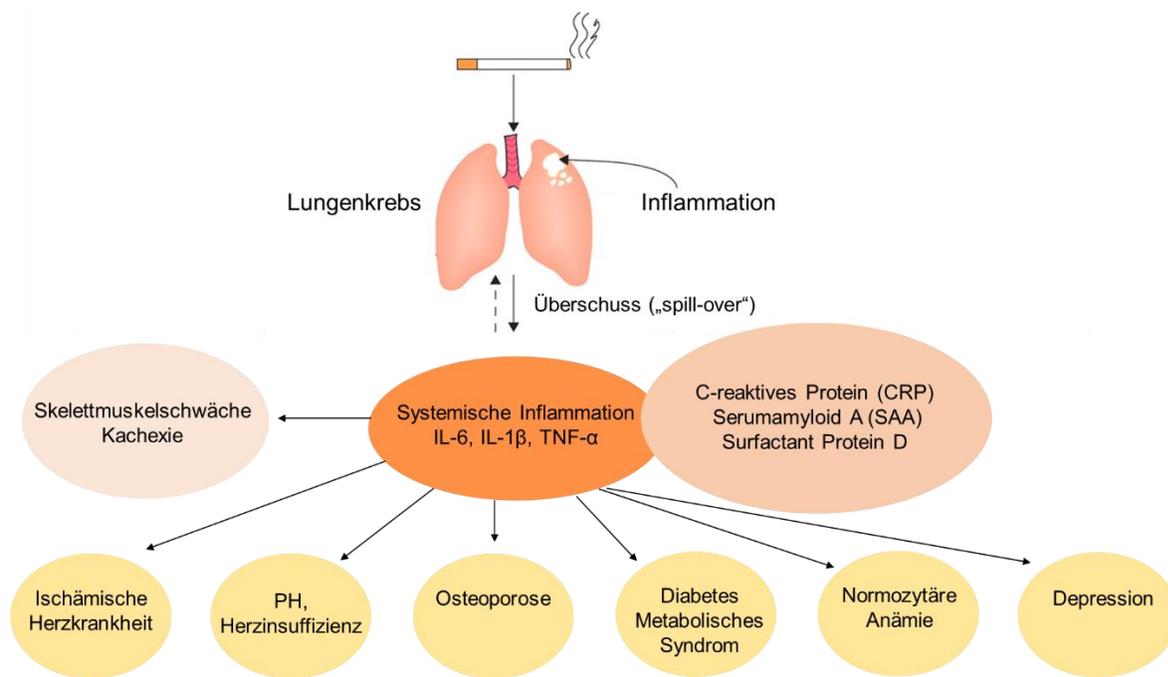


Abbildung 1: Systemische Effekte und Begleiterscheinungen von COPD.

Durch Zigarettenrauch wird eine periphere Lungeninflammation verursacht. Dabei kommt es zu einer Überproduktion von Zytokinen (z. B. IL-6, IL-1 β und TNF- α) im systemischen Kreislauf. Dies hat die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen wie z. B. des C-reaktiven Proteins zur Folge. Die systemische Inflammation ist mit der Entstehung der PH und anderer Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, normozytäre Anämie oder Skelettmuskelschwäche assoziiert. Verändert nach *Barnes und Celli, 2009* [28].

Einleitung

Bei der Diagnose von COPD werden die Lungenfunktion (Spirometrie), die physische Verfassung, die Symptomatik und die Anzahl der Exazerbationen (deutliche Verschlechterung der Lungenfunktion) berücksichtigt [31].

Laut der *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease* (GOLD) wird eine Spirometrie bei jedem Patienten, welcher älter als 40 Jahre ist und der unter chronischem Husten, Dyspnoe und vermehrtem Ausfluss leidet und/oder Risikofaktoren ausgesetzt ist, empfohlen. Die COPD wird spirometrisch in Schweregrade GOLD I bis GOLD IV (Tabelle 2) eingeteilt. Als entscheidende Kriterien dienen dabei folgende Parameter: der FEV1-Wert, die Vitalkapazität und die relative Einsekundenkapazität. Zusätzlich werden die Symptomatik und die Häufigkeit der akuten Exazerbationen bei der Einteilung der COPD-Schweregrade berücksichtigt [32].

Die Heilung von COPD ist trotz intensiver Forschung nicht möglich. Die zur Verfügung stehenden medikamentösen und nicht-medikamentösen therapeutischen Maßnahmen konzentrieren sich vor allem auf das Verlangsamen der Progression der Erkrankung, die Verbesserung der Fitness des Patienten, die Linderung der Symptome und die Vorbeugung gegen Krankheitsschübe, um die Lebensqualität der Betroffenen zu steigern. Die Rauchentwöhnung ist die effektivste Behandlung von COPD, wenn das Rauchen der Auslöser ist [33].

Tabelle 2: GOLD-Klassifizierung der COPD-Schweregrade

(GOLD: *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*; FEV1 = forciertes Expirationsvolumen in einer Sekunde; FVC= forcierte Vitalkapazität; modifiziert nach GOLD, GOLD Report 2019 <https://goldcopd.org/gold-reports/>)

Schweregrad nach FEV1	Kriterium für Obstruktion
GOLD I (milde Form)	FEV1/FVC <0,70 FEV1 >80% des Sollwertes Symptome: chronischer Husten und vermehrte Schleimproduktion möglich
GOLD II (mittelgrade Form)	FEV1/FVC <0,70 FEV1 <80% und \geq 50% des Sollwertes Symptome: Atemnot nur bei starker körperlicher Anstrengung, chronischer Husten und Auswurf
GOLD III (schwergradige Form)	FEV1/FVC <0,70 FEV1 <50% und \geq 30% Sollwertes Symptome: leichte Atembeschwerden bereits bei geringer körperlicher Anstrengung, chronischer Husten und Auswurf, Herz- und Kreislaufprobleme können auftreten
GOLD IV (sehr schwergradige Form)	FEV1/FVC <0,70 FEV1 <30% des Sollwertes Symptome: Schwere Atemnot auch im Ruhezustand, eingeschränkte körperliche Leistungsfähigkeit, chronischer Husten und Auswurf, Herz- und Kreislaufprobleme, bläuliche Verfärbung von Teilen der Haut und Lippen kann auftreten

1.2.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung von COPD

Die COPD ist eine Volkskrankheit mit einer steigenden Mortalität und Prävalenz [24]. Laut Schätzungen der WHO waren im Jahr 2016 etwa 251 Millionen Menschen weltweit von COPD betroffen. Für etwa drei Millionen Menschen weltweit verlief die Erkrankung im Jahr 2015 tödlich, was in etwa 5% aller Todesfälle weltweit entspricht. 90% dieser Todesfälle wurden in Entwicklungsländern und Ländern mit einem mittleren Einkommen registriert

[34]. Die Mortalität von COPD nimmt kontinuierlich zu und diese Erkrankung könnte nach Einschätzung der WHO im Jahr 2030 zur dritthäufigsten Todesursache weltweit werden [35]. Die Prävalenz für COPD in Industrieländern ist bei Männern und Frauen vergleichbar. Dies ist möglicherweise auf den steigenden Tabakkonsum von Frauen und auf die erhöhte Freisetzung von Feinpartikeln (z. B. beim Kochen im Haushalt) zurückzuführen [35]. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass Frauen empfindlicher auf Zigarettenrauch reagieren und somit ein höheres Risiko haben, eine Zigarettenrauch-induzierte Lungenfunktionsstörung zu entwickeln [36, 37].

1.2.3 Ursachen und Pathogenese von COPD

Die Entstehung von COPD ist komplex und multifaktoriell. Zu den Ursachen zählen der Tabakkonsum, die Umweltverschmutzung (z. B. durch Dämpfe, Staub, Rauch oder Gase), die genetische Prädisposition (AAT-Mangel), die Infektionserkrankungen sowie der sozioökonomische Status des Patienten. Bei all diesen Risikofaktoren sind 80 bis 90% der COPD-Fälle auf Tabakrauchkonsum zurückzuführen [38].

Zigarettenrauch ist ein Gemisch aus mehr als 4700 chemischen Bestandteilen und eine Primärquelle für Oxidantien [39, 40]. In einem einzigen Zigarettenzug sind etwa 10^{14} bis 10^{16} freie Radikale enthalten [41]. In der Partikelphase (Teer) des Rauches befinden sich z. B. Phenole und Semiquinone und in der Gasphase sind flüchtige organische und anorganische Komponenten wie Superoxid, Epoxid, Peroxid, NO, Stickstoffdioxid, Peroxynitrit und Peroxynitrat enthalten [42, 43]. Es besteht ein enger Zusammenhang zwischen dem oxidativen Stress und der Entstehung von COPD [44]. Von oxidativem Stress spricht man, wenn es zu Veränderungen im Oxidantien-Antioxidantien Haushalt kommt, wodurch ein Ungleichgewicht zugunsten der Oxidantien entsteht [45]. Die Auswirkungen von oxidativem Stress sind vielfältig. Neben der Schädigung von DNA, Lipiden und Proteinen werden verschiedene Prozesse wie z. B. die Balance zwischen Proteasen und Anti-Proteasen gestört sowie die Entstehung von COPD begünstigt [46]. Im Zigarettenrauch enthaltene Radikale führen zu einer Schädigung des Lungenepithels und zu einer Erhöhung der Permeabilität [44], was in der Störung des vaskulären Tonus [47], der Überproduktion vom Schleim, der Bronchokonstriktion sowie der Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix (z. B. Kollagen und Elastin) resultiert [44, 48, 49].

Außerdem kann Zigarettenrauch eine Inflammation in den zentralen und peripheren Atemwegen und dem Lungenparenchym, unabhängig von COPD, verursachen. In bronchialen Biopsien von Rauchern mit einer milden bis mittelgradigen COPD konnten chronisch-inflammatorische Veränderungen mit einer erhöhten Anzahl von spezifischen inflammatorischen Zelltypen (u. a. Makrophagen, T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und dendritische Zellen) sowie strukturelle Umbauprozesse festgestellt werden [50, 51]. Die Makrophagen spielen bei der Initiation der Immunreaktion und bei der Aufrechterhaltung der proteolytischen Aktivität in den Lungen von COPD-Patienten eine wichtige Rolle. Es kommt zu einem fünf- bis zehnfachen Anstieg der Makrophagenzahl in den Atemwegen, dem Lungenparenchym und der bronchoalveolären Lavage von COPD-Patienten, welche mit dem Schweregrad der COPD korreliert [52]. Aktiviert durch Tabakrauch setzen die Makrophagen Matrix-Metalloproteasen (MMP) wie z. B. MMP-12 frei, die elastische Fasern und andere Komponenten der extrazellulären Matrix in der Lunge degradieren [52]. Die Makrophagen sekretieren außerdem inflammatorische Mediatoren wie neutrophile Chemokine (z. B. IL-8 und TNF- α). Diese wurden vermehrt im Sputum von COPD-Patienten gefunden, wobei die Konzentrationen mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren [53]. IL-8 und TNF- α regen die neutrophilen Granulozyten u. a. zur Produktion von Proteasen an. Im Zusammenhang mit der Entstehung des Emphysems stehen vor allem die neutrophile Elastase, neutrophile Proteinase 3, neutrophile Cathepsin G, Cathepsin B, L, S und K sowie verschiedene MMPs (MMP-1,-2,-9), die von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten sekretiert werden [54, 55]. Eine Erhöhung der Anzahl von CD8⁺-Lymphozyten wurde sowohl in Atemwegen von gesunden Rauchern als auch von Rauchern mit COPD nachgewiesen, die mit dem Grad der alveolären Schädigung und der Atemwegsobstruktion korreliert [21]. Zudem gibt es Hinweise auf die Beteiligung von CD8⁺-Lymphozyten an der Apoptose von alveolären Epithelzellen bei Emphysem-Patienten [56]. Die erhöhte Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Sputum und in den bronchialen Biopsien stehen mit der Abnahme der Lungenfunktion und dem COPD-Schweregrad im Zusammenhang [57]. Mögliche Effekte, die durch die inflammatorischen Zellen verursacht werden, sind Metaplasie (Umwandlung) des Epitheliums mit dem Verlust der Zilien, Vergrößerung der Schleimdrüsen, Hypersekretion,

Atemwegs- Obstruktion, parenchymale Destruktion, mucosale Ödeme sowie parabronchiale Fibrose [45].

Neben dem Tabakrauchkonsum zählt die Umweltverschmutzung (z. B. aufgrund der Verbrennung von Biomasse) zu den Ursachen für COPD. Pflanzliche Brennmaterialien (z. B. Holz, Kohle und Stroh) werden im Haushalt vor allem beim Kochen und Heizen verwendet. Dabei kommt es zur Freisetzung von u. a. Schwefeldioxid, Kohlenmonoxid, NO sowie Formalaldehyd. Weltweit sind ca. 2,6% und in den Entwicklungsländern ca. 35% der COPD-Fälle auf freigesetzte Schadstoffe beim Kochen zurückzuführen [58, 59].

Darüber hinaus wurde ein kausaler Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Schadstoffen (Asphalt, Zement, Cadmium, Kohle und Quarz), chemischen Dämpfen (Lösungsmitteldämpfe) und Gasen (Ozon, Schwefeldioxid, Chlor, Ammoniak, Alkohol und Formaldehyd) und der Entstehung von COPD gefunden [60].

Die COPD ist eine polygene Erkrankung, bei der komplexe Interaktionen verschiedener Genpolymorphismen (z. B. von Genen, die für TNF, Glutathion-S-Transferase, MMP-12, TGF- β 1 codieren) eine Rolle spielen [61–63]. In Verbindung mit COPD steht auch die Mutation im *serpin family A member 1* Gen, welches für AAT codiert. Diese Mutation bewirkt einen AAT-Mangel mit der Folge einer überschüssigen Aktivität von Proteasen, die zum Emphysem führen kann. Von dieser Mutation sind allerdings nur etwa ein bis zwei Prozent der Bevölkerung betroffen [63].

1.3 Pathomechanismen des Gefäßumbaus in COPD-PH

Die toxischen Effekte von Zigarettenrauch beschränken sich nicht nur auf die Atemwege und Alveolen, das pulmonale Gefäßsystem ist ebenfalls betroffen [64]. *Barbera et al.* zeigten, dass die pulmonalarteriellen Umbauprozesse bereits vor den Veränderungen in den Alveolen auftreten können [7, 65]. Die pulmonalarteriellen Umbauprozesse betreffen alle drei Schichten der Blutgefäßwand, die äußere Schicht (*Tunica adventitia*), die mittlere Schicht (*Tunica media*) und die innere Schicht (*Tunica intima*) und werden durch die erhöhte Zellproliferation (Hyperplasie), das Zellwachstum (Hypertrophie), den Zelltod (Apoptose), die Zellmigration sowie die Synthese der extrazellulären Matrix verursacht [66]. Die pulmonalvaskulären Umbauprozesse in COPD-PH sind vor allem mit der Verdickung der *Tunica intima* und *Tunica media* verbunden [67, 68]. Dabei kommt es zur Schädigung des

Endothels, Proliferation von EC und Einlagerungen von Elastin in der *Tunica intima*. Weiterhin ist die Proliferation und Hypertrophie der SMC, die Rekrutierung und die Differenzierung von Knochenmark-stämmigen Vorläuferzellen (Fibroblasten und endotheliale Vorläuferzellen) zu SMC sowie die Einwanderung von SMC aus der *Tunica media* in die *Tunica intima* an dem Umbauprozess beteiligt [69, 70]. Die Veränderungen in der Blutgefäßwand führen zu einer Verengung des Gefäßlumens und verursachen eine Erhöhung des PAP und PVR [67].

Zum pulmonalvaskulären Umbauprozess tragen viele Faktoren bei, u. a. die endotheliale Dysfunktion (Abb. 2), die gestörten Interaktionen zwischen den EC und SMC in der Gefäßwand [71], die gestörte Immunreaktion in pulmonalen Gefäßen, die erhöhte Apoptose von EC [72], die veränderte Aktivierung bestimmter Signalwege (z. B. TGF- β Signalweg) [73] sowie die Veränderungen im Hormonhaushalt (z. B. die Aktivierung von Neurohormonen wie Noradrenalin und natriuretisches Peptid Type-B) [74].

1.3.1 Endotheliale Dysfunktion

Das Endothel ist ein wichtiger Bestandteil des vaskulären Systems. Zum einen reguliert es durch seine Semipermeabilität den Austausch von Flüssigkeiten, Ionen und gelösten Stoffen zwischen dem Blut und der Blutgefäßwand. Zum anderen spielt es eine Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase. Das Endothel kontrolliert die vaskuläre Funktion, indem es auf diverse Stimuli wie Zigarettenrauch, Hormone, Neurotransmitter, Hypoxie und mechanische Verletzungen reagiert, welche den Gefäßtonus (Vasokonstriktion vs. Vasodilatation), den Blutfluss, die Thrombozytenaggregation sowie die Inflammation beeinflussen. Die EC sekretieren eine Vielzahl von Vasokonstriktoren und Vasodilatoren, dazu zählen NO, Prostazyklin und ET-1. Diese vasoaktiven Substanzen haben einen Einfluss auf die Hypertrophie und Hyperplasie von SMC [64]. In zahlreichen Tiermodellen und klinischen Studien wurde demonstriert, dass die Komponenten des Zigarettenrauchs (Nikotin und Kohlenmonoxid) sowohl morphologische als auch funktionelle Veränderungen des Endothels verursachen [75–78]. Eine Verletzung oder Funktionsstörung der Endothelschicht kann in einer Dysbalance von vasoaktiven Substanzen zu Gunsten der Vasokonstriktoren resultieren und zum pulmonalvaskulären Umbau in COPD führen (Abb. 2) [75, 79].

Einleitung

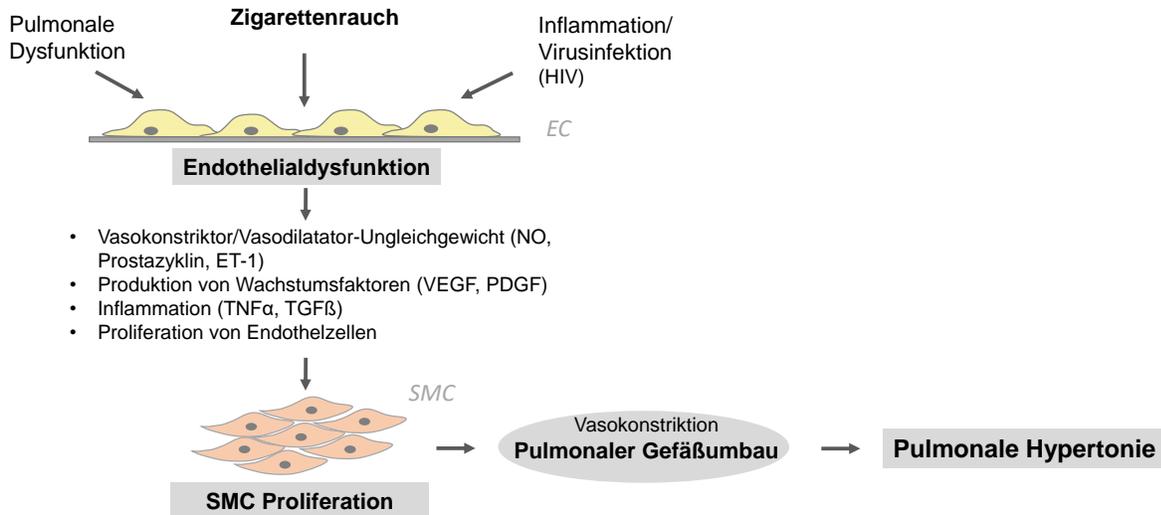


Abbildung 2: Zelluläre und molekulare Mechanismen der pulmonalvaskulären Umbauprozesse und PH assoziiert mit COPD.

Die toxischen Effekte von Zigarettenrauch, die Inflammation und die pulmonale Dysfunktion sind als Auslöser für eine Endothelialdysfunktion bekannt. Die Endothelialdysfunktion resultiert in der Produktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren (VEGF, PDGF), dem Ungleichgewicht zwischen den Vasodilatoren und Vasokonstriktoren, der Sekretion von inflammatorischen Mediatoren (TNF- α , TGF- β) und der Proliferation von EC. Diese Prozesse führen zur Proliferation von pulmonalarteriellen SMC und zum pulmonalvaskulären Umbau und PH. EC: Endothelzellen, SMC: *smooth muscle cells*, NO: Stickstoffmonoxid, ET-1: Endothelin 1, VEGF: *vascular endothelial growth factor*, PDGF: *platelet-derived growth factor*, TNF- α : *tumor necrosis factor α* , TGF- β : *transforming growth factor- β* .

1.3.1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

NO wirkt als ein Vasodilatator und hemmt die Proliferation von SMC [80]. Die Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und die Konzentration des NO sind bei Rauchern und COPD-Patienten im Vergleich zu Nichtrauchern geringer [81–83]. Zigarettenrauchextrakt (CSE) hemmt die Aktivität der eNOS in pulmonalarteriellen EC *in vitro*. Damit ließe sich die reduzierte Endothelium-abhängige Vasodilatation bei Rauchern mit COPD erklären [84]. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wurde des Weiteren als ein wichtiges Protein in der PH- und Emphysementstehung identifiziert [85].

1.3.1.2 Prostazyklin

Prostazyklin hat eine vasodilatatorische und antiproliferative Wirkung. Emphysematöse Lungen weisen im Vergleich zu gesunden Lungen eine geringere Expression von Prostazyklin-Synthase auf [86]. Zigarettenrauch hemmt die Prostazyklin-Synthase in

humanen mikrovaskulären EC signifikant [86]. Die IPAH-Patienten weisen eine geringere Konzentration der Prostazyklin-Synthase in den pulmonalen Arterien auf. Eine Therapie mit Prostazyklin (Epoprostenol) führt bei PAH zur Verbesserung des pulmonalarteriellen Druckes und zur Erhöhung der Überlebenszeit [87].

1.3.1.3 Endothelin-1 (ET-1)

Lee et al. zeigten, dass CSE die ET-1 Proteinexpression in humanen und bovinen pulmonalarteriellen EC induziert [88]. ET-1 wird in COPD-Patienten vermehrt produziert und steigt während einer Exazerbationsphase weiter an [89]. Erhöhte ET-1 Konzentrationen wurden zudem bei PAH-Patienten und bei einer interstitiellen Lungenerkrankung gemessen [90].

1.3.2 Immunsystem

Die strukturellen und funktionellen Veränderungen in den Gefäßen von Patienten mit COPD-PH stehen außerdem im Zusammenhang mit der Akkumulation von inflammatorischen Zellen in der Gefäßwand. Der Grad des inflammatorischen Infiltrats in der *Tunica adventitia* korreliert mit dem Schweregrad der Verdickung der *Tunica intima* in den pulmonalen Arterien von COPD-Patienten [70]. Zusätzlich wird bei COPD-PH-Patienten eine Zunahme der systemischen Entzündungsmarker wie C-reaktives Protein und TNF- α beobachtet [91]. Der neutrophile Entzündungsmarker Calprotektin ist in Blutproben von Patienten mit einer mittel- und schwergradigen COPD erhöht [92]. Zudem findet eine Infiltration von Makrophagen, B- und T-Zellen aus dem perivaskulären Raum in die vaskuläre Wand statt, die mit einer Erhöhung der inflammatorischen Mediatoren S100A4 und Fraktalkine einhergeht [93,94]. Darüber hinaus ist die Expression von dem inflammatorischen Marker Nukleusfaktor leichter κ -Ketten der aktivierten B-Zellen (*nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B-cells*, NF- κ B) in EC von aktiven und passiven Rauchern erhöht [95].

1.3.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die von verschiedenen Zellen sezerniert werden und durch endokrine, parakrine oder autokrine Mechanismen wirken [96].

Einleitung

Die Wachstumsfaktoren wirken über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Rezeptoren sind mit einer intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität verbunden oder bilden einen Komplex mit der intrazellulären Tyrosinkinase [97]. Die Tyrosinkinase-Rezeptoren sind aus einer membranüberspannenden Domäne zusammengesetzt, welche die intrazelluläre konservierte Kinase-Domäne von der extrazellulären glykosylierten Ligand-bindenden Domäne separiert. Die letztere enthält u. a. eine oder mehrere Immunglobulin-, Fibronectin Typ III- bzw. epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF)-ähnliche Domänen [97]. Die Bindung des Wachstumsfaktors (z. B. TGF- β , EGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*fibroblast growth factor*, FGF), BMP, *platelet-derived growth factor* (PDGF) oder *vascular endothelial growth factor* (VEGF)) führt zur Di- oder Oligomerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors, wodurch verschiedene Signalkaskaden z. B. *rat sarcoma* (RAS) - *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), *phosphoinositide-3-kinase* (PI3K) - Proteinkinase B (AKT), Phospholipase C γ (PLC γ) oder *signal transducers and activators of transcription* (STAT) aktiviert werden [98]. Die Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptor-vermittelten Signalwegen durch FGF, EGF, VEGF und PDGF induziert die Zellproliferation und -differenzierung, während TGF- β und BMP entgegengesetzte Effekte haben [99, 100].

In der adulten Lunge spielen FGF, EGF, TGF- β , VEGF, PDGF und BMP eine Rolle bei verschiedenen pulmonalen Erkrankungen (Abb. 3) [101]. Bei Säugetieren besteht die FGF-Familie aus 22 Mitgliedern (FGF1 - FGF14, FGF15 (Maus) /19 (Mensch), FGF16 - FGF18, FGF20 - FGF23). Die FGF werden basierend auf den Unterschieden in Sequenzhomologie und Phylogenie auf sieben Subfamilien (FGF1, -4, -7, -8, -9, -11 und -15/-19) unterteilt [102]. Sie sind in fast allen Geweben exprimiert und haben eine Schlüsselrolle in der Embryonalentwicklung. Im adulten Organismus regulieren sie die Wundheilung, die Angiogenese, die Regeneration und den Stoffwechsel. Die FGF binden an FGF-Rezeptoren (FGFR1 - FGFR4) und können autokrin, parakrin oder endokrin wirken [102]. Die parakrin wirkenden FGF (FGF1, -4, -7,-8, -9, -11, -15/-19) benötigen Heparansulfat als Kofaktor, während die endokrin wirkenden FGF (FGF19, -21 und -23) α -Klotho und β -Klotho als Kofaktoren brauchen. Die FGF initiieren die *downstream* Signalwege wie RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ oder STAT. Über diese Signalwege regulieren die FGF diverse zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, -migration sowie -differenzierung und haben eine Funktion

Einleitung

bei der Geweberegeneration und -reparatur [102–105]. Sie wirken kardioprotektiv bei ischämischen Gewebeschäden und sind essentiell für die epitheliale Reparatur und Wundheilung in der Lunge [106, 107]. Die FGF-Signalwege wurden mit respiratorischen Erkrankungen wie pulmonale Fibrose und Asthma assoziiert [108,109]. So besteht ein Zusammenhang zwischen dem FGF2-Signalweg und der Progression von IPAH [110]. Die Rolle von FGF in COPD-PH ist bis jetzt noch nicht geklärt.

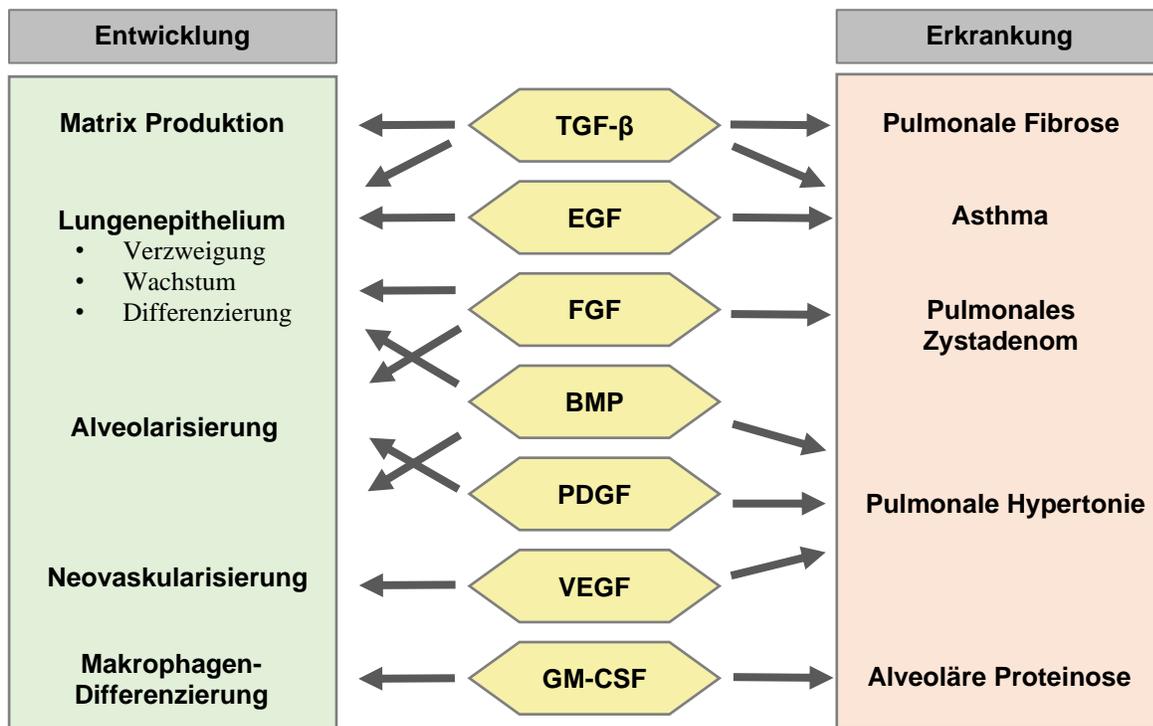


Abbildung 3: Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit der Lungenentwicklung und den Erkrankungen der Lunge.

Übersicht über Wachstumsfaktoren, welche eine wichtige Rolle in der embryonalen und postnatalen Lungenentwicklung sowie in Erkrankungen des respiratorischen Systems (z. B. pulmonale Hypertonie, Asthma, pulmonale Fibrose, pulmonales Zystadenom und alveoläre Proteinose) spielen. BMP: *bone morphogenetic protein*; EGF: *epidermal growth factor*; FGF: *fibroblast growth factor*; GM-CSF: *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; TGF: *transforming growth factor*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*. Verändert nach Desai und Cardoso, 2002 [101].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuer Signalwege, die eine Rolle in pulmonalvaskulären Umbauprozessen und COPD-PH spielen könnten. Der Schwerpunkt wurde dabei auf die Familie der FGF gelegt, da die Bedeutung dieser für COPD-PH noch nicht vollständig geklärt ist.

Dazu wurden folgende Aspekte näher untersucht:

- A) Die Analyse von Zielgenen in Lungenhomogenaten von Nichtrauchern (ohne COPD), Rauchern (ohne COPD) und Rauchern (mit COPD) mit Hilfe von quantitativer Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (*real time quantitative polymerase chain reaction*, RTqPCR), Western-Blots sowie histologischer Techniken
- B) Die Analyse der Expression von Zielgenen in humanen pulmonalarteriellen SMC (hPASMC) sowie die Analyse der Proliferation von hPASMC nach akuter und chronischer Rauchexposition aufbauend auf den Resultaten in Lungenhomogenaten von Nichtrauchern, Rauchern und COPD
- C) Die Untersuchung der Effekte von humanen mikrovaskulären EC auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC nach Rauchexposition
- D) Die Untersuchung der Funktion der jeweiligen Gene in hPASMC in Bezug auf Gefäßumbau mit Hilfe von *Knockdown*-Experimenten

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
CFX Connect Real-time System	Bio-Rad Laboratories, Hercules/ Kalifornien, USA
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories, Hercules/ Kalifornien, USA
ChemiDoc™ XRS Molecular Imager	Bio-Rad Laboratories, Hercules/ Kalifornien, USA
Elektrophoresis Power Supply E835	Consort BVBA, Turnhout, Belgien
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoreseeinrichtung	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
Mini-Proteom® Tetra Cell	USA
Homogenisator Precellys® 24	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
Inkubator HERAccl 150	Thermo Fisher Scientific Waltham/Massachusetts, USA
Mikroskop DMLA (Histo)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetrührer RCT <i>basic</i> mit Heizung	IKA, Staufen, Deutschland
<i>Microplate Reader</i> Infinite M200	Tecan Group, Männedorf, Schweiz
Mikroskop DMIL (Zellkultur)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrozentrifuge <i>Micro</i> 200R	Andreas Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Mini <i>Shaker</i> MS2	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
pH-Meter 766 <i>Climatic</i>	Knick, Berlin, Deutschland
PX1 PCR <i>Plate Sealer</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
Roller Mixer SRT6D	Cole-Parmer, Vernon Hills/Illinois, USA
Rotationsmikrotom RM2165	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Material und Methoden

Spektrophotometer Qiaxpert	Qiagen, Venlo, Niederlande
<i>Sprout Mini Centrifuge</i> HS120301	Heathrow Scientific, Vernon Hills/Illinois, USA
<i>TGX Stain-Free FastCast™ Acrylamide Kits</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules/ Kalifornien, USA
Thermocycler Tperso	Biometra, Göttingen, Deutschland
Transfer-Apparatur	von Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Waage AB-104-S	Mettler Toledo, Columbus/Ohio, USA
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wippschüttler WS 10	Edmund Bühler, Bodelshausen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
2-Propanol (C ₃ H ₈ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
<i>Agarose for DNA electrophoresis</i>	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
<i>Bovine serum albumine (BSA), protease-free</i>	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland
CAT Hämatoxylin	Biocare Medical, Pacheco/Kalifornien, USA
Diva Decloaker, 10x	Biocare Medical, Pacheco/Kalifornien, USA
DNase/RNase freies Wasser	Thermo Fisher Scientific (Gibco) Waltham/Massachusetts, USA
Doppeldestilliertes Wasser (ddH ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)</i>	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Eosin	Thermo Fisher Scientific,

Material und Methoden

Ethanol (EtOH) (C ₂ H ₆ O) 70%ig	Waltham/ Massachusetts, USA SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, Deutschland
Ethanol (EtOH) (C ₂ H ₆ O) 96%ig	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol (EtOH) (C ₂ H ₆ O) absolut	Otto Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Ethanol (EtOH) (C ₂ H ₆ O) für Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoro <i>Care Anti-Fade Mountant</i>	Biocare Medical, Pacheco/Kalifornien, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun, <i>acidic</i>	Waldeck, Münster, Deutschland
Hepes (2-4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazenyl-ethansulfonsäure)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
iTaq Universal SYBR [®] <i>Green</i> Supermix	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laemmli-Proben Puffer (4x)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
<i>Lipofectamine</i> 3000	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Milchpulver, fettarm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol (CH ₃ OH)	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Methyl <i>Green</i>	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Merck Schuchardt, München, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normales Pferdeserum 2,5%ig	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien, USA
Normocin [™]	InvivoGen, San Diego/Kalifornien, USA
Pertex	MEDITE Medical, Burgdorf, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA

Material und Methoden

RLT Lysis Puffer	Qiagen, Venlo, Niederlande
Salzsäure (HCl), 37%ig	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR® <i>Safe</i> DNA <i>Gel Stain</i> 10000x	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham/Massachusetts, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
TRIS-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Wash Buffer (TBS) (20x)	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Triton®-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Trypsin/EDTA (1x)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30%ig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellyse-Puffer	Cell Signaling Technology, Danvers/Colorado, USA
β-Mercaptoethanol (MeEtOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Artikel

100er Petrischale
60er Zellkulturschale
35er Zellkulturschale
6-Well Zellkulturplatte
12-Well Zellkulturplatte
24-Well Zellkulturplatte
96-Well Mikrottestplatte
96-Well PCR-Platte (*Hard Shell*)
70 µm Sieb (*Cell Strainer*)

Hersteller/Firma

BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien,
USA
Becton, Dickinson and Company, Franklin
Lakes/New Jersey, USA

Material und Methoden

Blotting-Papier Whatman	GE Healthcare, Buckinghamshire, England
50 ml Einmalspritze, Original Perfusor® Spritzen	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Keramikkügelchen, 2 ml PRECELLYS Ceramic, Zirconium(IV)-oxid	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Mikrotom-Klingen	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Mörser (Porzellan Reibeschale)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Optik Labor, Bad Homburg, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus GOLD	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
<i>Optically clear heat seal</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules/Kalifornien, USA
8er PCR <i>SoftStrips</i> 0,2 ml	Biozym Scientific, Oldendorf, Deutschland
PVDF <i>Blotting</i> Membran peqGOLD	VWR, Radnor/Pennsylvanien, USA
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S, Porengröße 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.1.4 Enzyme, Marker und Größenstandards

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
6x DNA Ladepuffer (<i>Loading Dye</i>)	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
<i>GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham/Massachusetts, USA
Enzym Proteinase K	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Material und Methoden

2.1.5 Kits und Assays

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Cell Proliferation</i> ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche, Basel, Schweiz
DC™ Protein Assay Kit	Bio-Rad Laboratories, Hercules/ Kalifornien, USA
<i>ImmPRESS Anti-Rabbit Ig</i> (peroxidase) Polymer Detection Kit	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien, USA
R.T.U Vectastain Kit	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien, USA
RNeasy Micro Kit (50)	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Venlo, Niederlande
Vector NovaRED HRP Substrat Kit	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien, USA
Vector VIP HRP Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame/Kalifornien, USA
Warp Red Chromogen Kit	Biocare Medical, Pacheco/Kalifornien, USA
Zytochem Plus AP Polymer System	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland
Zytochem Plus HRP Polymer System	Zytomed Systems, Berlin, Deutschland

2.1.6 Primer

<u>Gen</u>	<u>Primersequenz</u>
GAPDH	F: 5' CCACATCGCTCAGACACCAT 3' R: 5' AAAAGCAGCCCTGGTGACC 3'
PBGD	F: 5' CCCACGCGAATCACTCTCAT 3' R: 5' TGTCTGGTAACGGCAATGCG 3'
B ₂ M	F: 5' GCCGTGTGAACCATGTGACT 3' R: 5' GCAAGCAAGCAGAATTTGGA 3'
ETV4	F: 5' ACAGACGGACTTCGCCTACG 3' R: 5' CATAGCCCATGGCCCCGTC 3'

Material und Methoden

ETV5	F: 5' AACCGGAAGAGGTTGCTCGG 3' R: 5' GACGTATCGCTCTCCAGCCA 3'
SPRY2	F: 5' TGAGGAGATCCGGTTTCCAGC 3' R: 5' GTGGTCACTCCAGCAGGCTTA 3'
SPRY4	F: 5' CAGCCCTGACCACAGGATCTC 3' R: 5' CTGGAGGTCCTGGACTGTACG 3'
SHH	F: 5' TCACCCCAATTACAACCCCG 3' R: 5' GGCCACTGGTTCATCACCGA 3'
FGF1	F: 5' GCCGGGCTACTCTGAGAAGAA 3' R: 5' CTGCTTGTGCGCTTTCAAGA 3'
FGF2	F: 5' ACTGCAAAAACGGGGGCTTC 3' R: 5' GGTAACGGTTAGCACACTCC 3'
FGF7	F: 5' CTGTGGAACACAGTGGTACCTGA 3' R: 5' TTCCACCCCTTTGATTGCCAC 3'
FGF9	F: 5' TCAGGCGGAGGCAGCTATAC 3' R: 5' CTGACCAGGCCCACTGCTAT 3'
FGF10	F: 5' AGAAGAACGGGAAGGTCAGCG 3' R: 5' ATGGCTTTGACGGCAACAAC 3'
FGFR1	F: 5' GGGCAGTGACACCTACTT 3' R: 5' TGGAGCTACGGGGTTTGGTTT 3'
FGFR2	F: 5' CCCTGCGGAGACAGGTAACA 3' R: 5' GGGGTGTCTGCCGTTGAAGA 3'
PTCH1	F: 5' CATATTTGGGGCCTTCGCGG 3' R: 5' GCCTCTTCTCCAATCTTCTGGC 3'
PTCH2	F: 5' TCCTCCATGGACTCGTGCTG 3' R: 5' AGAGGCTAGATCTCCTCGGGC 3'
SMO	F: 5' GTCATCGTGGGAGGCTACT 3' R: 5' CGCAGCATGGTCTCGTTGAT 3'
GLI1	F: 5' GGACCGCGCATCCCGA 3' R: 5' GGGCTCGCCATAGCTACTGAT 3'
GLI2	F: 5' CCCTGTCGCCATTCACAAGC 3' R: 5' CCACATGAGCCGTGTCCAGA 3'
HHIP	F: 5' TCCAGGCTCTGTCGAAACGG 3' R: 5' TGACGACATGCTGGCTCACA 3'
DISP1	F: 5'CGCCTGCCAACTCATTGCTT 3' R: 5' CCATTGCTCATAGCCATGCTCC 3'
KI67	F: 5' GCAAGCACTTTGGAGAGCAA 3' R: 5' TCTTGACACACACATTGTCCTCAT 3'
CCND1	F: 5' TGCCAACCTCCTCAACGAC 3' R: 5' TCGCAGACCTCCAGCATC 3'
PCNA	F: 5' CCTGTGCAAAAAGACGGAGTG 3' R: 5' TGAAGTGGTTCATTCATCTCTATGG 3'

2.1.7 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Produktnr.</u>	<u>Verd.</u>	<u>Firma</u>
AKT	9272S	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers/Colorado, USA
β-AKTIN	A2281	1:50000	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Bek (<i>fibroblast growth factor receptor 2, FGFR2</i>)	sc-6930	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/Texas, USA
CCND1	ab134175	1:20000	Abcam, Cambridge, England
ETV5	ab102010	1:1000 1:50 (IHC)	Abcam, Cambridge, England
GAPDH	631402	1:1000	BioLegend, San Diego/Kalifornien, USA
GLI1	AF3455	1:200 (IF)	R&D Systems, Minneapolis/Minnesota, USA
PTCH1	MAB41051	1:500 1:50 (IHC)	R&D Systems, Minneapolis/Minnesota, USA
PTCH2	MAB4078-SP	1:500	R&D Systems, Minneapolis/Minnesota, USA
p44/42 MAPK (ERK1/2)	1979G	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers/Colorado, USA
p-p44/42 MAPK (pERK1/2)	197G2	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers/Colorado, USA
p-AKT	4058	1:1000	Cell Signaling Technology, Danvers/Colorado, USA
PCNA	sc-7907	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas/Texas, USA
SMO	GTX60154	1:300 (IHC)	GeneTex Biotechnology, Irvine/Kalifornien, USA
SHH	s2207	1:500	Abcam, Cambridge, England

Material und Methoden

SPRY2	D3G1A	1:500	R&D Systems, Minneapolis/Minnesota, USA
vWF	A0082	1:2000 (IHC)	Agilent (Dako), Santa Clara/Kalifornien, USA
α -SMA	A2547	1:700 (IHC) 1:200 (IF)	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA

2.1.8 SiRNAs

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
siRandom	Eurogentec, Lüttich, Belgien
siEtv5, <i>siGENOME human Etv5 siRNA SMARTpool</i>	Horizon Discovery, Cambridge, England
siSpry2, <i>siGENOME human Spry2 siRNA SMARTpool</i>	Horizon Discovery, Cambridge, England
siShh, <i>siGENOME human Shh siRNA SMARTpool</i>	Horizon Discovery, Cambridge, England

2.1.9 Puffer und Lösungen

<u>Puffer</u>	<u>Substanzen</u>	<u>Menge</u>
1%ige BSA-Lösung (IHC)	PBS, 1x	100 ml
	BSA	1 g
	NaN ₃	0,013 g
10%ige BSA-Lösung (IHC)	PBS, 1x	100 ml
	BSA	10 g
	NaN ₃	0,013 g
5%ige BSA-Lösung (WB)	TBST, 1x	100 ml
	BSA	5 g
PBS-Puffer, 10x (IHC)	NaCL	160 g
	KCL	4 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O ₂	23 g
	KH ₂ PO ₄	4 g
	dH ₂ O	1 l
PBS-Puffer, 1x (IHC)	PBS, 10x	100 ml
	dH ₂ O, pH 7,4	900 ml
Blocking-Puffer (6%ig) (WB)	TBST, 1x	100 ml
	Magermilchpulver	6 g

Material und Methoden

Blocking-Puffer (1%ig) (IF)	PBS, 1x	60 ml
	Normales Pferdeserum, 2,5%ig	40 ml
Inkubationspuffer	PBS, 1x	57 ml
	BSA	1 g
	Triton-X-100	300 µl
	Normales Pferdeserum, 2,5%ig	40 ml
	Natriumazid	10 µl
Laufpuffer (Laemmli-Puffer), 10x	TRIS-Base	60,56 g
	Glycin	288 g
	SDS	20 g
	dH ₂ O	2000 ml
RLT-Puffer	RLT-Puffer	1 ml
	β-MeEtOH	10 µl
Stripping-Lösung	Aqua dest.	90 ml
	Glycin	10 ml (7,5 g/ 100 ml Aqua dest.)
	HCL, 37%ig	2 ml
TAE-Puffer, 50x	TRIS-Base	121 g
	Essigsäure	28,6 ml
	EDTA-Lösung	50 ml
	dH ₂ O, pH 8,0	500 ml
TBS-Puffer, 10x, pH 7,5	TRIS-Base	24,23 g
	NaCl	87,66 g
	dH ₂ O	1000 ml
Transfer-Puffer (Semi-dry)	TRIS-Base	11,6 g
	Glycin	5,8 g
	SDS, 0,37%ig	3,7 ml
	Methanol	400 ml
	dH ₂ O	1596,3 ml
Wet-Transfer-Puffer, 10x	TRIS-Base	24,2 g
	Glycin	112 g
	dH ₂ O	1 l
Wet-Transfer-Puffer, 1x	Wet-Transfer-Puffer, 10x	100 ml
	Methanol	200 ml
	dH ₂ O	700 ml
Zelllyse-Puffer, 1x	10x Zelllyse-Puffer	100 µl
	Phenylmethylsulfonylfluorid	1 µl
	dH ₂ O	900 µl

Material und Methoden

2.1.10 Medien und Seren

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
<i>Endothelial Cell Growth Medium MV Supplement Mix</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Fetales bovines Serum (<i>Fetal Bovine Serum</i>)	Sigma-Aldrich, St. Louis/Missouri, USA
Opti-MEM® Medium	Thermo Fisher Scientific (Gibco), Waltham/Massachusetts, USA
<i>Smooth Muscle Cell Basal Medium</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Mix</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA 10x	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.10.1 Medienzusammensetzung

<u>Puffer/Medium</u>	<u>Substanz</u>	<u>Menge</u>
SMC-Medium	<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	500 ml
	<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 Supplement Mix</i>	1 Mix
	Normocin	1 ml
EC-Medium	<i>Endothelial Cell Growth Medium MV</i>	500 ml
	<i>Endothelial Cell Growth Medium Supplement Mix</i>	1 Mix
Trypsin (1x)	Trypsin (10x)	12 ml
	Hepes Ringer Lösung (0,2 M)	12 ml
	0,9%iges NaCl	96 ml

2.1.11 Zellen

<u>Name</u>	<u>Hersteller</u>
Humane PASM (hPASM)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (hEC)	PromoCell, Heidelberg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl und Charakterisierung humaner Proben

Die Bewilligung der Verwendung der Proben der UGMLC *Biobank* erfolgte durch die Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität (Aktenzeichen 58/15). Das humane Material (Lungengewebe und Paraffinblöcke) stammte von COPD-Patienten mit GOLD IV Stadium, die einer Lungentransplantation unterzogen wurden und zum Zeitpunkt der Probeentnahme nicht mehr geraucht haben (Tab. 3). Als Kontrollen dienten Spenderlungen, bei denen meist Entzündungsbereiche oder Zeichen eines Emphysems vorzufinden waren. Dabei kann es sich um altersbedingte Veränderungen handeln, die von der eigentlichen COPD-Erkrankung abzugrenzen sind. Die Spenderlungen sowie die COPD-Lungen wurden zunächst anhand des Alters, des Geschlechts, des Rauchstatus, der Diagnose sowie des pathologischen Befundes selektiert (Tab. 3) und anschließend histologisch auf das Vorliegen der pulmonalvaskulären Veränderungen und des Emphysems untersucht (Abb. 4). Die Spenderlungen wurden in Nichtraucher (NR) und aktuelle Raucher (R) unterteilt. Die NR-Gruppe besteht aus 15 Frauen (durchschnittliches Alter $53,7 \pm 14,5$) und 13 Männern (durchschnittliches Alter $51,0 \pm 7,7$), die R-Gruppe aus 3 Frauen (durchschnittliches Alter $43 \pm 13,1$) und 6 Männern (durchschnittliches Alter $48,0 \pm 11,4$) und die COPD-Gruppe aus 13 Frauen (durchschnittliches Alter $54,0 \pm 4,4$) und 12 Männern (durchschnittliches Alter $55,8 \pm 5,6$). Bei der Auswahl der Spenderlungen und COPD-Lungen wurden die Proben mit sekundären oder anderen Erkrankungen nicht berücksichtigt.

Material und Methoden

Tabelle 3: Charakteristika von Spendern und COPD-Patienten

NR: Nichtraucher, R: Raucher.

Patient	Alter	Geschlecht	COPD
1 COPD	55	weiblich	Ja
2 COPD	59	weiblich	Ja
3 COPD	48	weiblich	Ja
4 COPD	52	weiblich	Ja
5 COPD	59	weiblich	Ja
6 COPD	59	männlich	Ja
7 COPD	57	männlich	Ja
8 COPD	65	männlich	Ja
9 COPD	59	männlich	Ja
10 COPD	53	männlich	Ja
11 COPD	56	männlich	Ja
12 COPD	55	weiblich	Ja
13 COPD	58	männlich	Ja
14 COPD	56	weiblich	Ja
15 COPD	50	weiblich	Ja
16 COPD	45	männlich	ja
17 COPD	55	männlich	ja
18 COPD	57	männlich	ja
19 COPD	58	weiblich	ja
20 COPD	49	weiblich	ja
21 COPD	61	männlich	ja
22 COPD	51	weiblich	ja
23 COPD	61	weiblich	ja
24 COPD	49	weiblich	ja
25 COPD	45	männlich	ja
1 R	34	weiblich	nein
2 R	37	weiblich	nein
3 R	58	weiblich	nein
4 R	31	männlich	nein
5 R	47	männlich	nein
6 R	52	männlich	nein
7 R	59	männlich	nein

Patient	Alter	Geschlecht	COPD
8 R	60	männlich	nein
9 R	39	männlich	nein
1 NR	54	männlich	nein
2 NR	56	männlich	nein
3 NR	57	männlich	nein
4 NR	50	weiblich	nein
5 NR	21	weiblich	nein
6 NR	51	weiblich	nein
7 NR	51	weiblich	nein
8 NR	56	weiblich	nein
9 NR	14	weiblich	nein
10 NR	44	männlich	nein
11 NR	44	männlich	nein
12 NR	52	männlich	nein
13 NR	54	männlich	nein
14 NR	56	männlich	nein
15 NR	57	männlich	nein
16 NR	49	männlich	nein
17 NR	76	weiblich	nein
18 NR	53	weiblich	nein
19 NR	72	weiblich	nein
20 NR	60	weiblich	nein
21 NR	76	weiblich	nein
22 NR	44	weiblich	nein
23 NR	54	männlich	nein
24 NR	54	weiblich	nein
25 NR	56	männlich	nein
26 NR	37	weiblich	nein
27 NR	30	männlich	nein
28 NR	46	weiblich	nein
29 NR	58	weiblich	nein

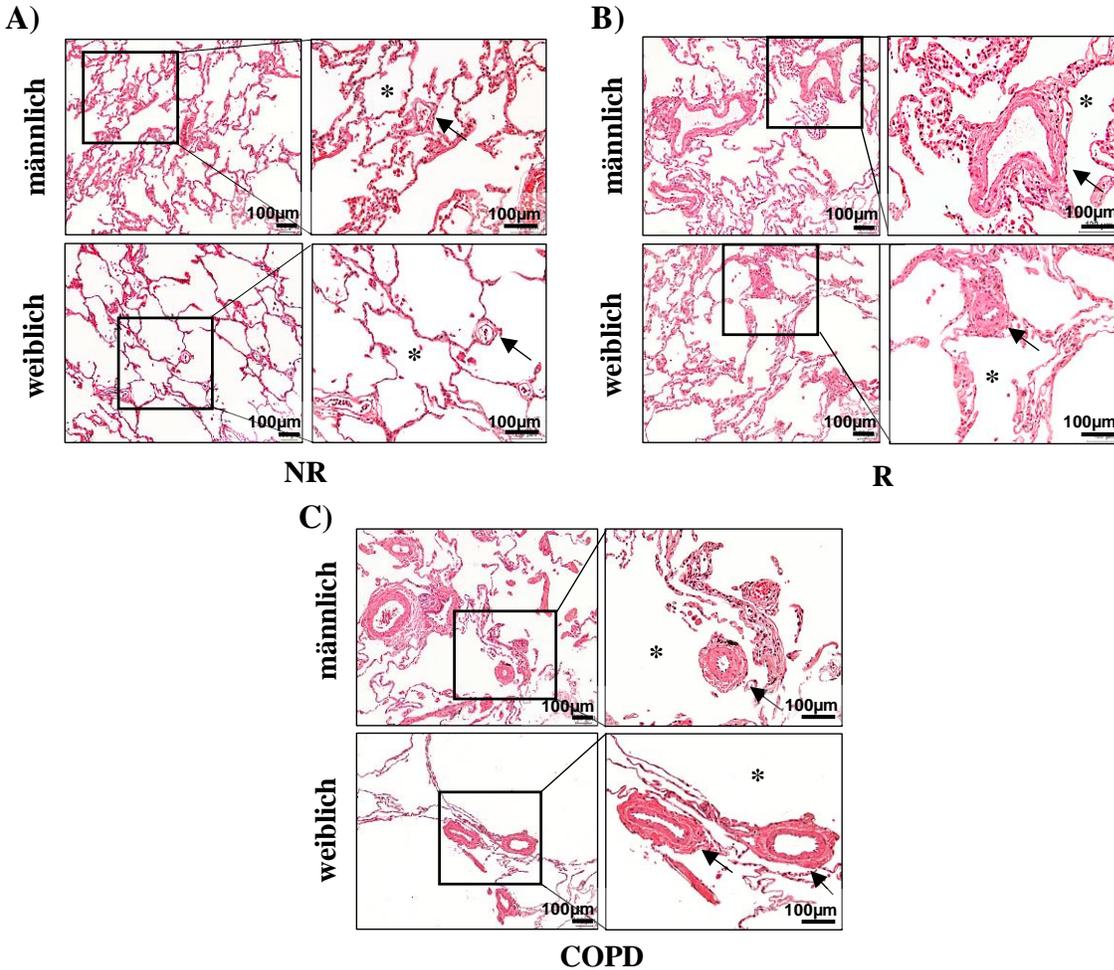


Abbildung 4: Repräsentative Bilder der Lungenschnitte von Nichtrauchern, Rauchern und COPD-Patienten.

Repräsentative Bilder von Hämatoxylin (Zellkerne, blau) -Eosin (Zytoplasma, rosa) gefärbten Lungenschnitte von **A)** NR, **B)** R und **C)** COPD-Patienten. 100x (Bilder links) und 200x Vergrößerung (Bilder rechts). Die Strukturen wurden folgendermaßen gekennzeichnet: →: pulmonales Gefäß, *: Alveole. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

2.2.2 Auswahl der spezifischen Gene und Primer-Design

Die Sequenzen der zu untersuchenden Gene wurden aus der *Nucleotide Database* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) bezogen. Basierend auf diesen Daten wurden die Primer mittels *Primer-BLAST-Tool* Intron-überspannend konstruiert. Der Schmelzpunkt aller konstruierten Primer lag zwischen 61 und 63°C und die Produktgröße lag zwischen 100 bis 150 bp. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM

verwendet. Die Spezifität der Primer wurde mittels RTqPCR (Analyse der Schmelzkurve sowie Ct- (*cycle threshold*) Werte) und PCR (Analyse der Produktgröße) überprüft.

Zur Überprüfung der Größe der amplifizierten PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Dazu wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel aus Agarose und 1x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer hergestellt und mit 1x *SYBR*[®] *Safe DNA Gel Stain* versetzt. Anschließend wurden 5 bis 10 µl des PCR-Produkts mit *Loading Dye* versetzt und auf das Gel geladen. Der *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* wurde als Marker verwendet. Das Gel wurde mit TAE-Puffer bedeckt und die Gelelektrophorese gestartet (120 V, 120 mA, 100 W, ca. 35 Min.). Die Banden wurden unter UV-Licht bei 320 nm mit einem *Molecular Imager* visualisiert.

2.2.3 RNA-Isolation aus Gewebe und Zellen

Das Isolieren der RNA aus humanem Lungengewebe sowie hPASCs wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Vorbereitend wurde das gefrorene Lungengewebe mit Hilfe eines Mörsers in kleine Stücke von maximal 30 mg zerkleinert, in ein Homogenisierungsgefäß transferiert und mit Hilfe von Keramikkügelchen in RLT-Puffer homogenisiert (30 Sek., 6800 RCF). Um Zelltrümmer und Gewebereste von den löslichen Bestandteilen zu trennen, folgte ein Zentrifugationsschritt (5 Min., 18000 RCF, 4°C). Der Überstand wurde mit 70%igem EtOH versetzt, auf eine RNeasy Spin-Säule mit Silicagel-Membran überführt und zentrifugiert (15 Sek., 8000 RCF). Bei der Isolierung von RNA aus hPASCs wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem DPBS gewaschen, in RLT-Puffer lysiert und anschließend ebenfalls in 70%igem EtOH präzipitiert. Anschließend wurde die RNA aus dem homogenisierten Lungengewebe und den hPASCs mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* laut Herstellerprotokoll isoliert. Die Silicagel-Membran wurde mit einem RW1-Puffer gewaschen, zentrifugiert (15 Sek., 8000 RCF), im RPE-Waschpuffer gespült und zentrifugiert (15 Sek., 8000 RCF). Die Silicagel-Säule wurde mittels Zentrifugation (60 Sek., 18000 RCF) getrocknet und RNA in RNase-freiem Wasser (60 Sek., 8000 RCF) eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration mit Hilfe eines Spektrophotometers bei 260 nm und 280 nm gemessen.

2.2.4 Quantitative Echtzeit-PCR (RTqPCR)

Die RNA wurde in cDNA durch die reverse Transkription mit dem *iScript cDNA Synthesis* Kit laut Herstellerangaben umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte in einem Thermocycler unter Verwendung des folgenden Programms (Tabelle 4).

Tabelle 4: Programm für die cDNA-Synthese

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>
Primer-Annealing	25°C	5 Min.
Reverse Transkription	46°C	20 Min.
Reverse-Transkriptase-Inaktivierung	95°C	60 Sek.
Abkühlen	4°C	

Die cDNA wurde mit Wasser verdünnt (200 bis 800 ng/μl cDNA), mit 1x *iTaq™ Syber® Green I Supermix*, den Primern (0,5 μM) versetzt und auf eine 96-Well PCR-Platte pipettiert. Die PCR-Platte wurde versiegelt und zentrifugiert. Für die quantitative RTqPCR wurde folgendes Programm verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Programm für die RTqPCR

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Dauer</u>	<u>Zyklen</u>
Denaturierung/Enzymaktivierung	95°C	3 Min.	} 45x
Denaturierung	95°C	5 Sek.	
Primer-Annealing	59°C	10 Sek.	
Elongation	72°C	10 Sek.	
Denaturierung	95°C	30 Sek.	
Schmelzkurve	65°C→95°C		

Für die Normalisierung des Ct-Wertes im Lungengewebe wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzgen verwendet, in hPASCs wurden entweder Porphobilinogen deaminase (PBGD) oder β2 Mikroglobulin (B₂M) als Referenzgene verwendet. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der ΔCt-Methode ausgewertet (ΔCt=Ct (Referenzgen) – Ct (Zielgen)) und dargestellt.

2.2.5 Proteinextraktion

Für die Isolierung von Proteinen wurden 20 mg humanes Lungengewebe in 150 µl eiskaltem 1x Zellyse-Puffer mit Hilfe von Keramikkügelchen homogenisiert (30 Sek., 6800 RCF). Um Gewebereste zu entfernen, wurden die Proben anschließend zentrifugiert (10 Min., 18000 RCF, 4°C).

Um Proteine aus hPASCs zu isolieren, wurden diese mit eiskaltem DPBS gewaschen, in Zellyse-Puffer lysiert und zentrifugiert (5 Min., 18000 RCF, 4°C).

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde das *DC™ Protein Assay Kit* laut Herstellerangaben verwendet. Als Protein-Standard wurde die BSA-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen (0 bis 2,056 µg/µl) benutzt. Die Proben und die Proteinstandardreihe wurden in 96-Well PCR-Platten pipettiert, mit den Reagenzien A und S vermischt und mit der Reagenz B versetzt. Die Absorption wurde bei 750 nm in einem *Microplate Reader* gemessen und die Proteinkonzentration berechnet.

2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

Um Proteinexpressionen zu untersuchen, wurden die Proteine ihrer Größe nach in einer Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) -Page aufgetrennt und mittels Western Blot visualisiert.

Für die SDS-PAGE wurde das *TGX Stain-Free Fascast™ Kit Acrylamide Gel Kit* gemäß Herstellerangaben verwendet. Für die Herstellung des Trenngels (10 oder 12%ige Gele) wurden die Lösungen *Resolver A* und *Resolver B* und für das Sammelgel die Lösungen *Stacker A* und *Stacker B* vermischt. Um die Polymerisierung der Gele zu ermöglichen, wurde kurz vor dem Gießen Ammoniumpersulfat und Tetramethylethylendiamin hinzugefügt. Anschließend wurde das Trenngel gefolgt von dem Sammelgel in die vorbereitete Apparatur gegossen. Die Proben wurden mit 4x NuPage, Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Ladepuffer und 2,6 µl β-MeEtOH versetzt. Die Proteine wurden anschließend denaturiert (99°C, 5 bis 10 Min.). Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis wurden diese zentrifugiert und in die Geltaschen geladen (20 bis 100 µg). Als Marker wurden 5 µl Proteinstandard geladen und die Proteine in dem Laufpuffer aufgetrennt (120 V, 400 mA und 150 W, ca. 2 Std.). Nach

der Auftrennung wurde ein Semi-Dry Blot durchgeführt. Dazu wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 110 V, 115 mA, und 150 W für 60 Min. und 15 Min..

Die PVDF-Membran wurde in 6%igem Milchpuffer (60 Min.) geblockt und anschließend über Nacht (4°C) mit einem primären Antikörper inkubiert. Danach wurde diese mehrfach (je 10 Min.) in 1x TBS-Puffer gewaschen und in einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert (60 Min., Raumtemperatur). Die Proteinbanden wurden mit Hilfe des *Clarity ECL-Substrate* nach Herstellerangaben visualisiert. Dazu wurde eine Peroxidase-Lösung mit einer Luminol-Lösung vermischt und die PVDF-Membran inkubiert. Das Luminiszenzsignal wurde mit Hilfe eines *Molecular Imager* visualisiert. Zur Detektion eines weiteren Proteins wurde die PVDF-Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert. Dazu wurde diese zunächst im *Stripping*-Puffer (60 Min.) inkubiert.

2.2.7 Histologische Färbetechniken

In dieser Arbeit wurden die Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung) als Übersichtsfärbung und die immunhistologische Färbung zur Unterscheidung verschiedener Strukturen verwendet.

2.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurde an Schnitten formalinfixierter und in Paraffin eingebetteter humaner Lungengewebe durchgeführt. Die 3 µm dicke Lungengewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Mikrotoms angefertigt. Die Schnitte wurden zuerst im Heißwasserbad (ca. 40°C) auf einen Objektträger transferiert. Anschließend wurden sie getrocknet (37°C, über Nacht) und entparaffiniert (58°C, 60 Min.). Die Rückstände des Paraffins wurden durch das Spülen mit Xylol (3 Mal, 10 Min.) entfernt und in einer absteigenden Alkoholreihe (99,6%iges, 96%iges, 70%iges EtOH) rehydriert. Nachdem die Schnitte in destilliertem Wasser gespült wurden, folgte die Inkubation in 1x Hämalaun nach Mayer (Waldeck) (20 Min.), wodurch alle basophilen Strukturen blau gefärbt wurden. Die Präparate wurden zunächst unter fließendem Wasser (5 Min.), dann in 96%igem EtOH (60 Sek.) gespült und anschließend in Eosin-Lösung (4 Min.) gefärbt, wodurch alle basischen Strukturen rot wurden. Es folgte ein Dehydrierungsschritt in einer aufsteigenden Alkoholreihe (96%iges

und 99,6%iges EtOH, 99,8%iges Isopropylalkohol). Nach mehrmaligem Spülen der Schnitte in Xylol wurden diese mit Pertex eingedeckt. Die Schnitte wurden mikroskopisch unter 200x und 400x Vergrößerung analysiert und es wurden repräsentative Bilder angefertigt.

2.2.7.2 Immunhistochemie

Die Methode der immunhistochemischen Färbung dient der Lokalisation von Zielproteinen in Gewebeschnitten. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Präparate erfolgte wie im vorherigen Abschnitt beschrieben. Um die Antigene für den Antikörper zugänglich zu machen, wurden die Gewebeschnitte in 1x *Diva Decloaker* Puffer (20 Min.) aufgekocht. Nach dem Spülen der Gewebe in destilliertem Wasser wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch Inkubation in einer 30%igen H₂O₂-Methanol-Lösung (20 Min.) blockiert. Anschließend wurden die Schnitte zwei Mal in destilliertem Wasser (5 Min.) und danach drei Mal in 1x PBS (5 Min.) gewaschen. Der Verdau mit Enzym Proteinase K wurde in einer feuchten Kammer (5 Min., Raumtemperatur) durchgeführt. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und mit 10%iger BSA-Lösung (60 Min.) inkubiert. Um die Hintergrundfärbung zu minimieren, wurden die Präparate zunächst in *Blocking Solution* (20 Min.) aus dem *CytoChem Plus (HRP) Polymer System Kit* inkubiert und anschließend mit einem spezifischen Primärantikörper (über Nacht, 4°C) behandelt. Am nächsten Tag wurde der ungebundene Antikörper durch das Waschen mit PBS entfernt (2 Std.) und in *Post Block* Reagenz (30 Min., Raumtemperatur) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte mit HRP-Polymer (30 Min.) behandelt. Durch die Zugabe des *Novared-Substrates* wurde eine Farbreaktion initiiert. Die Präparate wurden dann in Hämatoxylin gegengefärbt, dehydriert und anschließend eingedeckt. Die Gewebeschnitte wurden am Mikroskop unter 200x und 400x Vergrößerung auf die Lokalisation untersucht.

Zur Darstellung der Muskularisierung von humanen Lungengefäßen wurde eine Doppelfärbung mittels *alpha smooth muscle actin* Antikörper (α -SMA, 1:700 in *Antibody Diluent*); und Von-Willebrand-Faktor (vWF, 1:2000 in *Antibody Diluent*) durchgeführt. Nach der Entparaffinierung und Rehydrierung von Gewebe wurde die endogene Peroxidaseaktivität inaktiviert und α SMA mittels *Universal Quick Kit* nach Herstellerangaben gefärbt. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde die Farbreaktion unter Verwendung des *Vector VIP (HRP) Substrate Kits* durchgeführt. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das Gewebe in Leitungswasser und mehrmals in PBS gewaschen. Das

Material und Methoden

Blocken des Gewebes erfolgte durch die Inkubation in 10%iger BSA-Lösung und anschließend in 2,5%igem *Normal Horse Serum*. Zur vWF-Färbung wurde das *ImmPRESS Anti-Rabbit Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit* laut Herstellerangaben verwendet. Die Farbreaktion wurde mit Hilfe des *DAB Peroxidase Substrate Kits* erreicht. Schließlich wurde das Gewebe in Leitungswasser gespült und die Zellkerne mit Methylgrün (4 Min.) auf der Heizplatte (60°C) gefärbt. Das Gewebe wurde in 99,8%igem Isopropylalkohol und Xylol dehydriert und mit Pertex eingedeckt.

Mit Hilfe des vWF-Antikörpers wurde die endotheliale Schicht eines Blutgefäßes braun angefärbt, während die Muskelschicht der Gefäßwand mit dem α -SMA-Antikörper violett angefärbt wurde. Die Analyse und das Fotografieren von gefärbten Gefäßen erfolgte bei einer 200x Vergrößerung.

2.2.7.3 Immunfluoreszenz

Die Methode der Immunfluoreszenz diente dem Nachweis der Co-Lokalisation von Zielproteinen in Gewebeschnitten. Nachdem die Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydriert wurden, wurden diese in PBS (2 x 5 Min.) gewaschen und anschließend mit 1%igem Pferdeserum (30 Min.) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Die Gewebeschnitte wurden dann in PBS gewaschen (4 x 5 Min.) und mit spezifischen Primärantikörper (über Nacht, 4°C) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit den sekundären *donkey-anti-goat* Alexa 488- oder *donkey-anti-mouse* Alexa 594- gekoppelten Antikörpern für 60 Min. im Dunkeln inkubiert. Das Gewebe wurde erneut mit PBS gewaschen (4 x 5 Min.) und mit 1 mg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (4 Min.) gefärbt. Nach einem Waschschrift mit PBS (5 Min.) wurden die Schnitte mit *Fluoro Care Anti-Fade Mountant* eingedeckt. Die gefärbten Gewebeschnitte wurden durch Dr. Monika Brosien am Mikroskop fotografiert.

2.2.8 Zellkultur-Experimente

2.2.8.1 Kultivierung von humanen pulmonalen glatten Muskelzellen (hPASMC) und humanen Endothelzellen (hEC)

Die hPASMC und hEC wurden in den jeweiligen Vollmedien kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 90%. Hierfür wurden die Zellen mit

Material und Methoden

DPBS (gebrauchsfertig) gewaschen und mit 1x Trypsin (60 Sek., 37°C) von der Platte gelöst. Der enzymatische Verdau wurde durch die Gabe von fetalem bovinem Serum gestoppt, anschließend wurden die hPASCs zentrifugiert (5 Min., 338 RCF) und das Zellpellet im SMC-Medium resuspendiert und auf Zellkulturplatten oder -flaschen ausgesät.

2.2.8.2 Akute und chronische Zigarettenrauch-Exposition von hPASCs und hEC

Zur Herstellung des Zigarettenrauchextraktes (*cigarette smoke extract*, CSE) wurde eine Zigarette pro Minute mit Hilfe einer Pumpe abgeraucht und der Zigarettenrauch in 10 ml Medium aufgenommen. Dieses wurde als 100%iges CSE definiert.

Für den CSE-Versuch wurden die hPASCs in der Passage 8 auf 6- oder 24-Well Zellkulturplatten in SMC-Medium zu 80% Konfluenz ausgesät. Etwa 6 Std. nach der Aussaat wurden die hPASCs für 24 Std. im Basalmedium kultiviert (*Starvation*). Danach wurden die hPASCs für weitere 24 Std. in 0%igem, 1%igem und 3%igem CSE kultiviert und die Zellen schließlich für die Protein- oder RNA-Gewinnung lysiert (Abb. 5).

Für die chronische CSE-Exposition wurden die hPASCs nach einer 24 Std.-*Starvation* für 120 Std. mit 0%igem, 0,5%igem und 1%igem CSE inkubiert.

Humane EC wurden für 24 Std. in 0%igem und 3%igem CSE kultiviert. Der hEC-Kulturüberstand wurde abgenommen und die hPASCs für 24 Std. damit stimuliert.

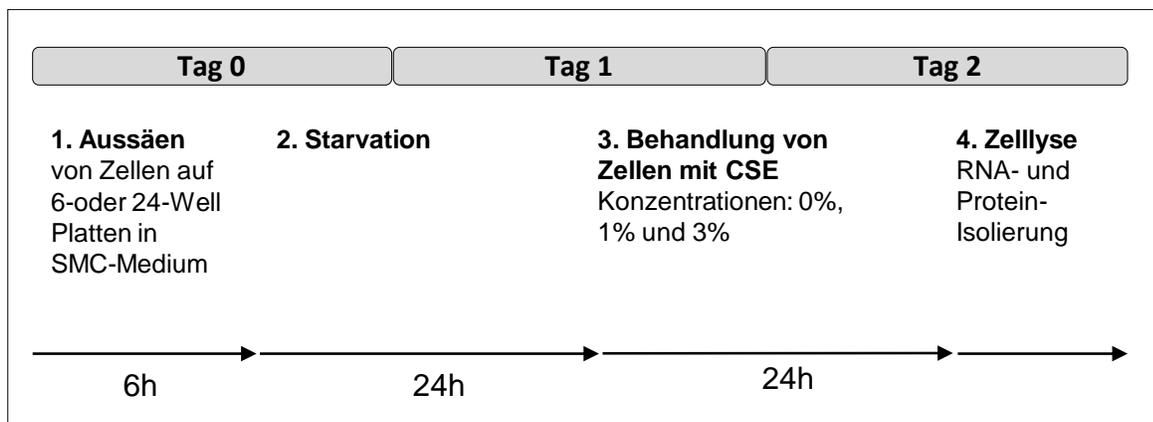


Abbildung 5: Versuchsaufbau einer akuten CSE-Behandlung von hPASCs

Für die akute Stimulation mit CSE wurden die hPASCs auf 6- oder 24-Well Kulturplatten im SMC-Medium ausgesät. Nach 24 Std. *Starvation* wurden die Zellen für 24 Std. mit 0%igem, 1%igem, und 3%igem CSE inkubiert und anschließend für die RNA- und Proteingewinnung lysiert.

2.2.8.3 Transfektion von hPASC

Zur Transfektion der hPASC mit den siRNAs (100nM) wurde Lipofektamin 3000 verwendet. Humane PASCs wurden auf Zellkulturplatten (12- oder 24-Well) im Vollmedium ausgesät und im Basalmedium für 24 Std. kultiviert. Die Transfektion wurde nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt (*Lipofektamin 3000 reagent protocol* von *Invitrogen*). Die hPASC wurden für 48 Std. bei 37°C transfiziert.

2.2.9 Proliferationsassay

Um die Effekte der CSE-Behandlung auf das Proliferationsverhalten von hPASC zu untersuchen, wurde das kolorimetrische *Cell Proliferation ELISA*, Bromdesoxyuridin (BrdU) *Kit* verwendet. Die Färbung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

Die hPASC der Passage 8 wurden auf den 48-Well Kulturplatten (5000 Zellen/cm²) ausgesät und für 24 Std. kultiviert. Die Starvation von hPASC erfolgte für 24 Std. im Basalmedium. Die Zellen wurden dann mit 3%igem CSE und 50%igem hEC-Kulturüberstand nach CSE-Inkubation für 24 Std. oder bei chronischer Rauchexposition mit 0,5%igem bzw. 1%igem CSE für 120 Std. inkubiert. 48 Std. vor dem Ende der chronischen CSE-Inkubation wurden die hPASC ggf. mit siRNAs transfiziert. Alle Medien wurden für 24 Std. mit BrdU versetzt. Die Zellen wurden fixiert und nach Herstellerangaben gefärbt.

Die Platten wurden bei 370 nm und 492 nm (Referenzwellenlänge) am *Microplate Reader* gemessen. Die Analysen wurden durch Dr. M. Brosien durchgeführt und ausgewertet.

2.2.10 Statistische Analyse und Datenverarbeitung

Für die statistische Analyse und die Darstellung der Daten wurde die Software GraphPad Prism 6 verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Unterstützung von Dr. Jochen Wilhelm. Alle Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehlern dargestellt. Abhängig von der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen wurden verschiedene statistische Methoden verwendet. Zum Vergleich der Mittelwerte von drei unabhängigen Gruppen wurde eine *one-way* Anova mit Fischer's LSD Test durchgeführt. Diese statistische Methode wurde bei Proteinanalysen in LH angewendet. Eine *two-way* Anova mit Fischer's LSD Test wurde zum Vergleich von Stichproben von mehr als drei unabhängigen Gruppen herangezogen. Diese Methode wurde z. B. für die statistische Auswertung von qRT-PCR-Ergebnissen in LH

Material und Methoden

eingesetzt. Für die statistische Auswertung von Zellkultur-Experimenten wurde entweder eine *repeated-measures one-way* ANOVA oder *repeated measures two-way* ANOVA mit Fisher`s LSD Test verwendet. Für die statistische Auswertung von Proliferations-Experimenten wurde bei Vergleich von zwei Gruppen ein *paired t test* und bei Vergleich von drei Gruppen eine *repeated-measures one-way* ANOVA mit Fisher`s LSD Test eingesetzt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Als nicht signifikant wurden die Ergebnisse mit dem p-Wert $> 0,05$ gekennzeichnet. Die Anzahl der Proben wurde mit „n“ markiert.

3 Ergebnisse

In den Pulmonalgefäßen von COPD-Patienten finden verstärkt Umbauprozesse statt, die mittels Bestimmung des Muskularisierungsgrades der kleinen Pulmonalgefäße nachgewiesen werden konnten [111]. Die Muskularisierung von kleinen Pulmonalgefäßen in NR, R und COPD ist exemplarisch in Abb. 6 dargestellt.

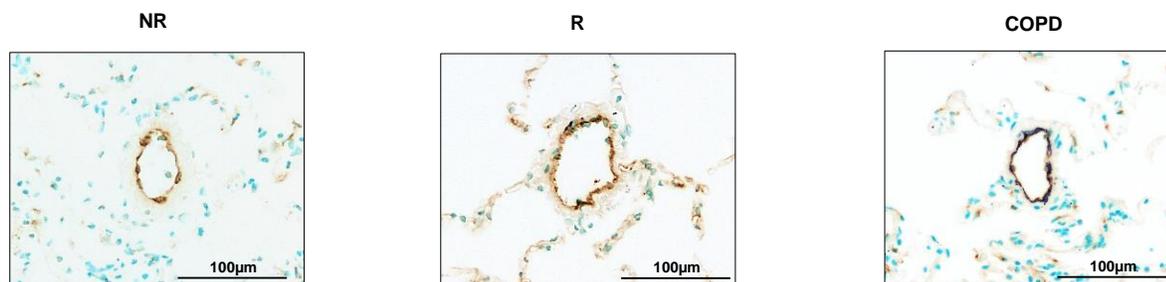


Abbildung 6: Repräsentative Bilder der Muskularisierung von Lungengefäßen von Nichtrauchern, Rauchern und COPD.

Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbung von kleinen Pulmonalgefäßen aus NR, R und COPD. vWF (braun) und α -SMA (violett) bei 200xVergrößerung. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

3.1 Expressionsanalyse von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in den Lungen von COPD-Patienten

In der Studie von *Klar et al.* wurde FGF10 als ein mögliches Kandidatengen in der Pathogenese von COPD identifiziert [112, 113]. Um andere Gene aus der FGF-Familie zu identifizieren, die eine potenzielle Rolle im pulmonalvaskulären Umbau assoziiert mit COPD spielen könnten, wurden verschiedene FGF-Gene in homogenisierten humanen Lungen von NR, R und COPD auf mRNA-Ebene analysiert (Abb. 7 A, B). In den humanen Lungen konnte die mRNA von FGF1, FGF2, FGF7, FGF9 und FGF10 sowie die mRNA von FGFR1 und FGFR2 nachgewiesen werden. In R war die Expression von FGF1, FGF2 und FGF9 signifikant niedriger, während FGF1, FGF9, FGF10 und FGFR2 in Proben von COPD verglichen mit NR signifikant hochreguliert waren. Zusätzlich war die Expression von FGF1, FGF2, FGF7, FGF9 und FGFR2 bei COPD-Patienten verglichen mit R ebenfalls signifikant hochreguliert. Die Expression von FGFR1 zeigte keinen Unterschied zwischen NR, R und COPD-Patienten.

Ergebnisse

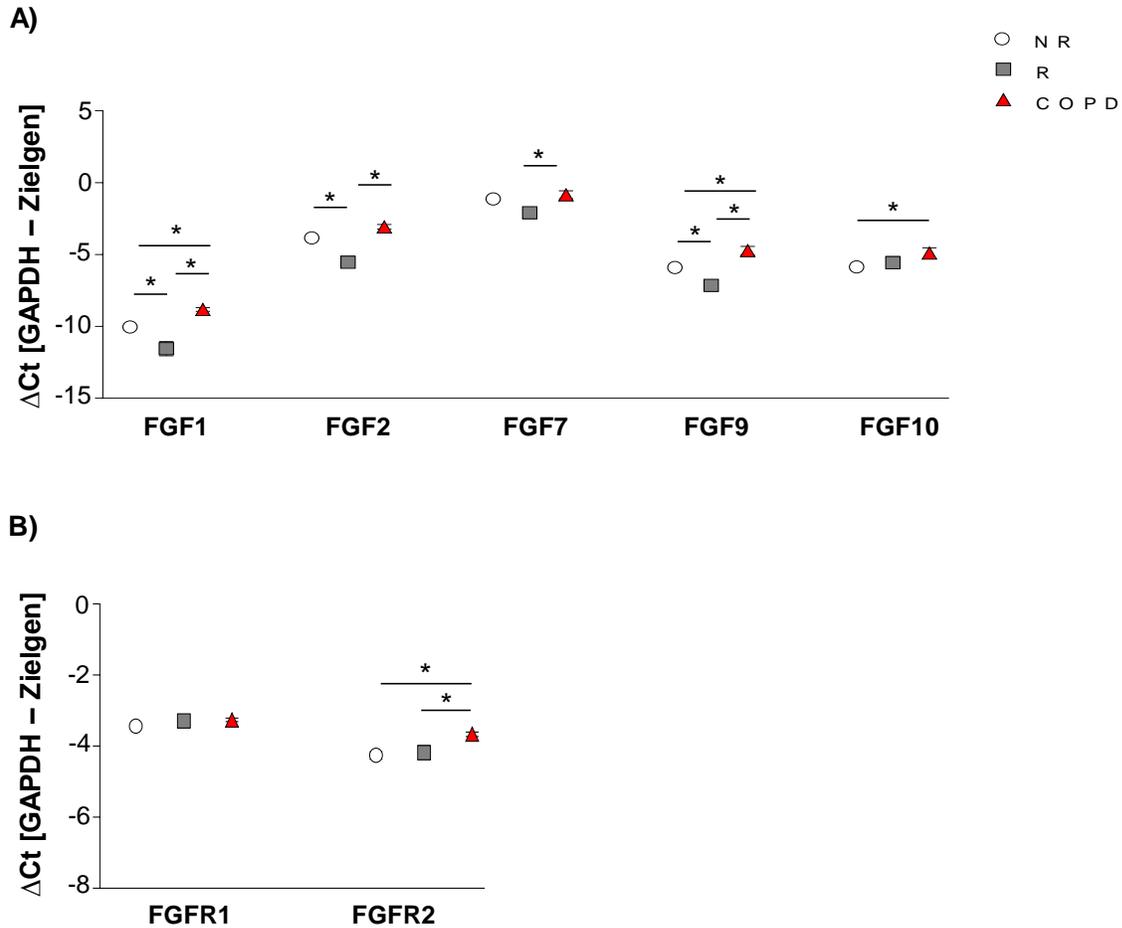


Abbildung 7: Expression von FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren in humanen Lungen.

Relative mRNA-Expression von A) FGF1, FGF2, FGF7, FGF9, FGF10 (n=8-17) und B) FGFR1 und FGFR2 (n=9-19) in homogenisierten humanen Lungen von NR, R und COPD quantifiziert mittels RTqPCR. Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). NR: Nichtraucher, R: Raucher.

In einem nächsten Schritt wurde die mRNA- und Protein-Expression von FGFR2-Signalweg assoziierten Genen im nachgeschalteten Signalweg untersucht. *Ets variant transcription factor 5* (ETV5) war sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in COPD-Lungen im Vergleich zu Lungen von NR und R hochreguliert (Abb. 8 A, B), während die Expression von *sprouty homolog 2* (SPRY2) lediglich auf mRNA-Ebene in COPD-Lungen im Vergleich zu R hochreguliert war (Abb. 8 A, C). Eine Regulation von SPRY4 wurde nicht beobachtet (Abb. 8 A).

Ergebnisse

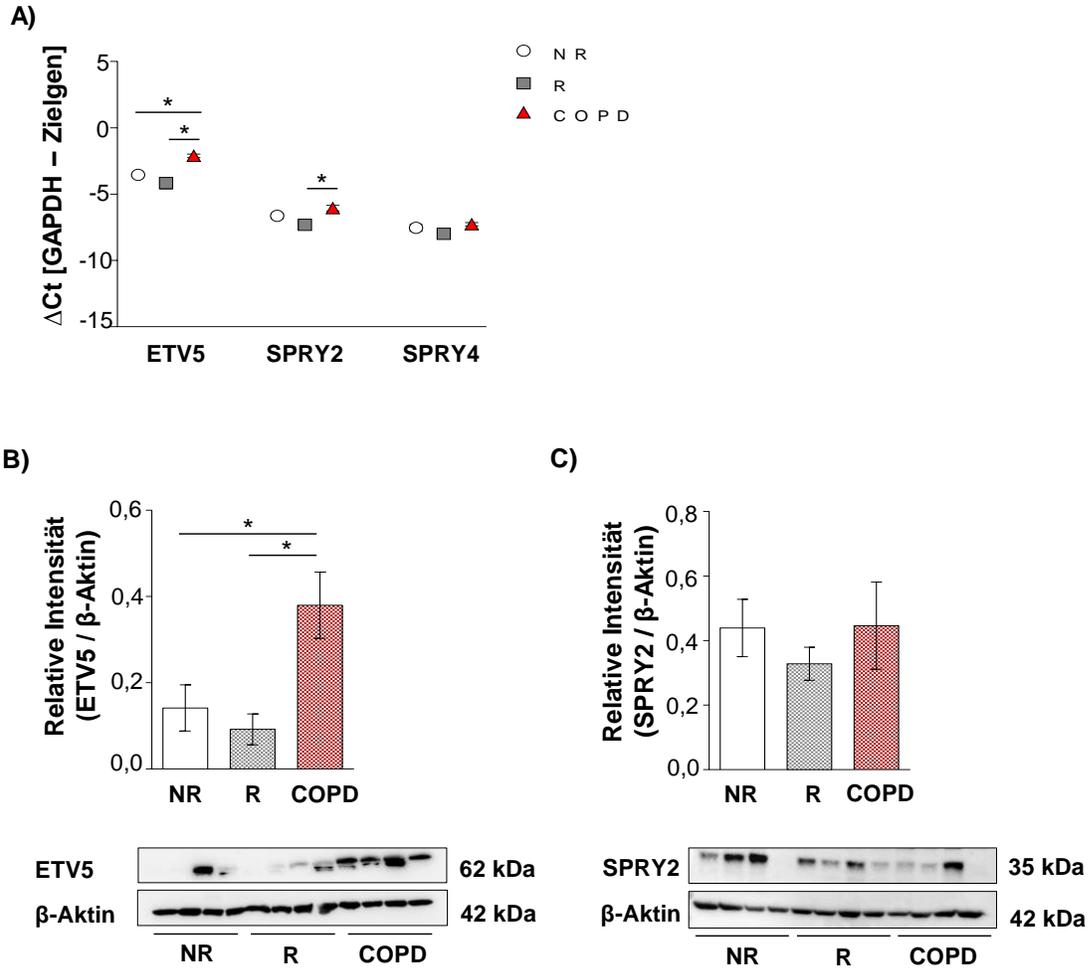


Abbildung 8: Erhöhte mRNA- und Protein Expression von ETV5 in humanen Lungen.

A) Relative mRNA-Expression von ETV5, SPRY2 und SPRY4 in homogenisierten Lungen von NR, R und COPD (n=8-17). Relative Protein-Expression von **B)** ETV5 (n=6) und **C)** SPRY2 (n=8). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). NR: Nichtraucher, R: Raucher.

ETV5 wurde mittels immunhistochemischen Färbungen in den glatten Muskelzellen der Gefäße und Bronchien und in vereinzelt Zellen, insbesondere um die Bronchien und die Gefäße im humanen Lungengewebe, lokalisiert (Abb. 9).

Ergebnisse

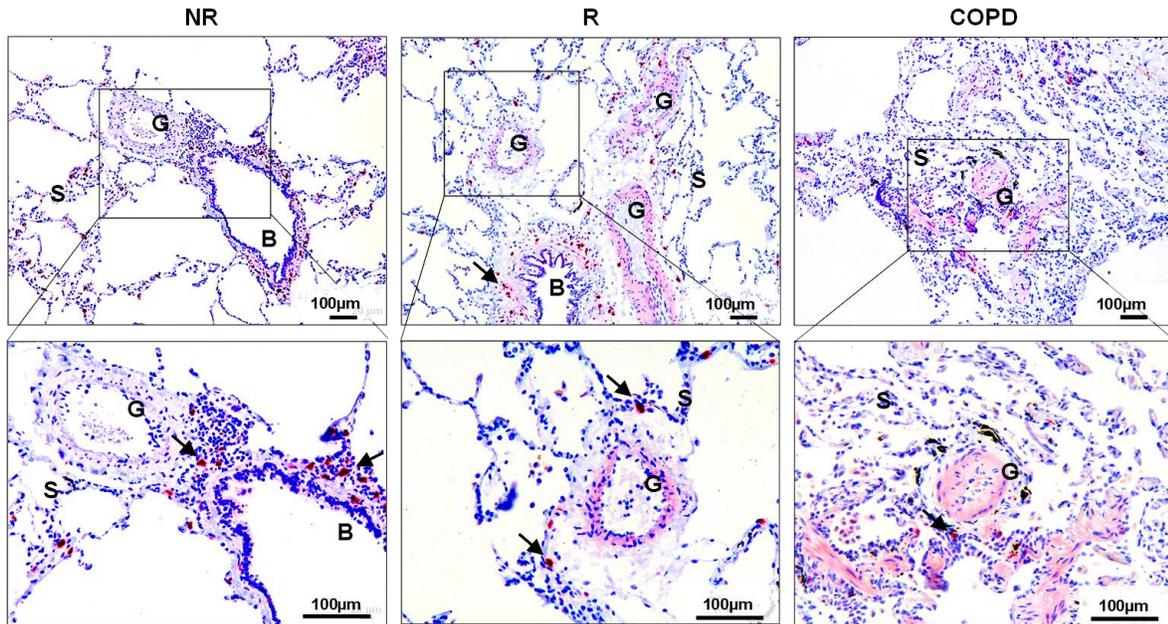


Abbildung 9: Lokalisation von ETV5 im humanen Lungengewebe.

Immunohistochemische Färbung von ETV5 (rosa) in Lungen von NR, R und COPD. 200x (obere Bilder) und 400x Vergrößerung (untere Bilder). G: pulmonales Gefäß, S: Septum, B: Bronchus, NR: Nichtraucher, R: Raucher, Pfeil: ETV5⁺-Zellen.

3.2 Expressionsanalyse von SHH-Signalweg-assoziierten Genen in den Lungen von COPD-Patienten

In der Studie von *Herriges et al.* wurde an einem Mausmodell demonstriert, dass ETV5 die Expression von Sonic Hedgehog (SHH) induzieren kann [114]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mRNA- und Protein-Expression von SHH-Signalweg-assoziierten Genen in Lungenhomogenaten von NR, R und COPD analysiert (Abb. 10). Auf mRNA-Ebene konnte eine signifikante Hochregulation von PTCH1, PTCH2, SMO und DISP1 in COPD im Vergleich zu NR und R gemessen werden (Abb. 10 A). Die mRNA-Expression von SHH war in COPD im Vergleich zu R erhöht und bei R im Vergleich zu NR reduziert. Es wurden keine Unterschiede in der mRNA-Expression von PTCH1, PTCH2, SMO und DISP1 zwischen R und NR nachgewiesen (Abb. 10 A), auf Protein-Ebene hingegen war PTCH2 herunterreguliert (Abb. 10 D). Des Weiteren war die Protein-Expression von SHH bei COPD-Patienten und R im Vergleich zu NR induziert (Abb. 10 B). Die Protein-Expression von SHH-N, welche durch die proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins SHH entsteht,

Ergebnisse

war in COPD im Vergleich zu NR und R reguliert (Abb. 10 C). PTCH1 und SMO wurde auf Protein-Ebene nicht detektiert.

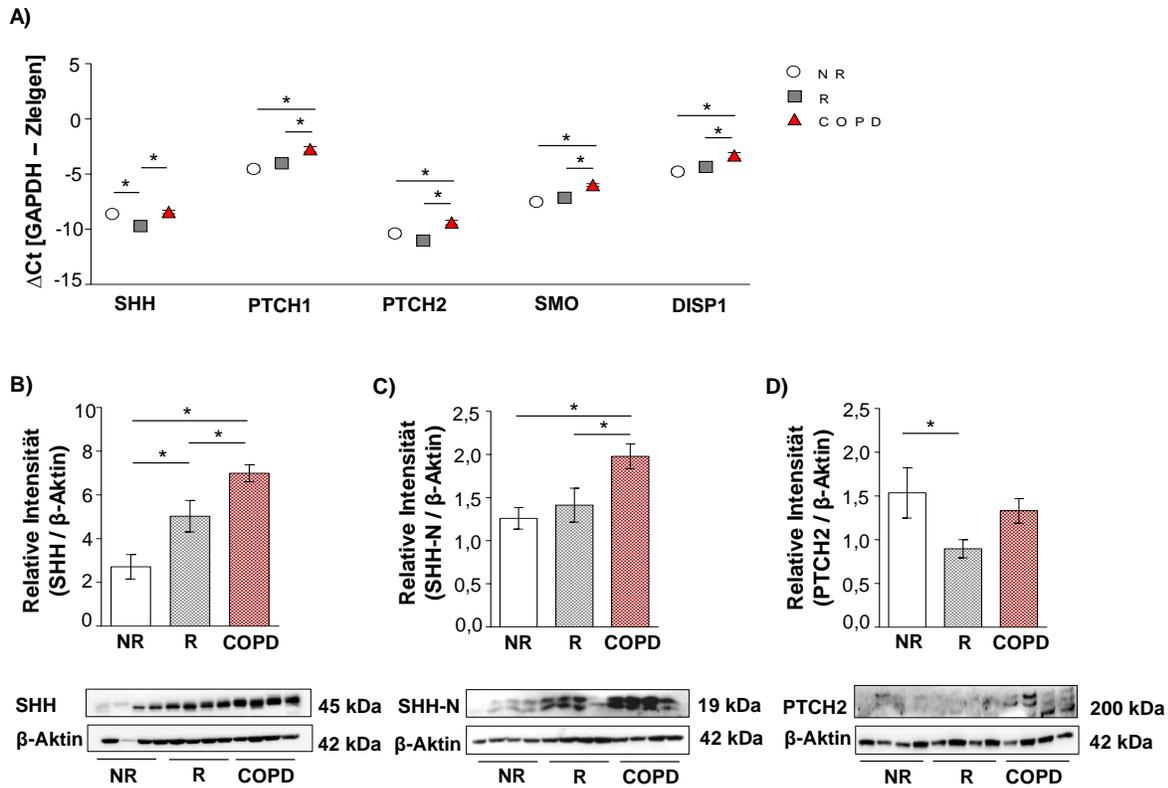


Abbildung 10: Expression von SHH-Signalweg- assoziierten Genen in humanen Lungen.

A) Relative mRNA-Expression von SHH, SHH-N, PTCH1, PTCH2, SMO und DISP1 in homogenisierten Lungen von NR, R und COPD (n=6-19). Relative Protein-Expression von **B)** SHH (n=4), **C)** SHH-N (n=4), **D)** PTCH2 (n=7-8). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). NR: Nichtraucher, R: Raucher.

Um PTCH1 und SMO zu lokalisieren, wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. PTCH1 wurde in den pulmonalen Gefäßen von NR, R und COPD nachgewiesen (Abb. 11).

Ergebnisse

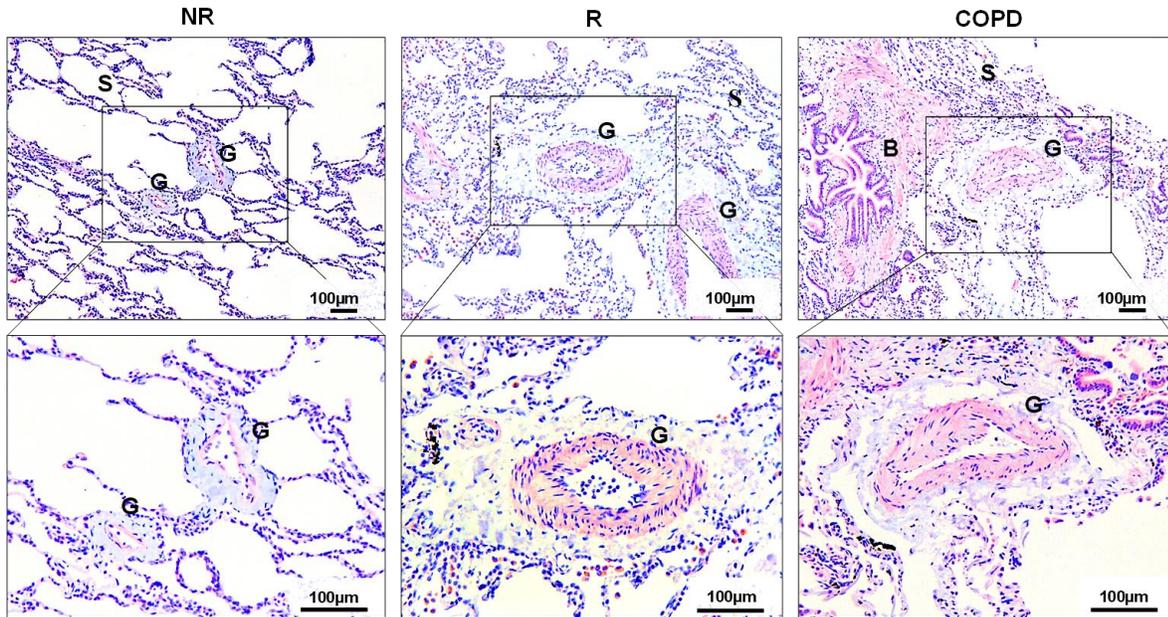


Abbildung 11: Lokalisation von PTCH1 im humanen Lungengewebe.

Immunhistochemische Färbung von PTCH1 (rosa) in den Lungen von NR, R und COPD unter 200x (obere Bilder) und 400x Vergrößerung (untere Bilder). G: pulmonales Gefäß, S: Septum, B: Bronchus. NR: Nichtraucher, R: Raucher

Des Weiteren wurde SMO in der muskulären Schicht von pulmonalen Gefäßen und Bronchien lokalisiert (Abb. 12).

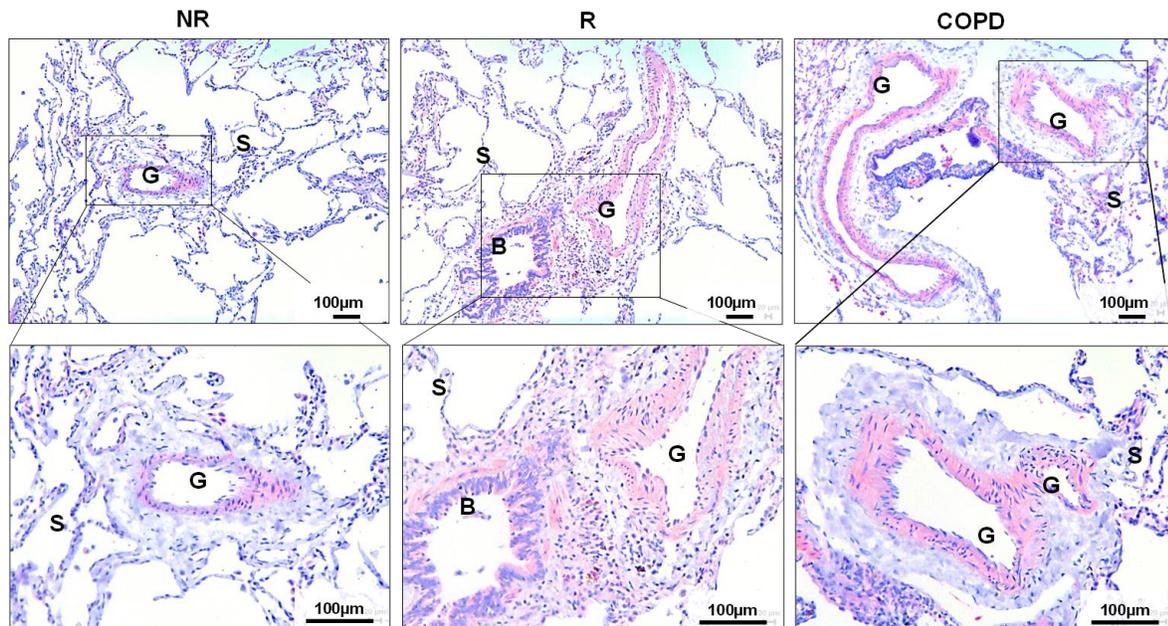


Abbildung 12: Lokalisation von SMO im humanen Lungengewebe.

Immunhistochemische Färbung von SMO (rosa) in den Lungen von NR, R und COPD unter 200x (obere Bilder) und 400x Vergrößerung (untere Bilder). G: pulmonales Gefäß, S: Septum, B: Bronchus. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

Ergebnisse

Auf Grundlage der Ergebnisse wurden weitere Zielgene im SHH-Signalweg analysiert (Abb. 13). Es wurde eine erhöhte mRNA-Expression von Glioma-assoziiertem Onkogen 2 (*glioma-associated oncogene*, GLI) und *hedgheg-interacting protein* (HHIP) in den Lungen von COPD im Vergleich zu NR und R beobachtet (Abb. 13). Eine Regulation von GLI1 auf mRNA-Ebene wurde nicht nachgewiesen (Abb. 13).

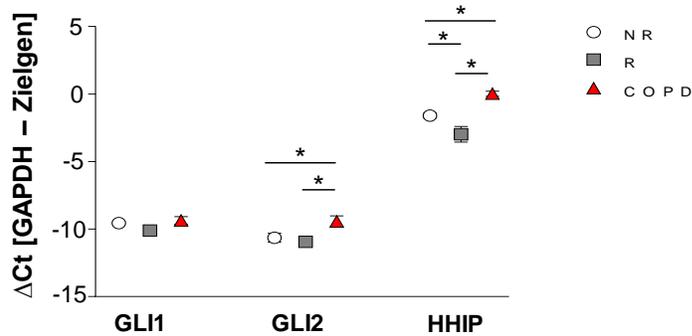


Abbildung 13: Expression von SHH-Signalweg nachgeschalteten Genen in humanen Lungen. Relative mRNA-Expression von GLI1, GLI2 und HHIP in homogenisierten Lungen von NR, R und COPD (n=7-17). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). NR: Nichtraucher, R: Raucher.

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Färbung konnte die Co-Lokalisation von GLI1 mit α SMA in den humanen Lungen detektiert werden (Abb. 14).

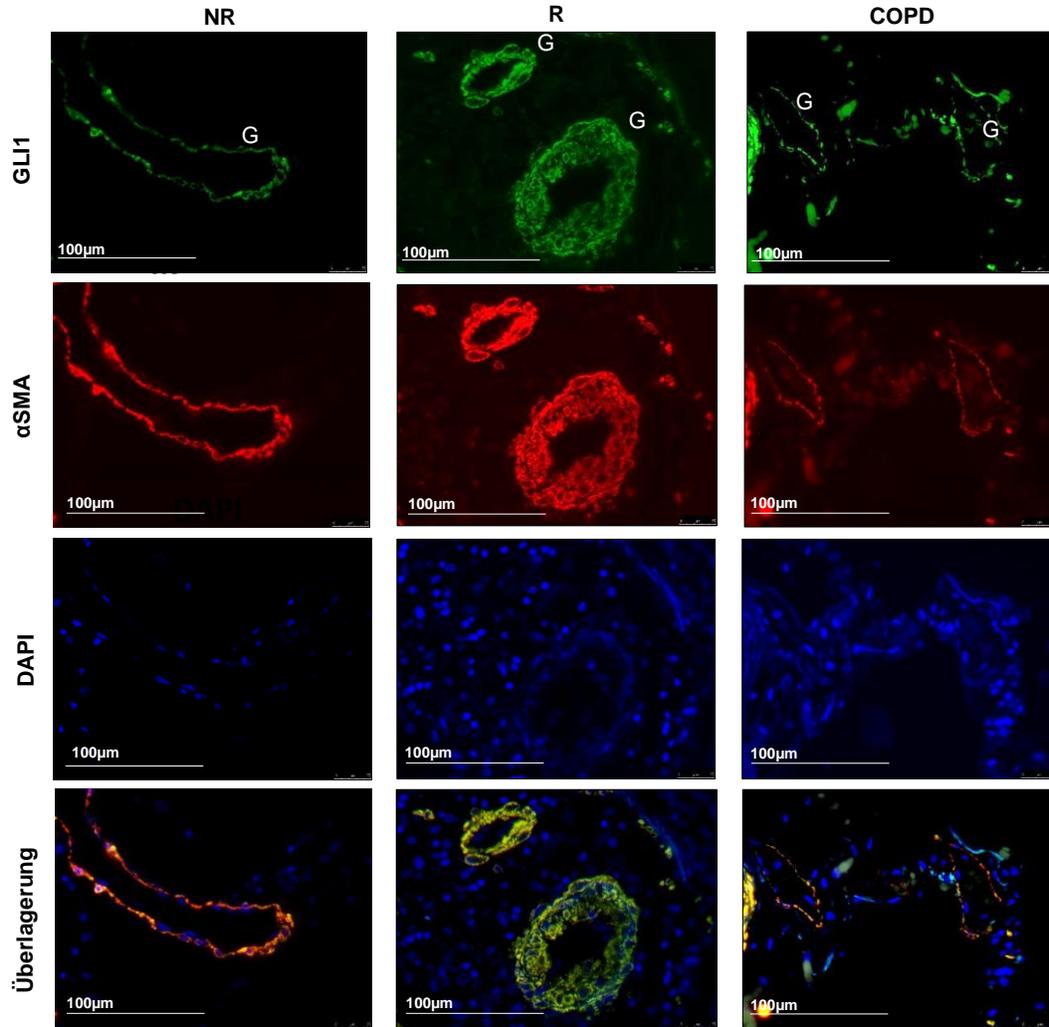


Abbildung 14: Co-Lokalisation von GLI1 im humanen Lungengewebe.

Co-Lokalisation von GLI1 (grün) mit α SMA (rot) in den Lungen von NR, R und COPD untersucht mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung und unter 800x Vergrößerung. G: pulmonales Gefäß. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

3.3 Expression von Proliferationsmarkern in COPD-Lungen

Um den pulmonalvaskulären Umbauprozess in Lungen von COPD-Patienten zu charakterisieren, wurde die Expression des Proliferationsmarkers Cyclin D1 (CCND1) und der mit Proliferation-assoziierten Proteine, extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1/2 (ERK1/2) und AKT analysiert (Abb. 15). CCND1-Protein war in COPD-Lungen verglichen mit Lungen von NR und R hochreguliert (Abb. 15 A). Sowohl die Phosphorylierung von ERK1/2 als auch AKT war in COPD-Lungen induziert (Abb. 15 B, C).

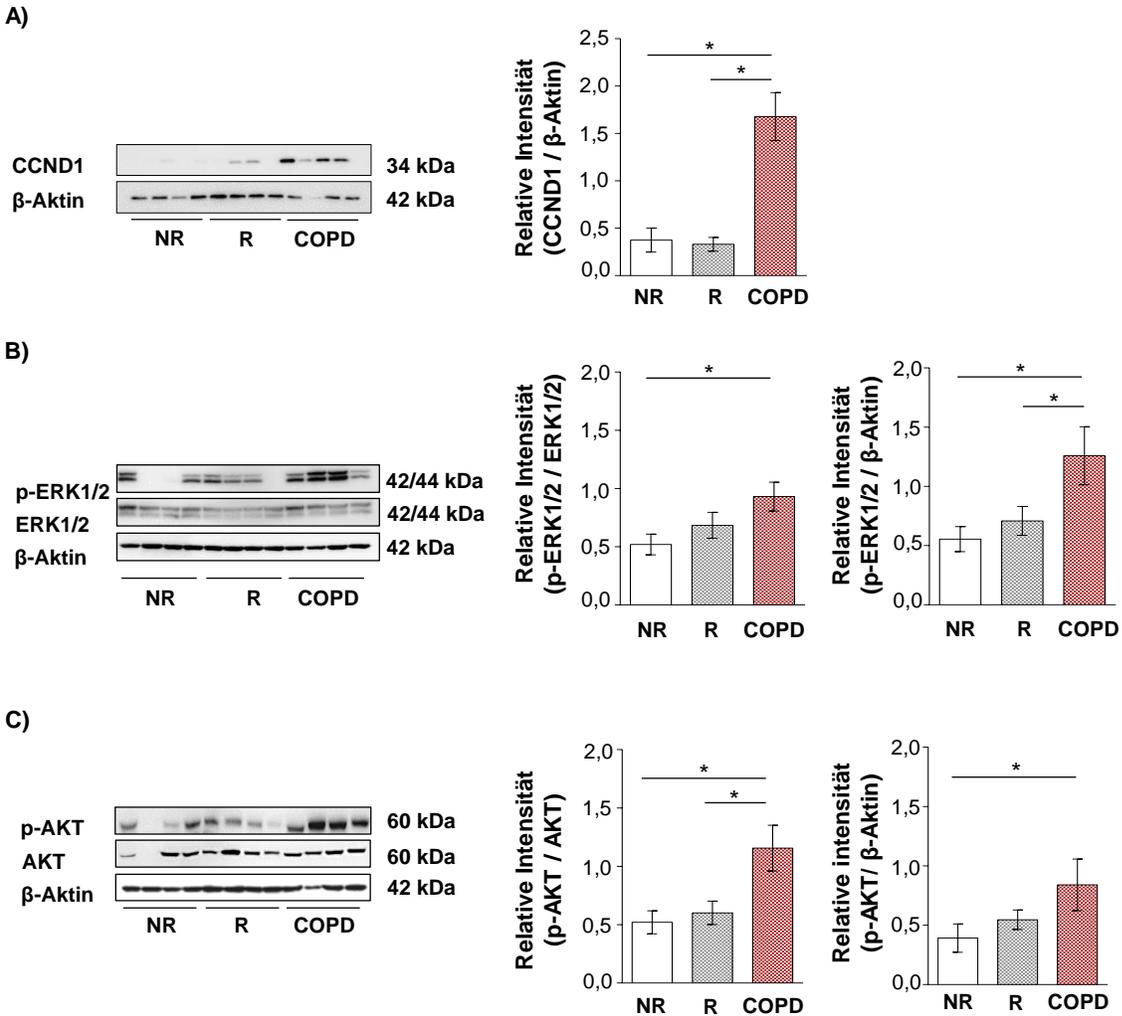


Abbildung 15: CCND1 Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in COPD-Lungen.

Relative Protein-Expression von **A)** CCND1 (n= 6-8), **B)** ERK1/2 (n=9-11) und **C)** AKT (n=9-11) in homogenisierten Lungen von NR, R und COPD. Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). NR: Nichtraucher, R: Raucher

3.4 Molekulare Untersuchung des Einflusses von CSE auf die hPASMC

3.4.1 Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen

Auf der Basis der Resultate in Lungenhomogenaten wurden die identifizierten Gene nun in einem Zellmodell für CSE-Exposition analysiert. Nach 24 Std.-Inkubation von hPASMC mit

Ergebnisse

1 und 3%igem CSE wurde eine erhöhte Expression von FGF9-mRNA beobachtet, während FGF1-, FGF10- und FGFR2-mRNA nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 16 A). Die mRNA von FGF2, FGF7, FGFR1, ETV4 und SPRY4 war nach CSE-Inkubation nicht reguliert (Abb. 16 A, B). Des Weiteren wurde eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression von ETV5 und SPRY2 nach Inkubation mit 3%igem CSE festgestellt (Abb. 16 B), während die Protein-Expression von ETV5 und SPRY2 signifikant vermindert war (Abb. 16 C, D).

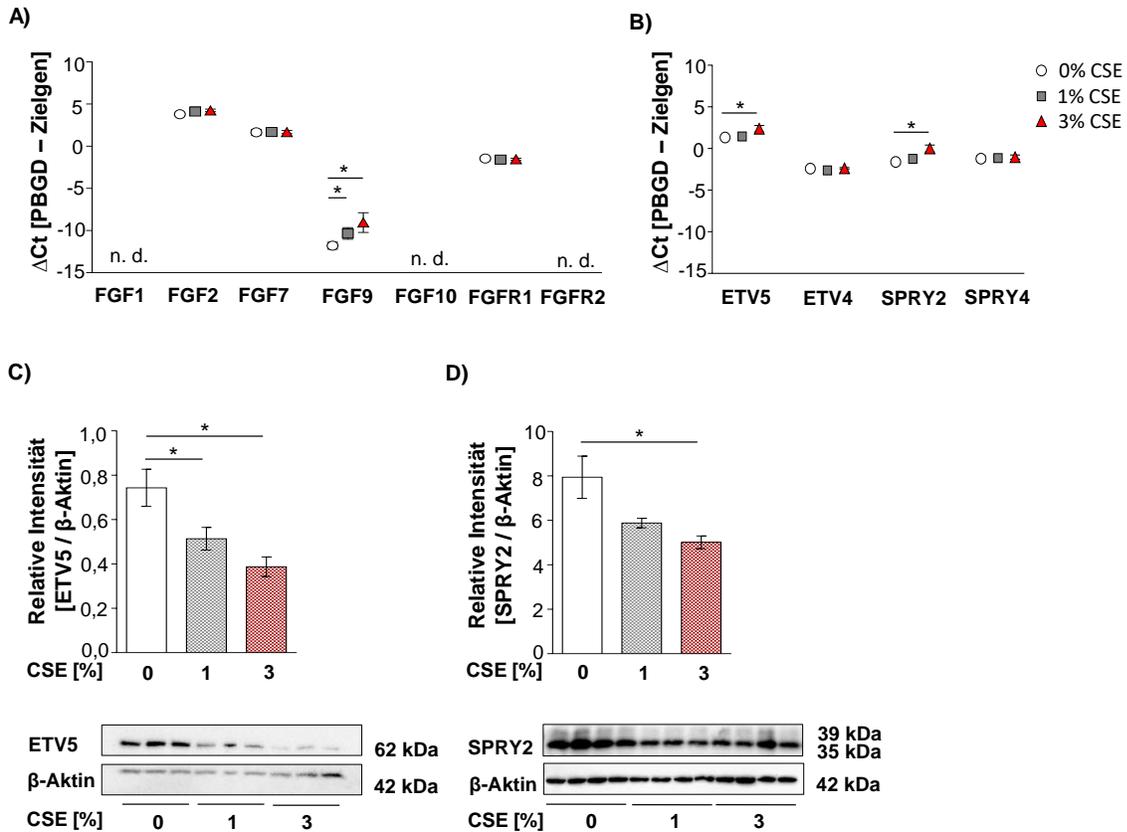


Abbildung 16: Einfluss einer akuten CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC.

Relative mRNA-Expression von **A)** FGF1, FGF2 (n=5), FGF7 (n=5), FGF9 (n=7), FGF10, FGFR1 (n=4), FGFR2 und **B)** ETV5 (n=10), ETV4 (n=5), SPRY2 (n=8) und SPRY4 (n=4) nach 24 Std.-Inkubation von hPASMC mit CSE (0, 1 und 3%ig). Relative Protein-Expression von **C)** ETV5 (n=7) und **D)** SPRY2 (n=7). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). n. d.: nicht detektierbar. CSE: cigarette smoke extract.

3.4.2 Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Expression von SHH-Signalweg-assozierten Genen

Weiterhin wurden die Effekte von CSE auf die mRNA- und Protein-Expression von SHH-Signalweg-assozierten Genen untersucht. Die Behandlung von hPASMNC mit 1 und 3%igem CSE führte zu einer signifikanten Zunahme der mRNA-Expression von GLI1, während die SHH-mRNA nach der Inkubation mit 3%igem CSE ebenfalls hochreguliert war. (Abb. 17 A, B). Des Weiteren konnte keine Regulation von PTCH1-, PTCH2-, SMO-, DISP1- GLI2-, und HHIP-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 17 A, B). Auf Proteinebene wurde eine Herunterregulation von PTCH1 nach der Inkubation mit 1%igem CSE nachgewiesen (Abb. 17 E), während die SHH- und SHH-N-Protein-Expression nicht verändert war (Abb. 17 C, D).

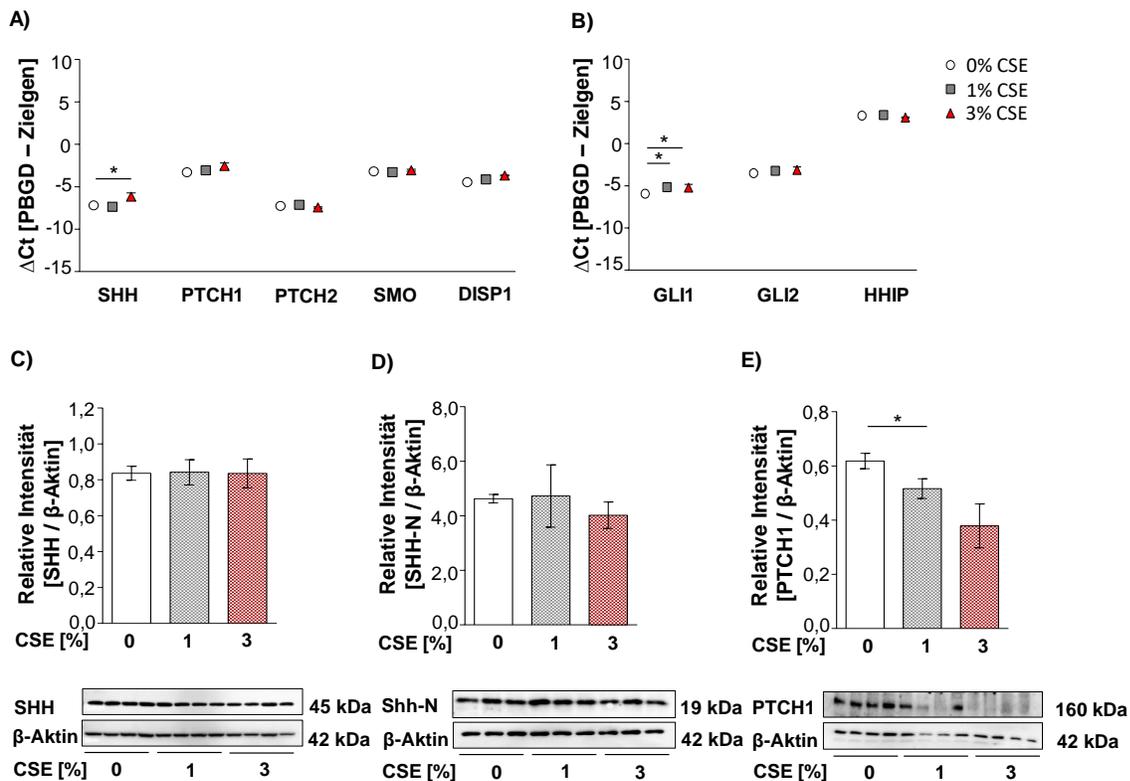


Abbildung 17: Effekte der akuten CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von SHH-Signalweg-assozierten Genen in hPASMNC.

Relative mRNA-Expression von **A)** SHH (n=8), PTCH1 (n=5), PTCH2 (n=4), SMO (n=5), DISP1 (n=4) und **B)** GLI1 (n=4), GLI2 (n=4) und HHIP (n=5) nach 24 Std.-Inkubation von hPASMNC mit CSE (0, 1 und 3%ig). Relative Protein-Expression von **C)** SHH (n=4), **D)** SHH-N (n=3) und **E)** PTCH1 (n=4). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * (p≤0,05). CSE: *cigarette smoke extract*.

3.4.3 Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC

Der pulmonalarterielle Gefäßumbau ist mit einer Dysregulation der Proliferation von SMC verbunden. Um den Einfluss von CSE auf die Proliferation von hPASMC zu erforschen, wurde ein BrdU-basierter Proliferationsassay verwendet. Die 24 Std.-Inkubation von hPASMC mit 3%igem CSE führte zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation (Abb. 18).

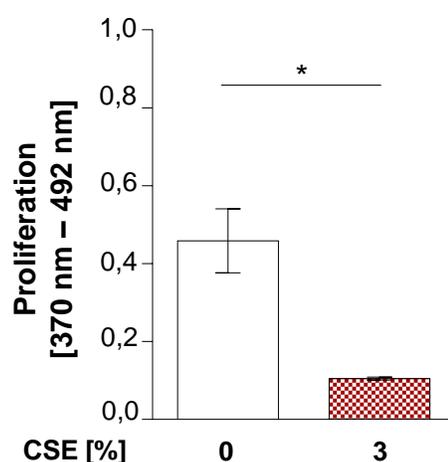


Abbildung 18: Effekte einer CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC.

Proliferation von hPASMC nach 24 Std.-Inkubation mit 3%igem CSE quantifiziert mittels BrDU-basiertem Proliferationsassay (n=6). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*.

Der Proliferationsmarker KI67 war auf mRNA-Ebene und CCND1 auf Protein-Ebene herunterreguliert (Abb. 19 A, B). Eine akute CSE-Behandlung hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von CCND1 und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) (Abb. 19 A).

Ergebnisse

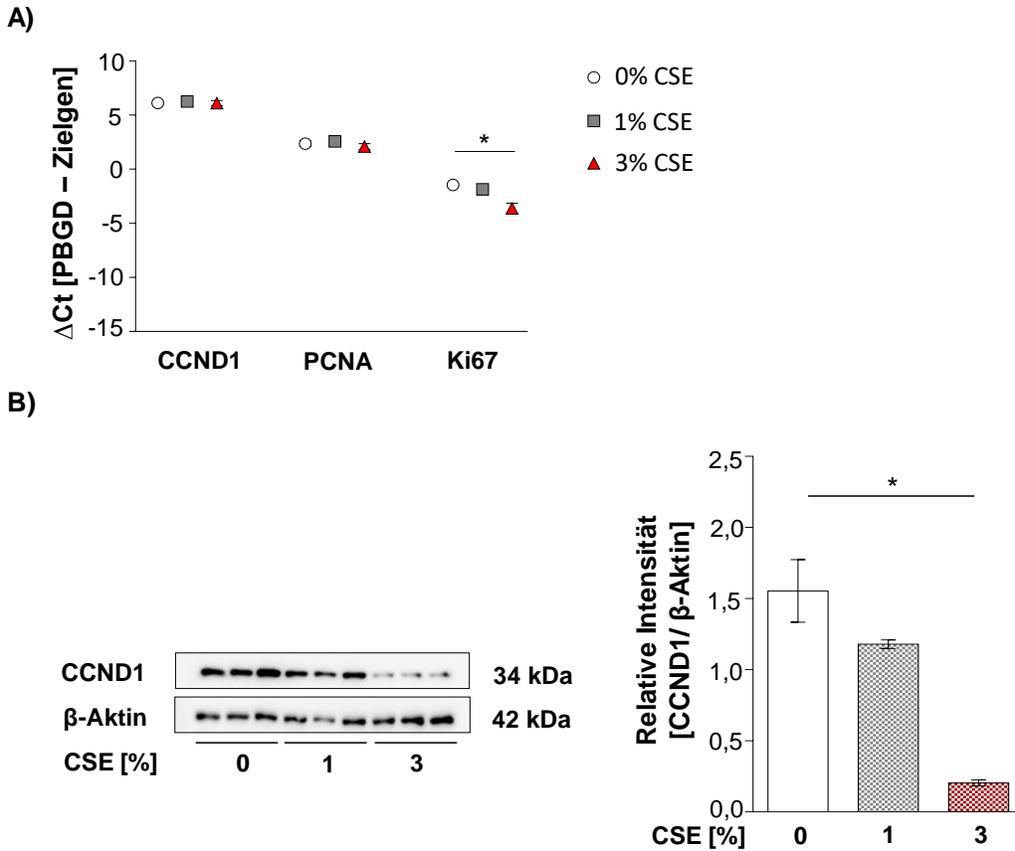


Abbildung 19: Effekte einer akuten CSE-Exposition auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC.

A) Relative mRNA-Expression von CCND1, PCNA und KI67 nach 24 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 1 und 3%ig) (n=4). **B)** Relative Protein-Expression von CCND1 (n=5). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*.

In einem nächsten Schritt wurden die Auswirkungen einer akuten CSE-Exposition auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in hPASC untersucht (Abb. 20 A, B). Die 24 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE induzierte keine Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT (Abb. 20 A, B).

Ergebnisse

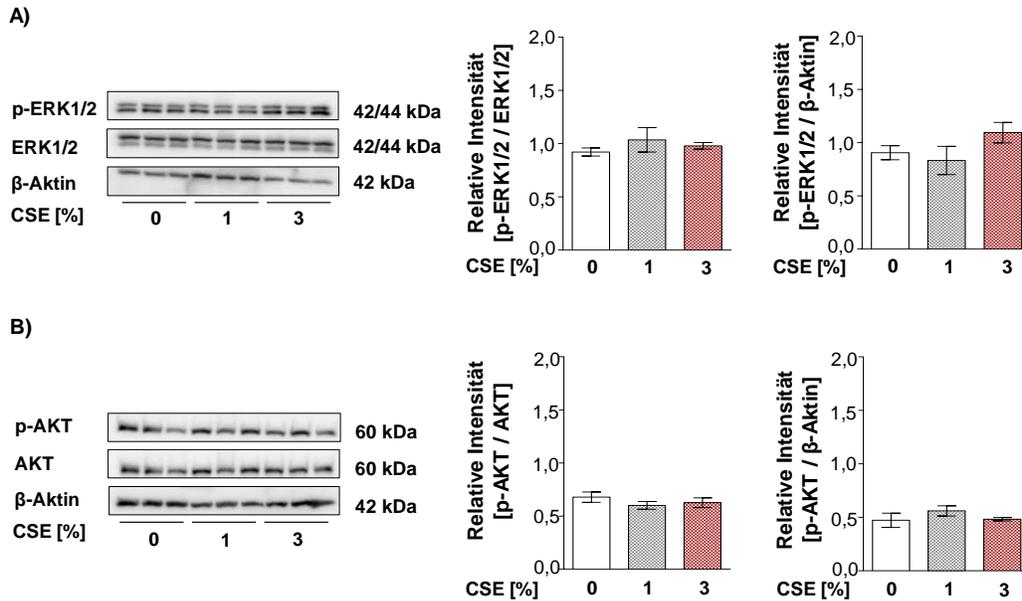


Abbildung 20: Effekte einer akuten CSE-Exposition auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in hPASC.

Relative Protein-Expression von **A)** ERK1/2 (n=6) und **B)** AKT (n=3) nach 24 Std.-Behandlung von hPASC mit CSE (0, 1 und 3%ig). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*.

3.4.4 Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC

Nach Untersuchung der Effekte einer akuten CSE-Exposition auf den FGF-Signalweg wurden die Veränderungen der Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC nach chronischer CSE-Behandlung untersucht. Die molekularen Analysen zeigten eine erhöhte mRNA-Expression von FGF2, FGF9 und SPRY2, jedoch keinen Einfluss auf die Expression von FGF7 und ETV5 in hPASC nach chronischer CSE-Inkubation (Abb. 21 A). Auf Proteinebene zeigte sich eine signifikante Abnahme der ETV5- und eine Zunahme der SPYR2-Expression (Abb. 21 B, C).

Ergebnisse

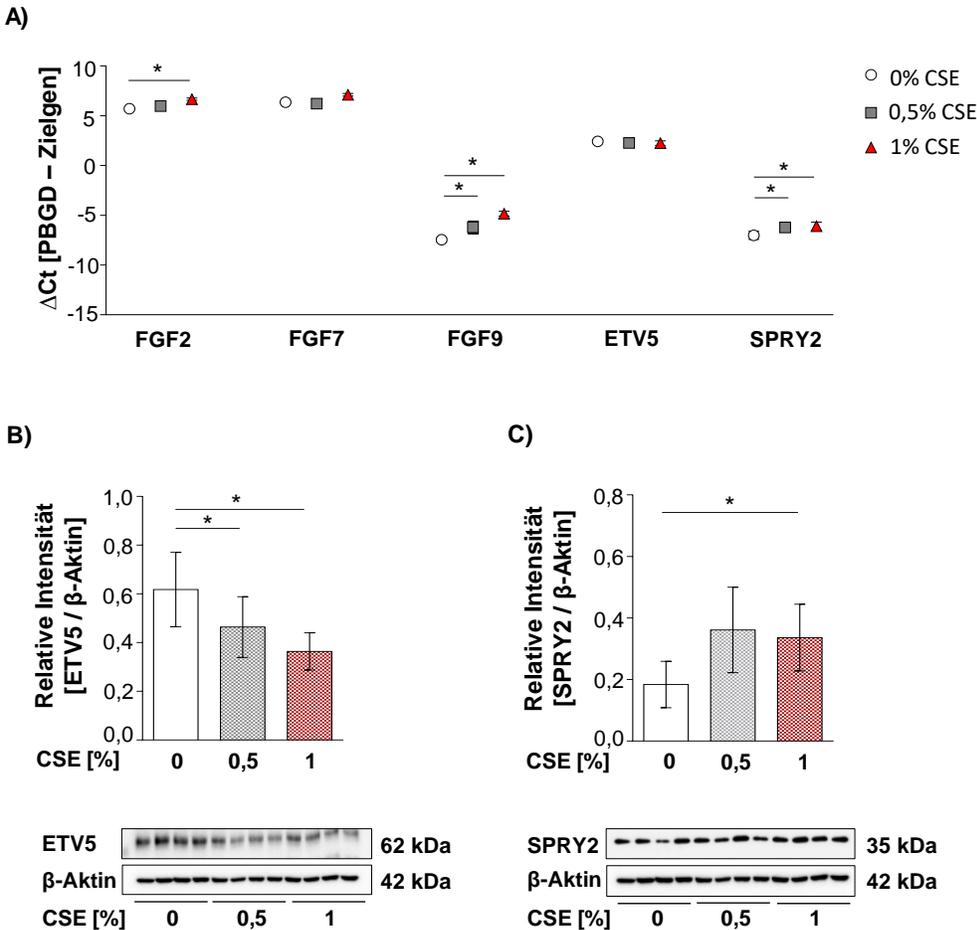


Abbildung 21: Einfluss einer chronischen CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC.

Relative mRNA-Expression von **A)** FGF2, FGF7, FGF9, ETV5, SPRY2 nach 120 Std.-Behandlung von hPASMC mit CSE (0, 0,5 und 1%ig) (n=4-8). Relative Protein-Expression von **B)** ETV5 (n=8) und **C)** SPRY2 (n=4). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*.

3.4.5 Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Expression von SHH-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC

Es wurde eine Zunahme der PTCH2, DISP1 und HHIP mRNA-Expression in hPASMC nach Behandlung mit 0,5%igem und 1%igem CSE gemessen (Abb. 22 A, B). Die mRNA-Expression von SHH war in hPASMC nach einer chronischen Behandlung mit 1%igem CSE erhöht (Abb. 22 A), während die Protein-Expression unverändert war (Abb. 22 C). Die chronische CSE-Inkubation von hPASMC hatte keinen Effekt auf die mRNA-Expression von PTCH1, SMO, GLI1 und GLI2 (Abb. 22 A, B).

Ergebnisse

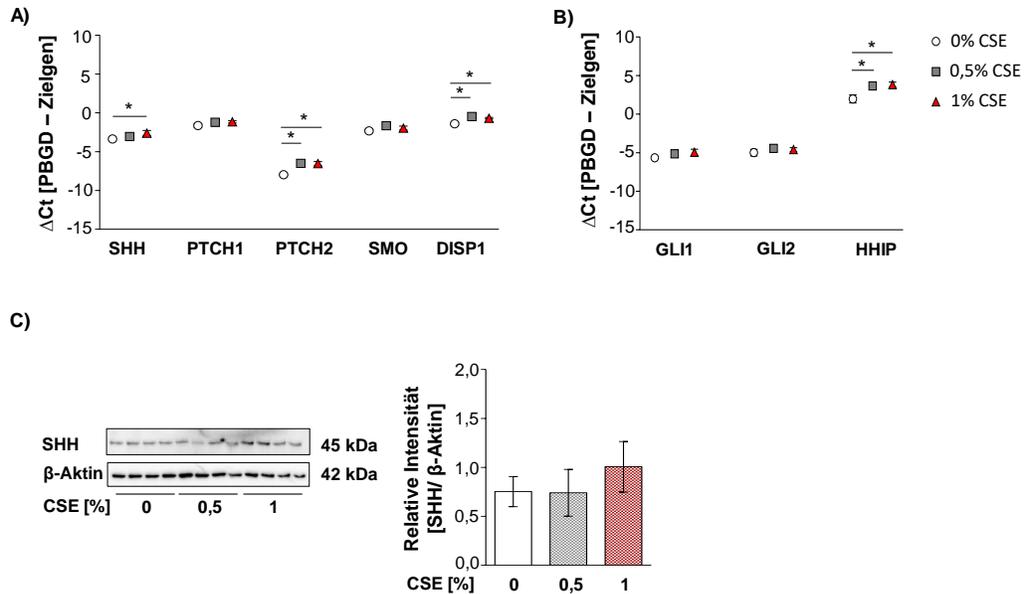


Abbildung 22: Effekte einer chronischen CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von SHH-Signalweg assoziierten Genen in hPASC.

Relative mRNA-Expression von **A)** SHH (n=8) PTCH1 (n=8), PTCH2 (n=4-8), SMO (n=8), DISP1 (n=13) und **B)** GLI1 (n=7), GLI2 (n=8) und HHIP (n=13) nach 120 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 0,5 und 1% ig). **C)** Relative Protein-Expression von SHH in hPASC (n=8). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*.

3.4.6 Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASC

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von chronischem CSE auf die Proliferation von hPASC untersucht. Eine chronische Behandlung von hPASC mit 0,5 und 1% igem CSE führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation (Abb. 23).

Ergebnisse

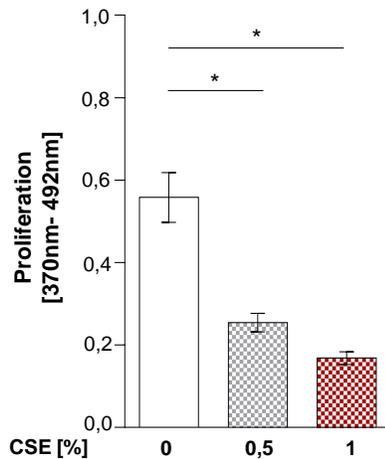
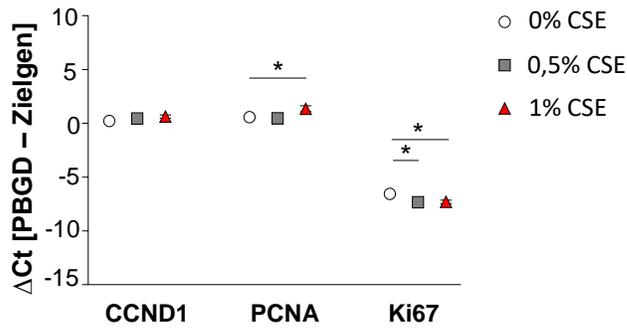


Abbildung 23: Effekte einer chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC. Proliferation von hPASMC nach 120 Std.-Inkubation mit CSE (0, 0,5 und 1%ig) quantifiziert mittels BrdU basiertem Proliferationsassay (n=8). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). *cigarette smoke extract*.

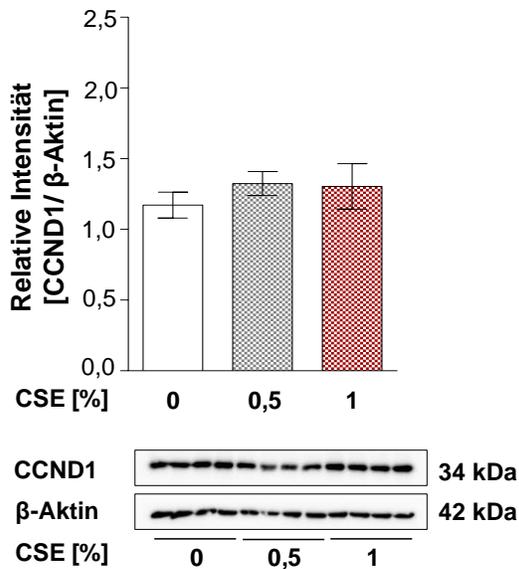
Weiterhin wurde die Expression von verschiedenen Proliferationsmarkern in hPASMC nach chronischer CSE-Behandlung untersucht. Chronische CSE-Behandlung von hPASMC führte zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression des pro-proliferativen Markers PCNA (Abb. 24 A), während die Protein-Expression von PCNA signifikant herunterreguliert war (Abb. 24 C). Die Expression von KI67 war signifikant reduziert auf der mRNA-Ebene (Abb. 24 A). Die Expression von CCND1 war weder auf mRNA- noch auf Proteinebene verändert (Abb. 24 A, B).

Ergebnisse

A)



B)



C)

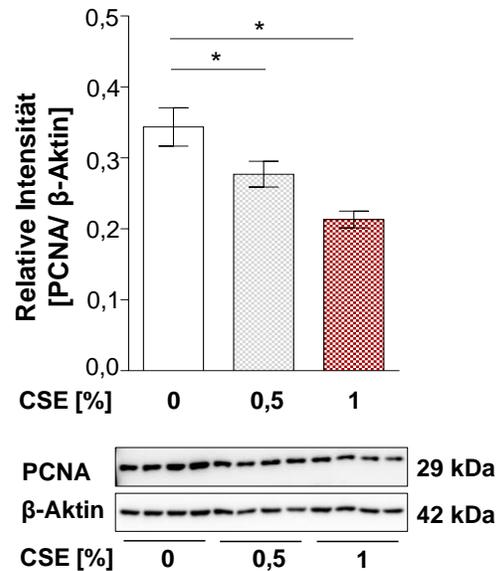


Abbildung 24: Expression von Proliferationsmarkern in hPASMC nach chronischer CSE-Exposition.

A) Relative mRNA-Expression von CCND1, PCNA und KI67 nach 120 Std.-Inkubation von hPASMC mit CSE (0, 0,5 und 1% ig) (n=8). Relative Protein-Expression von B) CCND1 und C) PCNA in hPASMC (n=8). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*.

Auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in hPASMC zeigte die chronische Behandlung mit CSE keinen Effekt (Abb. 25).

Ergebnisse

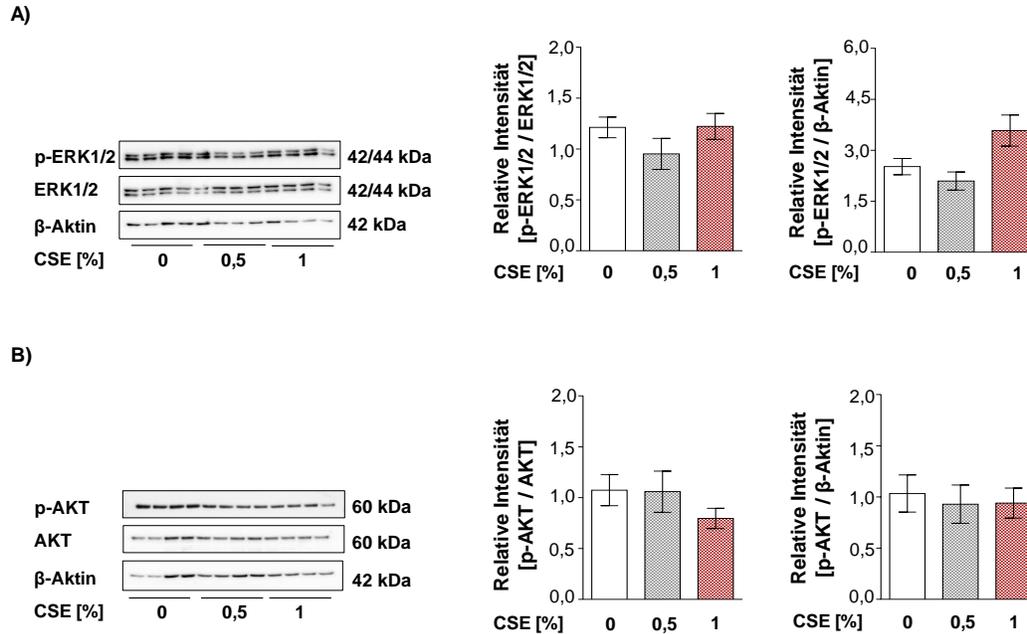


Abbildung 25: Effekte einer chronischen CSE-Exposition auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in hPASC.

Relative Protein-Expression von **A)** ERK1/2 (n=8) und **B)** AKT (n=8) nach 120 Std.-Behandlung von hPASC mit CSE (0, 0,5 und 1% ig). CSE: *cigarette smoke extract*.

3.5 Knockdown-Experimente an hPASC

3.5.1 Wechselwirkungen zwischen ETV5, SHH und SPRY2 in hPASC

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ETV5, SPRY2 und SHH in hPASC nachgewiesen. Um die Interaktionen von ETV5, SPRY2 und SHH sowie dessen Funktion im pulmonalvaskulären Umbauprozess zu untersuchen, wurden die spezifischen siRNA-Knockdown-Experimente an hPASC durchgeführt. Der *Knockdown* von ETV5 führte zur Hochregulation von SPRY2-mRNA (Abb. 26 B), während die SPRY2-Protein-Expression signifikant gehemmt wurde (Abb. 26 E). Zusätzlich wurde die SHH-Protein-Expression durch die Inhibition von ETV5 herunterreguliert (Abb. 26 F), während SPRY2-Knockdown die Expression von ETV5 auf Protein-Ebene und die Expression von SHH auf mRNA-Ebene induzierte (Abb. 26 C, D). Der SHH *Knockdown* zeigte weder einen Effekt auf ETV5- noch auf die Spry2-Expression (Abb. 26 A, B, D, E).

Ergebnisse

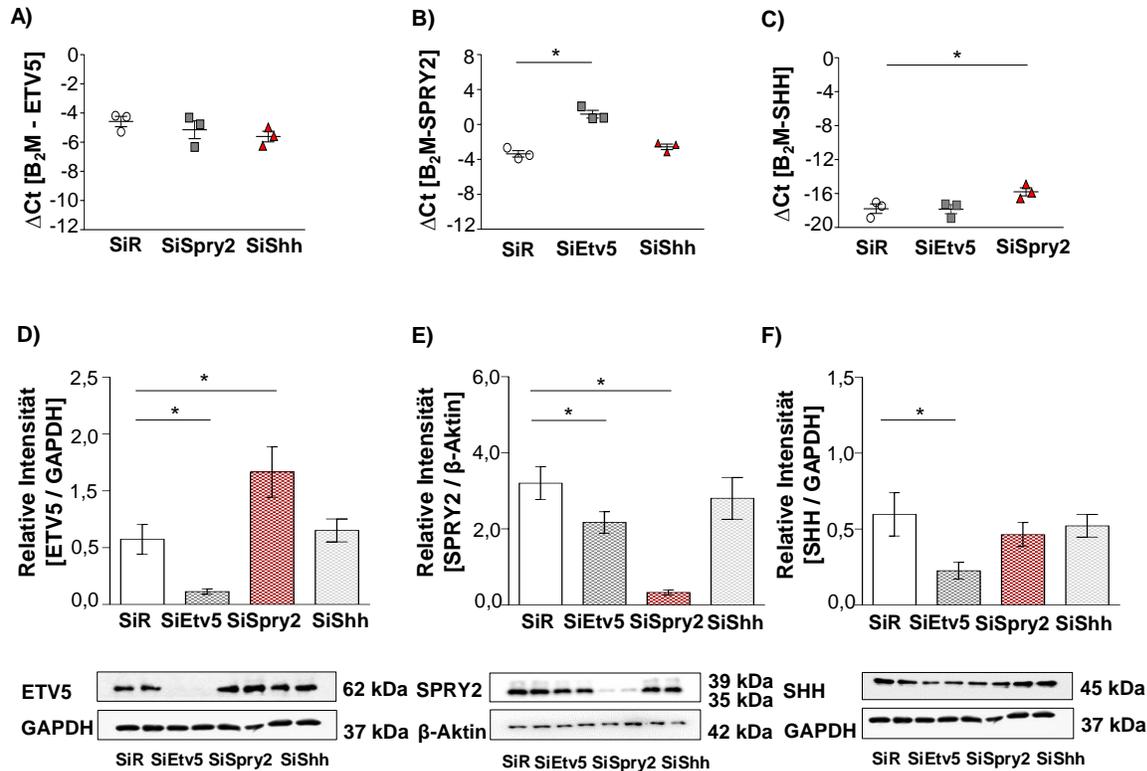


Abbildung 26: Knockdown-Experimente zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen ETV5, SPRY2 und SHH in hPASC.

Relative mRNA-Expression von **A)** ETV5, **B)** SPRY2 und **C)** SHH und relative Protein-Expression (n=5) von **D)** ETV5, **E)** SPRY2 und **F)** SHH nach SiRNA-Transfektion (48 Std.) gegen ETV5 (SiEtv5), SPRY2 (SiSPRY2) oder SHH (SiSHH) im Vergleich zur Kontrolle (SiRandom, SiR). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$).

3.5.2 Einfluss von ETV5, SPRY2 bzw. SHH auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC

Im vorherigen Abschnitt wurden die Wechselwirkungen zwischen ETV5, SPRY2 und SHH mittels der *Knockdown*-Experimente an hPASC nachgewiesen. Als nächstes wurde untersucht, ob ETV5, SPRY2 und SHH eine Rolle bei der Proliferation von hPASC spielen. In Folge des ETV5-*Knockdowns* konnte eine reduzierte Expression von dem CCND1-Protein in hPASC festgestellt werden, während auf der mRNA-Ebene keine Veränderung in der Expression von CCND1 zu beobachten war (Abb. 27 A, D). Das Fehlen von ETV5 zeigte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der weiteren Proliferationsmarker PCNA und KI67 in hPASC (Abb. 27 B, C und E). Der *Knockdown*

Ergebnisse

von SPRY2 hatte keinen Effekt auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC (Abb. 27 A-E). Weiterhin resultierte der *Knockdown* von SHH in einer signifikanten Herunterregulation von CCND1, PCNA und KI67 (Abb. 27 B, C, D, E).

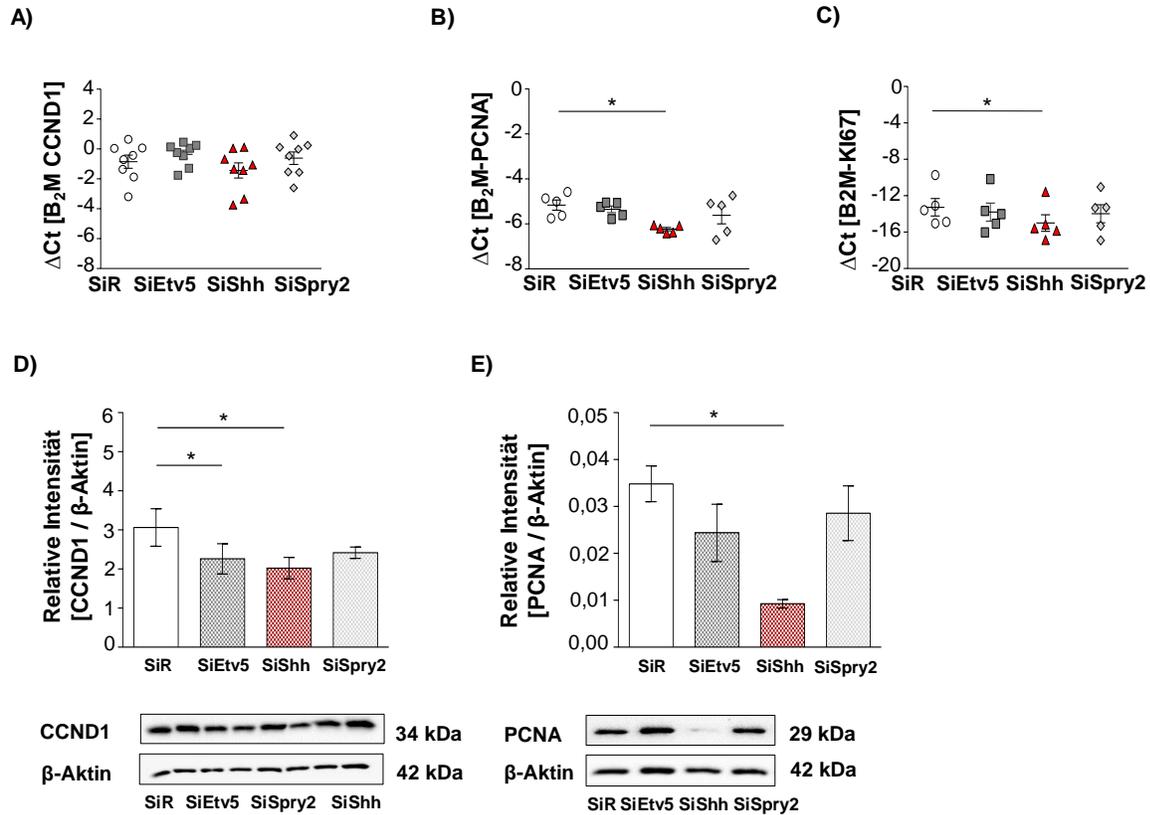


Abbildung 27: Einfluss des ETV5-, SPRY2- bzw. SHH- Knockdowns auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC.

Relative mRNA-Expression von Proliferationsmarkern **A) CCND1**, **B) PCNA** und **C) KI67** nach siRNA-Transfektion (48 Std.) gegen ETV5 (siETV5), SPRY2 (siSPRY2) oder SHH (siSHH) im Vergleich zur Kontrolle (Random, SiR). Relative Protein-Expression von **D) CCND1** (n=4) und **E) PCNA** (n=3). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$).

3.5.3 Einfluss von ETV5, SPRY2 bzw. SHH auf die Proliferation von hPASC nach chronischer CSE-Stimulation

Nachdem die Bedeutung von ETV5, SPRY2 und SHH für die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC unter basalen Bedingungen untersucht wurde, war es nun von Interesse, den Einfluss von ETV5, SPRY2 bzw. SHH auf die Proliferation von hPASC nach einer chronischen CSE-Behandlung zu untersuchen. Der *Knockdown* von ETV5, SPRY2 und SHH resultierte in einer verminderten Proliferation nach einer chronischen

Ergebnisse

Behandlung von hPASMC mit 1%igem CSE und darauffolgenden 24 Std.-Inkubation mit hEC-Kulturüberstand nach CSE-Behandlung (Abb. 28 C).

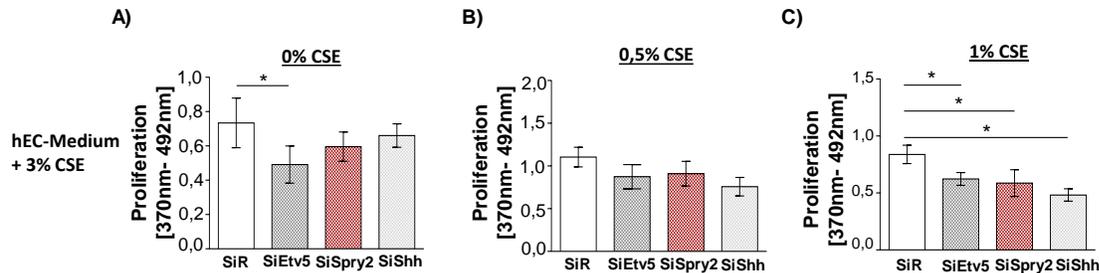


Abbildung 28: Einfluss des ETV5, SPRY2 bzw. SHH Knockdowns auf die Proliferation von hPASMC nach chronischer CSE-Behandlung.

Proliferation von hPASMC nach 120 Std.-Inkubation mit **A)** 0% CSE (n=8), **B)** 0,5% CSE (n=8) und **C)** 1% CSE (n=8) und nach siRNA-Transfektion gegen ETV5 (siETV5), SPRY2 (siSPRY2) oder SHH (siSHH) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Random, SiR), sowie nach Inkubation mit hEC-Kulturüberstand nach CSE-Stimulation (3%ig; 24 Std.) (zweiter Stimulus), quantifiziert mittels BrDU basierten Proliferationsassay. Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). CSE: *cigarette smoke extract*

3.6 Effekte von hEC auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC nach akuter CSE-Stimulation

In der Literatur gibt es Hinweise auf die Beteiligung der Interaktionen zwischen SMC und EC am Gefäßumbauprozess und am Entstehen von PH [80].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von hEC nach Stimulation mit CSE auf die Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC untersucht. Die Stimulation mit hEC-Kulturüberstand nach akuter CSE-Inkubation führte zu einer Hochregulation von FGF2-, SPRY2- und SPRY4-mRNA im Vergleich zur Kontrolle mit hEC-Kulturüberstand ohne CSE in hPASMC (Abb. 29 A). Die mRNA-Expression von ETV5 war nach der Inkubation mit hEC-Kulturüberstand unter akutem CSE-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle mit 3%igem CSE herunterreguliert. Die Expression von FGF7 wurde durch hEC-Kulturüberstand unter akutem CSE-Einfluss im Vergleich zur Kontrolle mit 3%igem CSE wieder auf das basale Expressionslevel gebracht (Abb. 29 A). Auf die mRNA-Expression von FGFR1 hatte die Stimulation von hPASMC mit hEC-Kulturüberstand nach akuter CSE-Inkubation keinen Einfluss (Abb. 29 A). Die Inkubation von hPASMC mit hEC-

Ergebnisse

Kulturüberstand ohne CSE führte zu einer reduzierten mRNA-Expression von FGF2, FGF7, und ETV5, während kein Effekt auf die mRNA-Expression von FGFR1, SPRY2 und SPRY4 in hPASCs beobachtet wurde (Abb. 29 A).

Bei SHH-Signalweg-assoziierten Genen führte die Inkubation von hPASCs mit hEC-Kulturüberstand mit und ohne CSE zu einer Herunterregulation von SHH (Abb. 29 B). Des Weiteren war die SMO- und DISP1-mRNA nach der Stimulation mit hEC-Kulturüberstand und 3%igem CSE im Vergleich zur Behandlung mit 3%igem CSE herunterreguliert, wohingegen HHIP-mRNA signifikant hochreguliert war (Abb. 29 B).

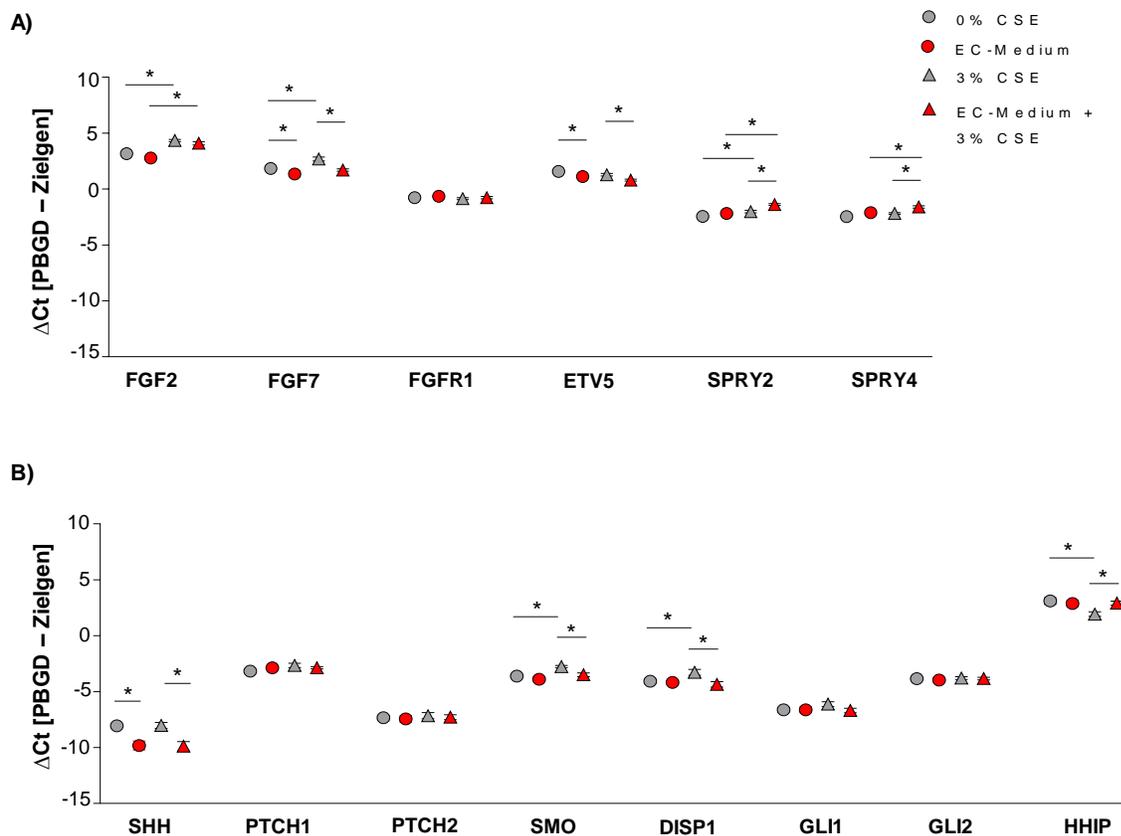


Abbildung 29: Effekte der hEC nach Stimulation mit CSE auf die Expression von FGF- und SHH-Signalweg-assoziierten Genen in hPASCs.

Relative mRNA-Expression von **A)** FGF2, FGF7, FGFR2, ETV5, SPRY2 und SPRY4 **B)** SHH, PTCH1, PTCH2, SMO, DISP1, GLI1, GLI2 und HHIP nach 24 Std.-Behandlung von hPASCs mit 0 oder 3%igem CSE sowie mit Zellkulturüberständen von hEC mit (EC-Medium+3%iges CSE) oder ohne (EC-Medium) CSE (n=6). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). EC: Endothelzellen (*endothelial cells*); CSE: *cigarette smoke extract*.

Ergebnisse

Neben den Veränderungen in der Genexpression wurde die Proliferation von hPASC nach Stimulation mit hEC-Kulturüberstand nach CSE-Inkubation untersucht. Die Stimulation mit hEC-Kulturüberstand und 3%igem CSE führte zu einer Erhöhung der Proliferation von hPASC im Vergleich zur Behandlung mit 3%igem CSE alleine (Abb. 30).

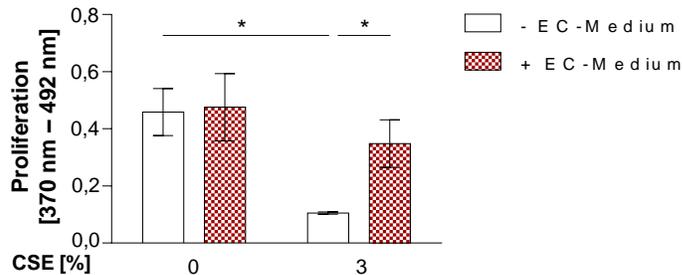


Abbildung 30: Proliferation von hPASC nach Stimulation mit hEC-Kulturüberstand nach CSE-Inkubation.

Proliferation von hPASC nach 24 Std.-Inkubation mit 0 oder 3%igem CSE sowie mit Zellkulturüberständen von hEC mit oder ohne CSE quantifiziert mittels BrDU basiertem Proliferationsassay (n=6). Signifikanz ist wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$). EC: Endothelzellen (*endothelial cells*); CSE: *cigarette smoke extract*.

Aus den Ergebnissen folgt, dass CSE-vermittelte Veränderungen der Expression von bestimmten Genen (FGF7, SMO, DISP1 und HHIP) in hPASC durch die Stimulation mit Zellkulturüberständen von hEC revertiert werden konnten. Außerdem induzierte die Stimulation mit hEC-Kulturüberstand nach CSE-Behandlung eine Proliferation von hPASC.

4 Diskussion

Die COPD gehört zu den häufigsten Todesursachen weltweit, mit einer weiter ansteigenden Mortalitätsrate. Etwa 10 bis 30% der COPD-Patienten mit moderater bis schwergradiger COPD weisen einen erhöhten mPAP auf. Die COPD-PH verläuft in den meisten Fällen mild bis moderat, eine schwere Form tritt in bis zu 5% der COPD-Patienten auf [64]. Aufgrund einer erhöhten Morbidität und Mortalität von COPD-Patienten mit PH, kann die PH bei COPD-Patienten von prognostischer Bedeutung sein. Nach neuen Erkenntnissen können pulmonalvaskuläre Veränderungen, welche einer PH zugrunde liegen, sogar die Entwicklung eines Emphysems hervorrufen [7, 65]. Über die zellulären und molekularen Prozesse, die bei der Pathogenese von COPD-PH eine Rolle spielen, ist allerdings bislang nur sehr wenig bekannt. Die Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen könnte helfen, neue Therapieansätze zu entwickeln. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue molekulare Signalwege zu identifizieren, die zum Prozess des pulmonalvaskulären Umbaus assoziiert mit Zigarettenrauch und COPD-PH beitragen.

4.1 Expressionsanalyse von FGF-Genfamilie und damit assoziierten Signalwegen in COPD-PH

Die FGF spielen eine essentielle Rolle in vielen Stadien der Lungenentwicklung [115]. In einer vollentwickelten Lunge sind diese Gene für die Aufrechterhaltung der Lungenstruktur und -funktion wichtig [101]. Darüber hinaus sind FGF an der Pathogenese von respiratorischen Erkrankungen z. B. dem Bronchialkarzinom, der bronchopulmonalen Dysplasie, der pulmonalen Fibrose und dem Asthma beteiligt [104, 108, 109, 116, 117]. Über die Bedeutung dieser Gene in der Pathogenese von COPD-PH ist bislang wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte die mRNA-Expression der FGF-Liganden FGF1, FGF2, FGF7, FGF9 und FGF10 sowie der FGF-Rezeptoren FGFR1 und FGFR2 in den humanen Lungen von NR, R und COPD-Patienten nachgewiesen werden. Dabei wurde eine erhöhte mRNA-Expression von FGF1 und FGF9 bei COPD-Patienten im Vergleich zu NR und R festgestellt. Beide wirken als lokale parakrine Signalmoleküle über die Bindung an FGFR unter anderem an FGFR2c [102]. *Kranenburg et al.* haben bereits eine erhöhte bronchiale Expression von FGF1 bei COPD-Patienten beobachtet, welche mit dem bronchialen Umbauprozess bei COPD assoziiert wurde [119, 148]. FGF9 wurde als ein prognostischer

Faktor für das Lungenkarzinom identifiziert [118]. Ferner zeigte dieser Wachstumsfaktor anti-apoptische und pro-migratorische Effekte auf Lungen-Fibroblasten und wurde mit der Pathophysiologie von idiopathischen Lungenfibrose in Verbindung gebracht [115, 119]. Die reduzierte mRNA-Expression von FGF2 bei Rauchern könnte mit der alveolären Inflammation zusammenhängen [120], die bei Rauchern auf eine erhöhte Infiltration von Makrophagen in der Lunge zurückzuführen ist [121, 122]. In einem Mausmodell führte eine Kurzzeit-Zigarettenrauchexposition (24 Std. bis 4 Tage) zu einer inflammatorischen Reaktion und zu einer Abnahme des FGF2-Proteins in den Lungen [123]. Durch eine intranasale Verabreichung von rekombinantem FGF2 konnte eine signifikante Reduktion der Makrophagen-vermittelten Inflammation in der bronchoalveolären Lavage sowie eine Abnahme der alveolären Destruktion bei den Zigarettenrauch-exponierten Mäusen beobachtet werden [123].

Es wurde keine Regulation von FGFR1 auf mRNA-Ebene bei COPD-Patienten nachgewiesen, obwohl dieser Rezeptor bereits im Kontext von pulmonalvaskulärem Umbau bei COPD beschrieben wurde [113]. Diese Diskrepanz ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Resultate von *Kranenburg et al.* auf immunhistochemischen Färbungen aufbauen, während die der vorliegenden Arbeit auf mRNA-Analysen in homogenisierten Lungen basieren. FGF10 war bei COPD-Patienten im Vergleich zu NR reguliert, während FGF7 nicht verändert war. Es ist bekannt, dass die FGF10-Haploinsuffizienz sowie der Einzelnukleotid-Polymorphismus von FGF7 das Risiko für die Entwicklung von COPD erhöhen kann. Die genaue Rolle dieser Gene in der Pathogenese von COPD bzw. COPD-PH ist bis jetzt jedoch noch nicht entschlüsselt [112, 124].

FGFR2 war bei COPD auf mRNA-Ebene hochreguliert. Eine erhöhte Expression von FGFR2 wurde bereits für idiopathische Lungenfibrose, IPAH und Bronchialkarzinom beschrieben [125–127]. FGFR2 wurde in den Bereichen des epithelialen Umbaus bei Patienten mit idiopathischer Fibrose und in den Gefäßwänden von IPAH-Lungen lokalisiert [126]. FGFR2 wird über die Bindung von FGF-Liganden, u. a. FGF1 und FGF9, aktiviert [128], wodurch es zur Dimerisierung von FGFR2 und zur Autophosphorylierung von intrazellulären Tyrosinkinase-Domänen kommt. Die phosphorylierten Tyrosinkinasen dienen als Andockstellen für das Adapterprotein FGFR Substrat 2α , welches wiederum verschiedene Adapterproteine bindet und intrazelluläre Signalkaskaden induziert [129]. Der FGFR-

Signalweg kann den RAS-MAPK, PI3K-AKT, PLC γ und STAT initiieren. Der pulmonalvaskuläre Umbau bei COPD ist mit einer erhöhten Zellproliferation verbunden [64]. Sowohl MAPK als auch PI3K-AKT Signalwege regulieren unter anderem die Zellproliferation und das Zellüberleben [130–132]. Der FGFR-Signalweg bewirkt die Aktivierung unterschiedlicher MAP-Kinasen, einschließlich ERK1/2, C-Jun N-terminale Kinasen (JNK) und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase [133–135]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT bei COPD-Patienten im Vergleich zu NR und R beobachtet, was mit der Proliferation assoziiert sein könnte. Eine abnormale Regulation von MAPK-assoziierten Signalwegen wurde für Bronchialkarzinom, Lungenfibrose, Asthma und IPAH beschrieben [136–139]. *Yu et al.* haben im Rattenmodell ERK1/2 als einen Hauptakteur in der Zellproliferation und im Zigarettenrauch-induzierten pulmonalvaskulären Umbau beschrieben [140]. Die siRNA-vermittelte Inhibition von ERK1/2 verringerte den pulmonalvaskulären Umbauprozess bei Zigarettenrauch-exponierten Ratten [140]. Weiterhin wurde eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 in Epithelzellen der Atemwege und alveolären Makrophagen von Zigarettenrauch-exponierten Mäusen beobachtet [141].

Der MAPK-Signalweg führt zur Expression von diversen Zielgenen über die Aktivierung von E26 transformationsspezifischen (ETS) Transkriptionsfaktoren. Die ETS-Familie besteht aus 29 im menschlichen Genom identifizierten Genen, die sich in 12 strukturelle Subfamilien unterteilen lassen, u. a. in die *polyomavirus enhancer activator-3* (PEA3)-Subfamilie [142, 143]. ETS-Transkriptionsfaktoren wurden zunehmend als Schlüsselproteine in der Regulation der Organentwicklung und des endokrinen Systems sowie in der Onkogenese beschrieben [144]. Zur PEA3-Subfamilie gehört u. a. ETV5, welcher als *downstream* von FGF-Signalweg agiert [138, 145]. In der vorliegenden Arbeit war ETV5 sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene im Lungengewebe von COPD-Patienten signifikant hochreguliert. Außerdem konnte seine Expression in den SMC der Gefäßwände und in den inflammatorischen Zellen von COPD-Lungen lokalisiert werden. In der Literatur wurde ETV5 hauptsächlich mit der Lungen- und Nierenentwicklung sowie der Onkogenese assoziiert [146–148]. So spielt ETV5 eine Rolle bei der Regulation der Infiltration und Metastasierung von Tumoren und von Genen, die mit der epithelial-mesenchymalen Transition assoziiert werden [148–150]. Im Respirationstrakt wurde ETV5

mit einer T_H17 -Zellen (IL-17 produzierende T-Helferzellen) abhängigen Atemwegs-Inflammation bei Mäusen in Verbindung gebracht [151]. Außerdem führte der *Knockdown* von ETV5 in Typ-II-Alveolarepithelzellen zu einem Typ-I-Alveolarepithelzellen-ähnlichem Phänotyp, was auf die Bedeutung des MAPK-ETV5 Signalwegs für die Aufrechterhaltung des Typ-II-Alveolarepithelzellen Phänotyps hindeutet [152]. Der Verlust von ETV5 war mit einer reduzierten Mauslungenhyperplasie und einer verschlechterten Lungenreparatur nach Bleomycin-induzierten Lungenschädigung assoziiert [152]. Darüber hinaus sind die Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie an der Regulation der endothelialen Funktion, der vaskulären Inflammation, der SMC-Proliferation und dem vaskulären Umbauprozess beteiligt [153–156]. Somit besteht die Möglichkeit, dass eine verstärkte ETV5-Expression bei COPD-Lungen sowie seine Lokalisation in den SMC der Gefäßwände, die in dieser Arbeit beobachtet wurden, mit der pulmonalvaskulären Inflammation und den Umbauprozessen bei COPD im Zusammenhang stehen könnten.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit eine Zunahme des Proliferationsmarkers CCND1 in den COPD-Lungen nachgewiesen. Zahlreiche Publikationen weisen auf die Effekte von CCND1 auf die PASMC-Proliferation und auf die pulmonalvaskulären Umbauprozesse hin [157–159]. Im Rattenmodell führt Zigarettenrauch zu einer erhöhten Expression von CCND1 auf mRNA- und Proteinebene, was zur PASMC-Proliferation und pulmonalvaskulären Umbauprozessen führt [159–161]. Es gibt zudem Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der ERK1/2-Aktivität und der CCND1 mRNA- und Protein-Expression [162]. Einer Studie zur Folge führt FGF9/FGFR2 zur Proliferation von Tumorzellen über die Aktivierung von ERK1/2 und CCND1 [163]. Die Zunahme der CCND1-Expression bei COPD-Patienten könnte das Resultat der Aktivierung der FGF9/FGFR2-ERK1/2 Signalkaskade sein, die eine mögliche Rolle bei der PASMC-Proliferation in der Pathogenese der humanen COPD-PH spielt (Abb. 31).

Im Kontext von Lungenentwicklung und Lungenmorphogenese wurde gezeigt, dass ETV5 die Expression von SHH induzieren kann [164]. SHH ist der am häufigsten exprimierte und der am besten charakterisierte Vertreter der Hedgehog-Familie [165]. Der klassische SHH-Signalweg wird durch die Bindung von SHH an 12-Transmembran-Proteinrezeptoren PTCH1 und -2 initiiert. Dies führt dazu, dass die Inhibition des G-Protein-gekoppelten Rezeptors SMO durch PTCH1 und -2 aufgehoben wird, wodurch die intrazelluläre

Signalkaskade aktiviert wird. Dabei durchläuft SMO eine Konformationsänderung, wodurch der Transkriptionsfaktor GLI freigesetzt, in den Nucleus transloziert und die Transkription von Zielgenen initiiert (kanonische Aktivierung) wird. Während GLI1 ausschließlich als ein transkriptioneller Aktivator agiert, können GLI2 und -3 sowohl als Aktivatoren als auch Repressoren fungieren [164]. GLI1 und -2 modulieren die Expression von Genen, die die Zellproliferation, Zelldifferenzierung sowie epithelial-mesenchymale Transition regulieren, dazu gehören u. a. Cyclin B, -D, -E, Cyclin-abhängige Kinase, Myelozytomatose-Onkogen, *B-cell lymphoma 2*, GLI1, PTCH1 und HHIP [166]. GLI1 und -2 können durch die RAS-MAPK- und PI3K-AKT-Signalkaskaden aktiviert werden [167, 168]. Neben der kanonischen Aktivierung des SHH-Signalweges ist auch eine nicht-kanonische Aktivierung bekannt [169]. Dabei wird GLI unabhängig von SHH, PTCH und SMO aktiviert und steht vor allem mit Krebserkrankungen im Zusammenhang [166, 167–169]. Eine veränderte Expression von GLI wurde mit diversen respiratorischen Erkrankungen, einschließlich pulmonaler Fibrose, Asthma und Lungenkrebs assoziiert [173]. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte mRNA-Expression von GLI2 bei COPD-Patienten festgestellt. Außerdem wurde eine Co-Lokalisation von GLI1 mit α SMA in der Muskelschicht der Gefäße in humanen Lungen detektiert. *Moiseenko et. al* konnten GLI1 in den Vorläuferzellen von SMC nachweisen [263], ähnlich zu den Resultaten dieser Arbeit. Der SHH-GLI2-Signalweg kann die Proliferation von vaskulären SMC über CCND1 stimulieren, was auf seine Rolle in der Intima-Hyperplasie hindeuten könnte [170]. GLI2 trägt über eine direkte Regulation der Cyclin D Expression zur Proliferation von nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen bei [169]. Darüber hinaus wurde GLI2 als ein potenzieller Marker für epithelialen Umbauprozess bei COPD identifiziert [171]. In der vorliegenden Arbeit waren PTCH1, PTCH2, SMO, DISP1 und HHIP auf mRNA-Ebene in den COPD-Lungen im Vergleich zu Lungen von NR und R hochreguliert. Das PTCH1-Protein ließ sich mittels Immunhistochemie in den Muskelzellen der Gefäße nachweisen. In der Studie von *Tam et al.* wurde eine Hochregulation der PTCH1 mRNA- und Protein-Expression in humanen Epithelzellen der Atemwege von COPD-Patienten im Vergleich zu Nichtrauchern beobachtet, was mit den Resultaten dieser Arbeit auf mRNA-Ebene übereinstimmt. Die erhöhte PTCH1-Expression korreliert mit der Mukus-Überproduktion und mit der chronischen Bronchitis von COPD-Patienten [172].

Diskussion

SMO wurde in humanen Lungen in SMC der Gefäße und Bronchien detektiert, ergab jedoch kein Signal im Western Blot. Eine Glykosylierung ist als posttranslationale Modifikation für SMO bekannt und könnte die Ursache für das fehlende Signal im Western Blot sein [173].

HHIP codiert für ein Transmembranprotein, welches ein *downstream* Zielgen und ein Antagonist des SHH-Signalwegs ist. Es wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen in der Nähe des HHIP-Gens gefunden, die mit der Abnahme der Lungenfunktion assoziiert sind [174]. *Zhou et al.* haben im Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit, trotz der Ähnlichkeiten in den molekularen Methoden, eine reduzierte Expression von HHIP auf mRNA- und Proteinebene bei COPD-Patienten gezeigt [175].

Die Resultate von COPD-Patienten deuten darauf hin, dass COPD-PH mit den Veränderungen im FGF-SHH-Signalweg assoziiert sein könnte (Abb. 31). Dies konnte zum einen durch stark erhöhte mRNA-Spiegel von FGFR2, FGF9 und ETV5 sowie von vielen SHH-Signalweg-assoziierten Genen und zum anderen durch die Lokalisation von ETV5, PTCH1, SMO und GLI1 in der Muskelschicht der Gefäße in den Lungen von COPD-Patienten demonstriert werden.

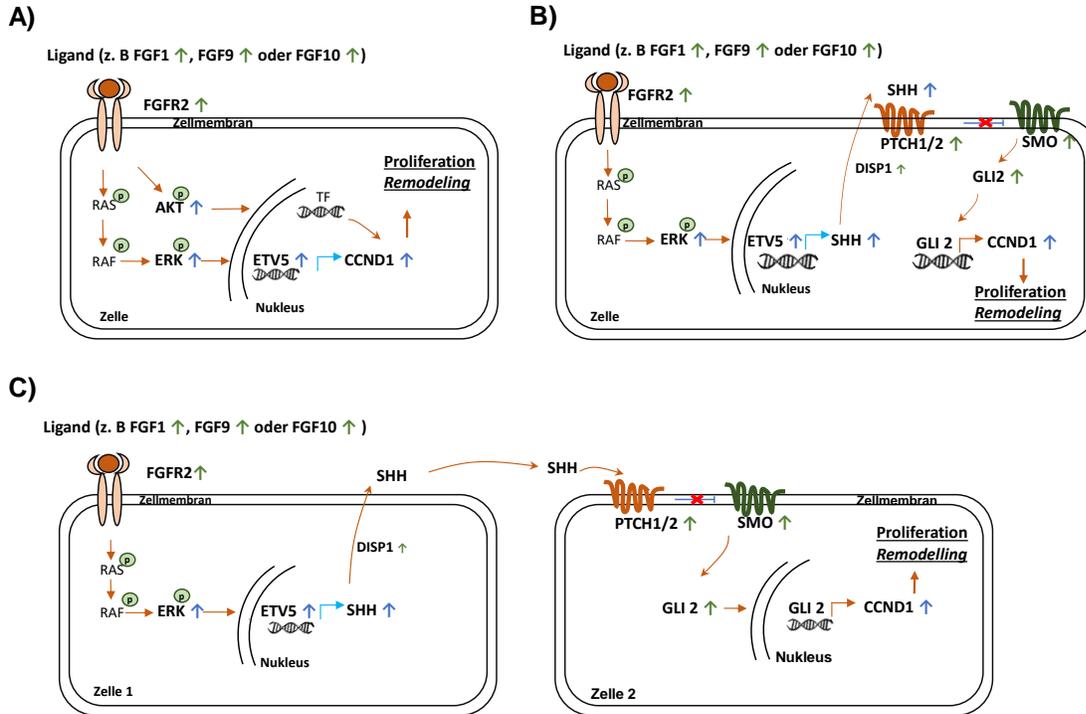


Abbildung 31: Modell für die Beteiligung der FGF- und SHH-Signalwege an der Pathogenese von COPD-PH.

Drei mögliche Signalkaskaden, die zum pulmonalvaskulären Umbau führen könnten und mit FGF- und SHH- Signalwegen assoziiert sind: **A)** direkt, **B)** autokrin und **C)** parakrin. Die Expression von FGF1, FGF9 oder FGF10 könnte in einer Dimerisierung des FGFR2 resultieren. **A)** Dies würde zur Autophosphorylierung des FGFR2 und Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT führen. ERK1/2 könnte über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors ETV5 die Transkription von CCND1 induzieren. Alternativ könnte die Transkription von CCND1 über den AKT-Signalweg unabhängig von ETV5 initiiert werden. CCND1 aktiviert die Transkription von Genen, die die Zellen in die S-Phase (Replikationsphase) des Zellzyklus passieren lassen. **B)** ETV5 führt zur Expression von SHH. SHH freigesetzt, bindet an seinen Rezeptor PTCH1/2 derselben Zelle, wodurch die Inhibition von SMO aufgehoben wird. SMO setzt eine GLI2-abhängige Transkription von CCND1 in Gang. **C)** SHH bindet an PTCH1/2 einer anderen Zelle, wodurch die GLI2-CCND1-Signalkaskade eingeleitet wird. CCND1-Expression triggert die Proliferation assoziiert mit pulmonalvaskulären Umbau. Blaue Pfeile: Protein-Expressionsdaten aus eigenen Untersuchungen. Grüne Pfeile: mRNA-Expressionsdaten aus eigenen Untersuchungen. Blaue Eckpfeile: Daten aus eigenen Knockdown-Experimenten. TF: Transkriptionsfaktor.

4.2 Wirkungen von CSE auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC

In der vorliegenden Arbeit waren ETV5, PTCH1, SMO und GLI2 auf mRNA-Ebene bei COPD-Patienten hochreguliert. ETV5, PTCH1, SMO und GLI1 konnten zudem in der

Muskelschicht der Gefäße von COPD-Patienten lokalisiert werden. Um die Beobachtungen in den Muskelzellen der pulmonalen Gefäße zu erklären, wurden im Rahmen dieser Arbeit PASMC nach akuter bzw. chronischer CSE-Inkubation untersucht.

4.2.1 Effekte einer akuten CSE-Exposition auf die Genexpression

Auf molekularer Ebene beeinflusst CSE die Expression diverser Gene, die u. a. für Transkriptionsfaktoren (z. B. NF- κ B), Wachstumsfaktoren (z. B. VEGF) und Zytokine (z. B. IL-8, TNF- α) kodieren [176, 177]. In der vorliegenden Arbeit führte eine akute Stimulation mit 3%igem CSE zu einer signifikanten Hochregulation der mRNA-Expression von FGF9 in hPASMC, was mit den Resultaten bei COPD-Patienten übereinstimmt. Die Expression von FGF9 in den SMC der pulmonalen Gefäße, Atemwege, Alveolarkanäle und -säckchen wurde bereits durch *Coffey et al.* gezeigt [119]. Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass FGF9 eine Rolle bei der Regulation der Differenzierung und Proliferation von Atemwegs-SMC durch die Wechselwirkung mit SHH während der Lungenentwicklung spielt [178]. Außerdem wurde dieser Wachstumsfaktor mit der Pathogenese von idiopathischer Lungenfibrose assoziiert [119]. Welche Bedeutung FGF9 für die Pathogenese von COPD-PH hat, wurde bisher nicht untersucht. In hPASMCs konnte die mRNA von FGF2, FGF7 und FGFR1 gemessen werden, die akute Inkubation mit CSE zeigte jedoch keine Effekte auf die mRNA-Expression. Die mRNA von FGF1, FGF10 und FGFR2 in hPASMC konnte nicht nachgewiesen werden. Andere Studien haben hingegen über die Expression von FGF10 und seinem Rezeptor FGFR2 in dem muskulären Kompartiment der humanen und murinen Lunge berichtet [179–181]. FGF10 und FGFR2 wurden mittels immunhistochemischer Färbungen in der Muskelschicht der pulmonalen Gefäße, die Umbauprozesse aufwiesen, bei Patienten mit bronchopulmonaler Dysplasie lokalisiert [181]. An dieser Stelle sollte jedoch betont werden, dass sich die experimentellen Techniken und die verwendeten Modelle in der Studie von *Chao et al.* [181] von denen der vorliegenden Arbeit unterscheiden und aus diesem Grund kein direkter Vergleich der Ergebnisse möglich ist.

Die akute Stimulation von hPASMCs mit 3%igem CSE führte zu einer erhöhten Expression von ETV5 und SPRY2, vergleichbar mit den Resultaten in Lungenhomogenaten von COPD-Patienten ist. Auf Proteinebene konnte man hingegen eine Herunterregulation von ETV5 und

SPRY2 beobachten, welche z. B. mit einer posttranslationalen Modifikation wie Ubiquitinierung zusammenhängen könnte, die möglicherweise durch CSE verursacht wurde. ETV5 wird durch das Ubiquitin-Proteasom-System reguliert und ist ein relativ instabiles Protein [152]. In der posttranslationalen Regulation von ETV5 spielt die E3 *Cullin-Really interesting new gene-Ubiquitin-Ligase 4* (CRL4) eine Rolle. Über die Bildung eines CRL4^{COPI/DET1} Komplexes kommt es zur Ubiquitinierung und zur proteosomalen Degradation von ETV5, welche in der Lungenmorphogenese und Tumorsuppression eine wichtige Rolle spielen [152, 182, 183]. In Typ-II-Alveolarepithelzellen führt eine ERK-RAS-Signalweg-abhängige Inaktivierung von CRL4^{COPI/DET1} zur ETV5 Stabilisierung, die mit der Aufrechterhaltung des Typ-II-Alveolarepithelzell-Phänotyps und der Lungenhomöostase assoziiert ist [152]. Darüber hinaus wurden die E3-Ubiquitin Ligasen mit vielen respiratorischen Erkrankungen wie z. B. akutem Lungenversagen und COPD, assoziiert [183]. So führt CSE zur Akkumulation und Aggregation von polyubiquitinierten Proteinen in Lungenepithelzellen sowie in den Lungen von Zigarettenrauch-exponierten Mäusen, was mit einer erhöhten Expression von Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-Systems in Zusammenhang steht [184, 185]. Für SPRY2 wurden bisher drei E3 Ubiquitin-Ligasen identifiziert [186, 187]. Es ist bisher nicht bekannt, ob diese Ligasen durch CSE beeinflusst werden. Um zu klären, ob die Expression von ETV5 und SPRY2 durch CSE-induzierte Aktivierung von E3 Ubiquitin-Ligasen herunterreguliert wird, sollte die Aktivität von E3-Ubiquitin-Ligasen in hPASCs nach einer CSE-Stimulation untersucht werden.

Während der Lungenmorphogenese initiiert ETV5, welches durch den FGF10-FGFR2-Signalweg induziert wird, die Expression von SHH im Lungenepithel [164]. SHH hemmt wiederum die Expression von FGF10 im Mesenchym. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus ist ein essenzieller Prozess der Lungenentwicklung, weil dadurch eine Lungenmorphogenese gewährleistet wird [164]. Die in dieser Arbeit durchgeführten *Knockdown*-Experimente zeigten, dass ETV5 die Expression von SHH und SPRY2 auf Proteinebene induziert, während SPRY2 die Expression von ETV5 hemmt.

Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass hPASCs die Gene des SHH-Signalweges wie SHH, PTCH1, PTCH2, SMO, GLI1, GLI2, HHIP und DISP1 exprimieren. Wang *et al.* konnten die mRNA-Expression von SHH, PTCH1, PTCH2, GLI1 und GLI2 sowie die Protein-Expression von SHH-N und PTCH1 in

hPASMC ebenfalls nachweisen [188]. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit haben *Wang et al.* jedoch keine Expression von HHIP und DISP1 untersucht. In der vorliegenden Arbeit führte eine akute Stimulation mit 3%igem CSE zu einer Abnahme des PTCH1-Proteins in hPASMC, während weder SHH-Vorläufer noch SHH-N auf Proteinebene reguliert waren. Viele Studien haben bereits über die Dysregulation des SHH-Signalweges in Zigarettenrauch-induzierten Lungenerkrankungen berichtet [169, 171, 189, 190]. Die 24-stündige CSE (5%ig) -Exposition von Typ-II-Alveolarepithelzellen resultierte in einer Herunterregulation von PTCH1, welche mit einer erhöhten Apoptose korrelierte [191]. Zudem resultierte eine Überexpression von SHH in einer reduzierten Apoptose. Durch die Beobachtung, dass die akute CSE-Exposition zu einem reduzierten PTCH1-Protein Spiegel führt, ist es denkbar, dass die hPASMC ähnlich wie die Typ-II-Alveolarepithelzellen auf die CSE-Exposition reagieren könnten. Eine CSE-vermittelte Hemmung des SHH-Signalweges könnte mit einer erhöhten Apoptose und inhibierten Proliferation von hPASMCs im Zusammenhang stehen.

4.2.2 Effekte chronischer CSE-Exposition auf die Genexpression

Studien zufolge gibt es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem chronischen Zigarettenkonsum und der Entwicklung von COPD [192, 193]. Daher war es in dieser Arbeit wichtig, die Effekte einer Langzeitexposition mit CSE auf die Zellen zu untersuchen.

Die chronische Stimulation von hPASMC mit 1%igem CSE bewirkte neben einer Hochregulation von FGF9-mRNA eine Zunahme von FGF2-mRNA, was einen Unterschied zu den Resultaten aus dem akuten CSE-Modell darstellt. Darüber hinaus waren FGF2 und FGF7 die mit am stärksten exprimierten Gene der FGF-Familie in hPASMC, was ein Hinweis auf die potenzielle Bedeutung dieser Gene für die Funktion von hPASMC sein könnte. FGF2 weist mitogene Eigenschaften auf und kann die SMCs zur Proliferation stimulieren [194]. Mehrere Studien haben über eine potenzielle Rolle von FGF2 im pulmonalvaskulären Umbauprozess und für die Entstehung von PH berichtet [194–197]. Erhöhte Spiegel von FGF2 wurden in Blut und Urin von IPAH-Patienten gemessen [196]. An einem Monocrotalin-Rattenmodell für PH wurde demonstriert, dass die Inhibition von FGF2 die Entwicklung von PH revertieren kann [196]. Laut Literatur ist die pathologische Rolle von FGF2 bei PH auf seine autokrinen und parakrinen Funktionen zurückzuführen

[194]. *Black et al.* konnten zeigen, dass exogenes FGF2 die Expression von endogenem FGF2 in PASMC von Schafen erhöhen kann [197]. Dies deutet auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus hin, welcher zur PASMC Proliferation und zum pulmonalvaskulären Umbau beitragen könnte [197]. Zusätzlich konnten *Black et al.* zeigen, dass der Anstieg des FGF2 in PASMC durch erhöhte Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies verursacht wird und auf die Aktivierung der NADPH-Oxidase zurückzuführen ist. In Bezug auf eigene Daten kann vermutet werden, dass chronische CSE-Exposition, welche zum oxidativen Stress führt, den zuvor beschriebenen, positiven Rückkopplungsmechanismus mit Beteiligung von FGF2 in hPASMC aktiviert, welcher wiederum zum pulmonalvaskulären Umbau führen könnte.

Ähnlich wie die akute, führt auch die chronische Behandlung mit 0,5 und 1%igem CSE zu einer Abnahme der Protein-Expression von ETV5 bei unveränderter mRNA-Expression von ETV5 in hPASMC. In Bezug auf die Protein-Expression von SPRY2 bewirkte die chronische Applikation von 1%igem CSE eine Zunahme des SPRY2-Proteins, was sich von den Daten aus dem akuten CSE-Modell unterscheidet. Es ist denkbar, dass die durch chronisches CSE induzierte Erhöhung des SPRY2-Proteins mit der Abnahme der ETV5 Protein-Expression in Zusammenhang stehen könnte. Das unterstreichen die Resultate der *Knockdown*-Experimente an hPASMCs, welche gezeigt haben, dass der Knockdown von SPRY2 zu einer erhöhten Protein-Expression von ETV5 führt. *Sarkar et al.* konnten zeigen, dass eine erhöhte Proliferation von hPASMC, infolge einer akuten Hypoxie-Exposition, zu einer Herunterregulation von SPRY2 Protein-Expression führt [198]. Die Autoren demonstrierten zudem, dass SPRY2-Expression durch miR-21 reguliert wird, deren Expression in hPASMC durch die akute Hypoxie erhöht war [198]. Mit Blick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit könnte dies bedeuten, dass die durch chronisches CSE-verursachte Abnahme der Proliferation von hPASMC mit der Hochregulation von SPRY2-Expression assoziiert ist. Die potenzielle Rolle von miR-21 als *upstream* Regulator der SPRY2-Expression im chronischen CSE-Modell wäre denkbar, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Frühere Studien zeigten, dass CSE zu einer abnormalen Aktivierung des SHH-Signalwegs bei respiratorischen Erkrankungen, einschließlich der COPD, führt [171, 190, 199, 200]. In der vorliegenden Arbeit konnte beobachtet werden, dass die chronische CSE-Exposition die

mRNA-Expression von Genen des SHH-Signalweges, darunter PTCH2, DISP1 und HHIP, beeinflusst. Alle drei Gene zeigten eine erhöhte mRNA-Expression, die außerdem mit den Ergebnissen von COPD-Patienten übereinstimmt. *Lemjabbar-Alaoui et al.* zeigten, dass eine chronische CSE (48 Std.)-Inkubation den SHH-Signalweg in den primären humanen bronchialen Epithelzellen aktivieren kann [190]. Diese Aktivierung wurde mit der Initiation, Aufrechterhaltung, Proliferation und dem Überleben von CSE-transformierten bronchialen Epithelzellen in Verbindung gebracht [190]. Die Resultate einer weiteren Studie ergaben erhöhte Proteinspiegeln von Genen des SHH-Signalweges, darunter SHH, GLI1 und SMO in humanen Alveolarepithelzellen, die für 12, 24 und 48 Std. mit Nikotin behandelt wurden [201]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Nikotin die Konzentration von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und TNF- α sowie jene von anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 erhöht [201]. Dies lässt darauf schließen, dass dem SHH-Signalweg über die Regulation von inflammatorischen Zytokinen eine Schlüsselrolle in der CSE-induzierten Atemweg-Inflammation zukommt. Ob auch die hier beobachteten CSE-vermittelten Veränderungen des SHH-Signalweges mit der Inflammation bei COPD-PH verbunden sein könnten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

4.2.3 Effekte der akuten und chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASC

Die Proliferation von SMC in der Gefäßwand wird als eine der wichtigsten pathologischen Veränderungen in der Pathogenese von PH angesehen [202]. Über die Effekte von CSE auf die Zellproliferation herrscht jedoch in der Literatur Uneinigkeit. CSE hat einen hemmenden Effekt auf die Proliferation von pulmonalen EC, Typ-II-Alveolarepithelzellen und Lungen-Fibroblasten, und es induziert zeitgleich die Proliferation von PASC und der Atemwegs-SMC [86, 203–209]. Dabei wirken niedrige Konzentrationen von CSE pro-proliferativ auf die PASC, während höhere Konzentrationen zur Apoptose von PASC führen [206]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hemmung der Proliferation nach akuter und chronischer CSE-Inkubation in hPASC beobachtet. Die Diskrepanz zwischen den Resultaten einzelner Studien könnte auf die Unterschiede im Prozess der CSE-Herstellung und/oder auf die Dauer der CSE-Inkubation zurückzuführen sein.

CCND1 ist ein wichtiges Protein für die Regulation der Zellproliferation, welches den Übergang der Zellen aus der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus stimuliert [210]. In dieser Arbeit bewirkte die akute CSE-Exposition eine Reduktion der CCND1-Protein-Expression in hPASMC. Die chronische Inkubation mit CSE hatte dagegen keinen Einfluss auf die Expression von CCND1 und führte zur reduzierten PCNA und KI67-Expression. Die Daten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Hemmung der hPASMC-Proliferation durch die akute CSE-Exposition möglicherweise über die Herunterregulation von CCND1 und KI67 vermittelt wird. Die reduzierte Proliferation von hPASMC aufgrund der chronischen CSE-Exposition scheint dagegen CCND1-unabhängig zu sein, könnte allerdings mit der Herunterregulation von PCNA und KI67 zusammenhängen. Sowohl nach akuter als auch nach chronischer CSE-Exposition war die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT unverändert. In Ratten-PASMC (rPASMC) wurde gezeigt, dass 2% CSE zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 sowie einer erhöhten Proteinexpression von Cyclin E1 führt. *Knockdown* von ERK1/2 führte zu einer Reduktion der Cyclin E1-Expression und zur Proliferation von rPASMC [140]. In einer weiteren Studie, wurde gezeigt, dass die erhöhte Proliferation von rPASMC nach Inkubation mit 2%igem CSE über eine *connective tissue growth factor*-vermittelte Hochregulation von CCND1 induziert wird [211]. Die Stimulation von humanen respiratorischen Zellen mit 5%igem CSE hatte eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung zur Folge [141]. Die Inkubation von bovinen Atemwegs-SMC mit CSE (15%ig) führte zu einer Zunahme der Proliferation, die mit einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1/2 und einer Hochregulation des CCND1-Proteins assoziiert war [212]. Die unterschiedlichen Resultate könnten auf die Unterschiede in den untersuchten Zelltypen, den Spezies sowie der verwendeten CSE-Konzentration ebenso zurückzuführen sein wie auf die Dauer der CSE-Exposition.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass ETV5, SPRY2 und SHH einen Einfluss auf die Proliferation von hPASMC nach Stimulation mit CSE und hEC-Kulturüberstand (zweiter Stimulus) haben. In nichtstimulierten hPASMC führte der ETV5- und SHH-*Knockdown* zu reduzierten Spiegeln von CCND1, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass ETV5 bzw. SHH die Proliferation von hPASMCs über CCND1 regulieren. Die durch SHH hervorgerufene Herunterregulation von PCNA und KI67 könnte auf andere potenzielle Mechanismen hindeuten, welche die Proliferation von hPASMC regulieren. In diesem Zusammenhang

führt eine Inhibition von SHH zur reduzierten Expression von PCNA in den interstitiellen renalen Fibroblasten von Ratten, welche mit einer Hemmung der Proliferation verbunden ist [213].

Zusammengefasst zeigen die Resultate der *Knockdown*-Experimente, dass die Proliferation von hPASMC unter CSE-Exposition durch das Fehlen von ETV5, SPRY2 bzw. SHH nach Stimulation mit EC-Kulturüberstand gehemmt wird. Sowohl die akute als auch die chronische CSE-Exposition hatten einen negativen Einfluss auf die Proliferation von hPASMC und waren mit einer verminderten Expression der Proliferationsmarker PCNA (bei chronischer CSE-Exposition), CCND1 (bei akuter CSE-Inkubation) und KI67 verbunden. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Modelle für die Erforschung von pulmonalvaskulären Umbauprozessen, die mit einer erhöhten SMC-Proliferation assoziiert sind, nur indirekt geeignet sind. In Zukunft sollte daher auf Modelle wie z. B. Co-Kultur zurückgegriffen werden und ggf. neue Zellmodelle etabliert werden.

4.3 Effekte von hEC auf die Genexpression und Proliferation von hPASMC

Die EC-SMC-Interaktionen sind in den physiologischen Prozessen des kardiovaskulären Systems insbesondere für die Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus der Blutgefäße und des Blutdruckes von großer Bedeutung [214, 215]. Die Kommunikation zwischen EC und SMC beruht entweder auf der Diffusion von sekretierten Molekülen (z. B. NO), Hormonen (z. B. Prostazyklin, ET-1 und Angiotensin II) sowie Faktoren (z. B. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) oder auf den Zell-Zell-Kontakten (z. B. *gap junctions*) [215, 216].

Eine Verletzung oder Dysfunktion des Endothels ist mit einer exzessiven Freisetzung von parakrinen Substanzen durch die EC verbunden [217]. Die sekretierten Substanzen können als Wachstumsfaktoren die Proliferation von SMC induzieren [8, 217, 218].

In der vorliegenden Arbeit wurden die parakrinen EC-SMC-Interaktionen im Kontext mit Zigarettenrauch-assoziiertem pulmonalvaskulären Umbau untersucht.

Es konnte demonstriert werden, dass CSE allein zur Hemmung von Proliferation von hPASMC führt und der EC-Kulturüberstand nach CSE diesen Effekt aufheben kann. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass von hEC-sekretierte, lösliche Faktoren für die PASMC-Proliferation wichtig sind. Es ist bekannt, dass die EC die kontraktilen Eigenschaften sowie

Hyperplasie und Hypertrophie von SMC modulieren [219, 220]. Die Inkubation von PASMC mit pulmonalarteriellen EC-Kulturüberstand fördert die PASMC-Proliferation und dieser Effekt wird durch die Verwendung von pulmonalarteriellen EC bei IPAH-Patienten verstärkt. Der pulmonalvaskuläre Umbau bei IPAH ist mit veränderten EC-SMC-Interaktionen assoziiert [217].

EC sekretieren Substanzen wie z. B. ET-1 und Serotonin (*5-hydroxytryptamine*, 5-HT), die pro-proliferativ auf PASMC wirken [217, 218, 221]. Die Patienten mit COPD-PH weisen erhöhte Spiegel von ET-1 in humanen pulmonalarteriellen mikrovaskulären EC sowie im Sputum und Blutplasma auf, was auf die Rolle von ET-1 bei pathologischen Veränderungen der pulmonalen Gefäße schließen lässt [64, 88, 90, 221]. Bei PAH kann ET-1 über die Aktivierung von ERK1/2-Cyclin die Proliferation und Hyperplasie von PASMC induzieren [222, 223]. 5-HT kann ebenfalls eine proliferative Wirkung auf hPASMC aufweisen [217, 218]. Bei IPAH wird 5-HT in pulmonalarteriellen hEC verstärkt exprimiert und trägt zur hPASMC-Hyperplasie bei [217]. Eine erhöhte Konzentration von 5-HT, die im Blut von COPD-Patienten gemessen wurde, könnte mit einer abnormalen Proliferation von hPASMC bei COPD-PH zusammenhängen [224].

Neben der hPASMC-Proliferation modulierte hEC-Kulturüberstand die Expression von FGF- und SHH-assoziierten Genen. Während CSE allein zu einer Herunterregulation von HHIP und einer Hochregulation von SMO, DISP1 und FGF7 führte, wurden diese Effekte durch EC-Kulturüberstand nach CSE aufgehoben. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die pro-proliferativen Effekte von hEC auf hPASMC mit einer vermehrten Expression von HHIP zusammenhängen. Gestützt wird diese Annahme durch die stark erhöhte Expression von HHIP in den COPD-Lungen. Eine signifikante Abnahme von SMO, DISP1 und FGF7 infolge der Inkubation mit dem hEC-Kulturüberstand könnte hingegen auf die anti-proliferativen Effekte von beiden Genen hindeuten. Es wird angenommen, dass FGF7 in den epithelialen Reparaturprozessen der Lunge eine essenzielle Rolle spielt [225]. FGF7 kann die Proliferation von Typ-II-Alveolarepithelzellen *in vitro* und *in vivo* induzieren [226]. Zusätzlich ist aus der Literatur bekannt, dass FGF7 die Gewebeschäden minimiert, den Reparaturprozess von geschädigtem Epithel beschleunigt und die Inflammation in den Atemwegen unterdrückt [227]. Außerdem wird vermutet, dass FGF7 eine protektive Rolle bei der Bleomycin-induzierten Fibrose, der Hyperoxie-assoziierten Lungenschädigung, beim

akuten respiratorischen Syndrom sowie bei COPD spielt [124, 225, 228–230]. Das FGF7-Protein könnte also den Reparaturprozess der Lungen von Rauchern und von Personen, die ein erhöhtes Risiko haben an COPD zu erkranken, fördern.

Die Stimulation von hPASMC mit hEC-Kulturüberstand hat keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von FGF2 gezeigt. Es wurde lediglich eine Zunahme der FGF2-mRNA infolge der CSE-Inkubation unabhängig von der Stimulation mit EC-Kulturüberstand beobachtet. Generell ist aber bekannt, dass FGF2 eine essenzielle Rolle bei den Interaktionen zwischen den PASMC und EC im pathologischen Kontext zukommt [196, 231, 232]. Viele Studien legen dabei den Schwerpunkt auf das durch ECs sekretierte FGF2, welches durch autokrine und parakrine Mechanismen sowohl für ihre eigene Proliferation als auch für die Proliferation von hPASMC von Bedeutung ist [196, 231]. So ist das endotheliale FGF2 bei IPAH stark überexprimiert und trägt zur Hyperplasie von SMC und zum Fortschreiten der Erkrankung bei Mensch und Ratte bei [196]. Aufgrund der Gemeinsamkeiten in der Pathobiologie von IPAH und COPD-PH (z. B. SMC-Hyperplasie, endotheliale Dysfunktion und extensiver pulmonalvaskulärer Umbau [233, 234]) ist es wahrscheinlich, dass eine veränderte Expression von FGF2 an der Dysregulation von Interaktionen zwischen PASMC und EC beteiligt ist.

Weiterhin führte die Stimulation von hPASMC mit hEC-Kulturüberstand zu einer veränderten Expression von Zielgenen des FGF-Signalweges. Der hEC-Kulturüberstand in Kombination mit CSE bewirkte eine Abnahme der mRNA-Expression von ETV5 im Vergleich zu CSE allein, während die mRNA-Expression von SPRY2 und SPRY4 signifikant hochreguliert war. Der negative Rückkopplungsmechanismus, bei dem ETV5 durch SPRY2 bzw. SPRY4 gehemmt wird, könnte auch für dieses Modell zutreffend sein.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit eine reduzierte mRNA-Expression von SHH in hPASMC infolge einer Stimulation mit EC-Kulturüberstand allein sowie in Kombination mit CSE detektiert werden. Die Aktivität von SHH ist von der MAPK-Phosphorylierung abhängig, welche wiederum durch den FGF-Signalweg reguliert wird [235]. Die hEC-vermittelte Hemmung der FGF-MAPK-Signalkaskade könnte also zur Herunterregulation von SHH in hPASMC führen. Auf eine hEC-vermittelte Hemmung des FGF-MAPK-Signalweges könnte z. B. die reduzierte mRNA-Expression von FGF7 und ETV5 sowie die Hochregulation von SPRY2 und SPRY4 hindeuten. Alternativ könnte eine SHH-vermittelte

HHIP-Hochregulation einen negativen Rückkopplungsmechanismus aktivieren, bei dem HHIP den SHH-Ligand abfängt, was zu einer Inhibition des SHH-Signalweges führt [236]. Die mRNA-Expression von HHIP war infolge einer Stimulation mit EC-Kulturüberstand in Kombination mit CSE verglichen mit CSE allein, signifikant hochreguliert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die hEC nach Stimulation mit CSE proliferativ auf die hPASCs wirken und somit zum Zigarettenrauch-induzierten Umbauprozess beitragen könnten. Der hEC-Kulturüberstand führt zu einer Dysregulation des FGF- und SHH-Signalweges in hPASCs unter dem Einfluss von CSE. Inwiefern eine solche Dysregulation des FGF- bzw. SHH-Signalwegs mit der hPASCs-Proliferation und mit dem pulmonalvaskulären Umbauprozess verbunden sein könnte, sollte in weiterführenden Untersuchungen an geeigneten Modellen überprüft werden.

4.4 Kritische Aspekte der verwendeten Modelle

4.4.1 Das humane Gewebe

Die Verwendung von humanem Biomaterial zu Forschungszwecken gewinnt zunehmend an Bedeutung. Das humane Gewebe wird u. a. in der prä-klinischen Forschung, zur Bewertung der Wirksamkeit und Sicherheit von Arzneimitteln, bei der Entwicklung von Biomarkern und bei der Prä-Selektion von Patienten eingesetzt [237–239]. Durch die Verwendung von humanem Gewebe zur Erforschung von Erkrankungen kann Tierversuchszahl reduziert werden. Ein möglicher Nachteil von Studien an Tiermodellen liegt in der Variation zwischen den Spezies, wie etwa der Unterschied in der Anatomie des Respirationstraktes und der Atmung sowie in den Genexpressionsprofilen der Lunge [240, 241]. Die humane COPD ist eine heterogene Erkrankung mit unterschiedlichen Manifestationen z. B. Emphysem, chronische Bronchitis und PH [242]. Dementsprechend können die Tiermodelle nur einige individuelle Merkmale und nicht die komplette klinische Komplexität der humanen Erkrankung widerspiegeln [238, 238, 241, 243]. Dazu kommt, dass die Daten aus Tiermodellen schwer interpretierbar sein können oder sich bei COPD-Patienten nicht bestätigen lassen [243].

Das Arbeiten mit humanen Gewebeproben ist im Hinblick auf molekularbiologische Analysen auch mit Einschränkungen verbunden. Im Zuge einer chirurgischen Entnahme

eines Organs kommt es zu einer vorübergehenden warmen *in vivo* Ischämie (Mangeldurchblutung) [244]. Einige Studien haben gezeigt, dass während einer warmen Ischämie die RNA zwar intakt bleibt, es jedoch zu Veränderungen in der Genexpression von unterschiedlichen Genen kommen kann, die mit der Inflammation, Zell-Zyklus Regulation und Apoptose assoziiert sind [244–246]. Außerdem können bestimmte Proteine (z. B. pAKT) de-phosphoryliert werden [247, 248]. Diese Veränderungen können einen Einfluss auf die Resultate der molekularbiologischen Analysen haben.

Des Weiteren ist das Lungenhomogenat aus vielen unterschiedlichen Zelltypen zusammengesetzt, sodass die Signale einzelner Zelltypen durch andere Zelltypen verdeckt bleiben können und es zu falschen positiven oder falschen negativen Resultaten kommen kann.

4.4.2 Das Zellmodell

Die Verwendung von CSE zur Exposition von Zellen ist eine weitverbreitete und allgemein akzeptierte *in vitro* Methode. Diese bietet die Möglichkeit die Effekte von CSE und die zugrundeliegenden Mechanismen in den spezifischen COPD-relevanten Zelltypen zu untersuchen [249]. Zur Pathogenese von COPD tragen viele Zelltypen (u. a. SMC, EC, Fibroblasten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen) bei, die unterschiedlich auf die Stimulation mit CSE reagieren können [250–252].

Bei der Methode zur CSE-Gewinnung werden sowohl die Partikel- als auch Gasphase-Komponenten des Zigarettenrauchs im Medium gelöst. In der vorliegenden Arbeit wurde nicht untersucht, welche Komponenten des CSE bei der CSE-Herstellung im Medium gelöst sind und in welchen Konzentrationen diese vorliegen [62]. Zudem gibt es keine standardisierten Protokolle zur Herstellung von CSE, was den Vergleich der experimentellen Daten unterschiedlicher Studien schwierig macht [192, 253].

Um die Zellinteraktionen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Zellkulturüberstände von hEC zur Stimulation von hPASMIC verwendet. Die Verwendung des Zellkulturüberstandes hat gegenüber einer direkten Co-Kultur den Vorteil, dass diese Methode einen geringeren technischen Aufwand mit sich bringt [254]. Allerdings fehlt beim Verwenden eines konditionierten Mediums der Zell-Zell-Kontakt [255]. Eine direkte Kommunikation von Zellen z. B. über die *gap junctions* ist bedeutsam für viele physiologische zelluläre Prozesse,

einschließlich des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und des Zelltodes, sodass der Verlust von solchen Zell-Zell-Kontakten zu Veränderungen in der zellulären Homöostase führt [256]. Die hEC und hPASC sind physikalisch und metabolisch über die myoendothelialen *gap junctions* miteinander verbunden, welche essenziell für die physiologischen (z. B. Differenzierung von PASC, Vasodilatation) und pathologische Mechanismen (z. B. pulmonalvaskulärer Umbau in PH) sind [257–259]. Eine direkte Co-Kultur von hEC und hPASC würde die pathologischen Prozesse von Patienten besser reflektieren, da die Zell-Zell-Interaktionen sowohl über den parakrinen Signalweg als auch über die *gap junctions* für die Pathogenese von COPD enorm wichtig sind [256].

4.5 Ausblick auf weiterführende Experimente

Es gibt keine Heilung für COPD-PH und die Therapien konzentrieren sich hauptsächlich auf die Linderung von Symptomen. Das Endothel und der pulmonalvaskuläre Umbau sind die potenziellen Ansatzpunkte für zukünftige Therapien von COPD-PH. Zu den neusten Interventionen, die auf diese Ziele gerichtet sind, zählt die Stimulation löslicher Guanylatzyklen, die Inhibition von Phosphodiesterase, iNOS sowie hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase, welche allerdings noch nicht zugelassen sind [260]. Die Identifizierung neuer Therapieansätze gegen COPD-PH bedarf eines tiefgründigen Verständnisses der zellulären und molekularen Prozesse, die zur Pathogenese dieser Erkrankung beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurden FGF-Signalweg-assoziierte Gene als potenzielle Regulatoren der proliferativen Veränderungen von hPASC im Zusammenhang mit pulmonalvaskulären Umbau, induziert durch CSE, identifiziert. Um diese Beobachtungen zu bestätigen und sie zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze nutzen zu können, werden weitere Studien an humanem Material und an Zellmodellen benötigt. In weiterführenden Untersuchungen an Lungengewebe von COPD-Patienten wäre zu überprüfen, ob die Expression von FGF- und SHH-Familie Genen mit den Spirometrie-Parametern (z. B. FEV₁), dem GOLD Status, den COPD-Formen (chronische Bronchitis oder Emphysem), der Häufigkeit von Exazerbationen und der Dauer des Rauchens korreliert. Darüber hinaus könnte es von Interesse sein, einen möglichen Zusammenhang zwischen den Packjahren und

Diskussion

der Expression von FGF- und SHH-Familie Genen bei Rauchern ohne COPD zu untersuchen. Daraus könnte man die Rückschlüsse über eine mögliche Rolle dieser Signalwege in der Initiation der Zigarettenrauch-assoziierten COPD sowie über das Krankheitsrisiko und die Prognose ziehen.

Die Identifikation von einzelnen Zelltypen, in welchen sich eine veränderte Expression von FGF- und SHH-assoziierten Genen (z. B FGF7, DISP1 und HHIP) zeigt, könnte weitere Aufschlüsse über die Pathogenese von COPD bzw. COPD-PH bringen. Diesbezüglich könnte die Expression dieser Gene in den lasermikrodissektierten Kompartimenten der Lunge wie alveolären Septen, Bronchien und Gefäßen untersucht und mit den Daten in Lungengemengaten verglichen werden. Darüber hinaus könnten einzelne Zellpopulationen im Lungengewebe von COPD-Patienten mittels *Single-cell RNA sequencing* analysiert werden. Dabei können molekulare Unterschiede innerhalb einzelner Zellpopulationen der Lunge identifiziert werden, welche zur Pathogenese von COPD bzw. COPD-PH beitragen.

In der vorliegenden Arbeit induzierte CSE eine veränderte Genexpression und Proliferation von hPASMC. Unklar ist bis jetzt, welche der unterschiedlichen chemischen Komponenten des CSE für diese Effekte verantwortlich sind. Einige Studien konnten zeigen, dass Acrolein und Nikotin, die in CSE enthalten sind, eine Vielzahl von respiratorischen Prozessen beeinflussen können [261, 262]. Eine chronische Acrolein-Exposition induziert die Bildung von bronchialen Läsionen und Mukushyperplasie und Nikotin-Inhalation führt zu einem pulmonalen Ödem und zur Lungenschädigung bei Ratten [261, 262]. Eine Stimulation von PASMC mit Acrolein und Nikotin stellt einen möglichen experimentellen Ansatz dar, um die Effekte einzelner CSE-Komponenten auf PASMC im Hinblick auf pulmonalvaskulären Umbauprozess zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit beschränkte sich auf die Untersuchungen der Effekte von CSE auf hPASMC. Um jedoch ein besseres Verständnis von den Vorgängen bei einer COPD-Erkrankung zu bekommen, sollten noch andere krankheitsrelevante Zelltypen wie hEC, Lungenepithelzellen, Makrophagen und Fibroblasten in CSE-Experimenten untersucht sowie Co-Kultur Experimente durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist durch eine pathologische Druckerhöhung im pulmonalen Gefäßsystem definiert. PH geht mit einer erhöhten Mortalität von Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) einher. Ein charakteristisches Merkmal von COPD-PH ist der pulmonalarterielle Umbau, welcher mit der Proliferation der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC), Endothelzellen (EC) und Fibroblasten in der Gefäßwand assoziiert ist. Wenig ist jedoch über die zellulären und molekularen Mechanismen, die der COPD-PH zugrunde liegen, bekannt. Der Fokus dieser Arbeit ist es, neue Signalwege im Zigarettenrauch-assoziierten pulmonalen Gefäßumbauprozess und in der PH bei COPD zu identifizieren.

In den Lungenproben von COPD-Patienten konnte im Rahmen dieser Arbeit eine erhöhte Protein-Expression des Proliferationsmarkers CCND1 sowie eine erhöhte Phosphorylierung der extrazellulären signalregulierten Kinase 1/2 (ERK1/2) und AKT nachgewiesen werden. Molekularbiologische Untersuchungen zeigten eine Zunahme der mRNA-Expression von *fibroblast growth factor receptor 2* (FGFR2), FGF9, FGF10 und *ets variant transcription factor 5* (ETV5) sowie vielen Sonic Hedgehog (SHH)-Signalweg-assoziierten Genen z. B. *protein patched homolog 1* (PTCH1), PTCH2, *smoothed* (SMO), *protein dispatched homolog 1* (DISP1), *glioma-associated gene* (GLI2) und *hedgehog-interacting protein* (HHIP) in Lungen von COPD-Patienten. Zusätzlich wurden ETV5, PTCH1, SMO und GLI1 mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen in der glatten Muskelschicht der pulmonalen Blutgefäße lokalisiert. Des Weiteren führte der *Knockdown* von ETV5, SPRY2 sowie SHH nach chronischer Inkubation mit 1%igem *cigarette smoke extract* (CSE) und Stimulation mit hEC-Kulturüberstand (*second hit*) zu einer inhibierten Proliferation von humanen PASMC (hPASMC). Die Proliferation von hPASMC wurde außerdem negativ durch die akute und chronische CSE-Inkubation beeinflusst und war mit einer reduzierten Expression von Proliferationsmarkern (CCND1, PCNA und KI67) assoziiert. Durch die Inkubation von hPASMC mit hEC-Kulturüberstand unter CSE haben die hPASMC dagegen proliferiert. Zudem wurde festgestellt, dass die mRNA-Expression von HHIP infolge der Stimulation mit hEC-Kulturüberstand unter CSE im Vergleich zu CSE allein erhöht war, was auf eine potenzielle Rolle von HHIP in der Proliferation von hPASMC im Zigarettenrauch-assoziierten pulmonalvaskulären Umbau hinweisen könnte.

Zusammenfassung

Die Resultate dieser Arbeit deuten darauf hin, dass FGF- bzw. SHH-Signalwege in die Regulation der Proliferation von hPASMC im Zusammenhang mit COPD-PH involviert sind. Im pulmonalvaskulären Umbauprozess spielen die Interaktionen zwischen hPASMC und hEC eine potenzielle Rolle.

6 Summary

Pulmonary hypertension (PH) is characterized by a pathological pressure increase in the pulmonary arteries. PH in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is associated with higher mortality of the patients. The features of COPD-PH are the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC), endothelial cells (EC) and fibroblasts. However, less is known about the cellular and molecular mechanisms underlying PH associated with COPD. The aim of the present work is to identify new genes involved in cigarette smoke induced vascular remodeling and in COPD-PH.

In the lungs of COPD patients an increased expression of the proliferation marker CCND1 as well as an increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and AKT was observed. The screening results revealed an increased mRNA level of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2), FGF9, FGF10 and ets variant transcription factor 5 (ETV5) as well as of many genes belonging to the SHH-signalling pathway such as protein patched homolog 1 (PTCH1), PTCH2, smoothened (SMO), protein dispatched homolog 1 (DISP1), glioma-associated gene (GLI2) und hedgehog-interacting protein (HHIP) in the lungs of COPD patients. Additionally, using immunohistochemical analysis ETV5, PTCH1, SMO and GLI1 were localized in the smooth muscle cell layer of the blood vessel wall from human lungs. Knockdown of ETV5, SPRY2 and SHH resulted in decreased proliferation of human PASMC (hPASMC) after chronic exposure to 1% cigarette smoke extract (CSE) and stimulation with hEC supernatant. Acute and chronic CSE treatment resulted in decreased proliferation of hPASMC and decreased expression of proliferation markers (CCND1, PCNA and KI67). The incubation of hPASMC with hEC culture supernatant under CSE lead to proliferation of hPASMC. Additionally, the mRNA expression of HHIP in hPASMC was increased following stimulation with hEC culture supernatant under CSE compared to CSE only, indicating a potential role of this gene for hPASMC proliferation in cigarette smoke induced pulmonary vascular remodeling.

In conclusion, genes related to FGF and SHH pathways may play a role in proliferation of hPASMC involved in COPD-PH. Remodeling may involve the interactions of hEC with hPASMC.

7 Abkürzungen

AAT	Alpha-1-Antitrypsin
B	Bronchien
B ₂ M	β2 Mikroglobulin
BMP	knochenmorphogenetisches Protein (<i>bone morphogenetic protein</i>)
BMPR	knochenmorphogenetischer Protein Rezeptor (<i>bone morphogenetic protein receptor</i>)
bp	Basenpaare
BrdU	5'Brom-2'-Desoxyuridin (Bromdesoxyuridin)
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CCND1	Cyclin D1
CD8 ⁺	<i>cluster of differentiation 8⁺</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
cm ²	Quadratcentimeter
COP1	<i>constitutive photomorphometric 1</i>
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>)
CRL4	<i>E3 Cullin-Really interesting new gene-Ubiquitin-Ligase 4</i>
CSE	Zigarettenrauchextrakt (<i>cigarette smoke extract</i>)
Ct	Schwellenzyklus (<i>cycle threshold</i>)
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DISP1	<i>dispatched homolog 1</i>
DPBS	Dulbeccos's Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>dulbecco's phosphat buffered saline</i>)
EC	Endothelzellen (<i>endothelial cells</i>)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
ERK1/2	extrazelluläre signalregulierte Kinasen 1 und 2
et al.	und andere (<i>et alteri</i>)
ET-1	Endothelin-1
EtOH	Ethanol
ETS	<i>e26 transformation-specific</i>
ETV	<i>ets variant transcription factor</i>
FEV1	forciertes Expirationsvolumen in einer Sekunde (<i>forced expiratory volume</i>)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)

Abkürzungen

FGFR	Fibroblasten Wachstumsfaktor-Rezeptor (<i>fibroblast growth factor receptor</i>)
FVC	forcierte Vitalkapazität (<i>forced vital capacity</i>)
g	Gramm
G	Gefäß
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	gegebenenfalls
GLI	<i>glioma-associated oncogene</i>
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GOLD	<i>Global Initiative for Chronic Obstructive Pulmonary Disease</i>
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
hEC	humane Endothelzellen (<i>human endothelial cells</i>)
HHIP	<i>hedgehog-interacting protein</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hPASC	humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (<i>human pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
5-HAT	5-Hydroxytryptamin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>inducible nitric oxide synthase</i>)
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
JNK	C-Jun N-terminale Kinasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KI67	Antigen Ki67
l	Liter
M	Molar (Mol pro Liter)
mA	Milliampere
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
Min.	Minute
miR	microRNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MMP	Matrixmetalloproteinase
mPAP	mittlerer pulmonalarterieller Druck (<i>mean pulmonary arterial pressure</i>)

Abkürzungen

mRNA	<i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nukleusfaktor leichter κ-Ketten der aktivierten B-Zellen (<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid (<i>nitric oxide</i>)
NR	Nichtraucher
o. H.	obere Hälfte
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	pulmonalarterieller Druck (<i>pulmonary arterial pressure</i>)
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (<i>pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	Phosphatpufferlösung (<i>phosphat-buffered saline</i>)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDGF	Thrombozyten-abstammender Wachstumsfaktor (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PEA3	<i>polyomavirus enhancer activator-3</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PH	pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLCγ	Phospholipase Cγ
PTCH	<i>protein patched homolog</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	pulmonalvaskulärer Widerstand (<i>pulmonary vascular resistance</i>)
p-Wert	Wahrscheinlichkeitswert (<i>probability value</i>)
R	Raucher
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RCF	relative Zentrifugalbeschleunigung (<i>relative centrifugal force</i>)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rPASMC	Ratten pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (<i>rat pulmonary arterial smooth muscle cells</i>)
RTqPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>)
S	Septum
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>)
Sek.	Sekunde

Abkürzungen

SHH	Sonic Hedgehog
SHH-N	Sonic Hedgehog-N-Terminus
siR	kleine interferierende RNA ohne Zielsequenz (<i>random small-interfering RNA</i>)
siRNA	kleine interferierende RNA (<i>small-interfering RNA</i>)
SMC	glatte Muskelzellen (<i>smooth muscle cells</i>)
SMO	<i>smoothened</i>
SPRY	<i>sprouty homolog</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
Std.	Stunde
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBST	Trispufferlösung (<i>tris buffer saline</i>)
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
TGF- β R	transformierender Wachstumsfaktor- β -Rezeptor (<i>transforming growth factor β receptor</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u. a.	unter anderem/n
u. H.	untere Hälfte
V	Volt
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	Von-Willebrand-Faktor
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
z. B.	zum Beispiel
α -SMA	glattmuskuläres α -Aktin (<i>α-smooth muscle actin</i>)
β -MeEtOH	β -Mercaptoethanol
Δ	delta, Differenz
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
%	Prozent
(p-)	Phosphorylierung
$^{\circ}$ C	Grad Celsius

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Systemische Effekte und Begleiterscheinungen von COPD.....	7
Abbildung 2: Zelluläre und molekulare Mechanismen der pulmonalvaskulären Umbauprozesse und PH assoziiert mit COPD.	14
Abbildung 3: Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit der Lungenentwicklung und den Erkrankungen der Lunge.....	17
Abbildung 4: Repräsentative Bilder der Lungenschnitte von Nichtrauchern, Rauchern und COPD-Patienten.	32
Abbildung 5: Versuchsaufbau einer akuten CSE-Behandlung von hPASMC.....	39
Abbildung 6: Repräsentative Bilder der Muskularisierung von Lungengefäßen von Nichtrauchern, Rauchern und COPD.	42
Abbildung 7: Expression von FGF-Liganden und FGF-Rezeptoren in humanen Lungen. .	43
Abbildung 8: Erhöhte mRNA- und Protein Expression von ETV5 in humanen Lungen. ...	44
Abbildung 9: Lokalisation von ETV5 im humanen Lungengewebe.	45
Abbildung 10: Expression von SHH-Signalweg- assoziierten Genen in humanen Lungen.	46
Abbildung 11: Lokalisation von PTCH1 im humanen Lungengewebe.	47
Abbildung 12: Lokalisation von SMO im humanen Lungengewebe.....	47
Abbildung 13: Expression von SHH-Signalweg nachgeschalteten Genen in humanen Lungen.....	48
Abbildung 14: Co-Lokalisation von GLI1 im humanen Lungengewebe.....	49
Abbildung 15: CCND1 Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in COPD-Lungen.....	50
Abbildung 16: Einfluss einer akuten CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von FGF-Signalweg-assozierten Genen in hPASMC.....	51
Abbildung 17: Effekte der akuten CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von SHH-Signalweg-assozierten Genen in hPASMC.	52
Abbildung 18: Effekte einer CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASMC.	53
Abbildung 19: Effekte einer akuten CSE-Exposition auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASMC.	54
Abbildung 20: Effekte einer akuten CSE-Exposition auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in hPASMC.....	55

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Einfluss einer chronischen CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC.	56
Abbildung 22: Effekte einer chronischen CSE-Exposition auf die mRNA- und Protein-Expression von SHH-Signalweg assoziierten Genen in hPASC.	57
Abbildung 23: Effekte einer chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASC.	58
Abbildung 24: Expression von Proliferationsmarkern in hPASC nach chronischer CSE-Exposition.	59
Abbildung 25: Effekte einer chronischen CSE-Exposition auf die Phosphorylierung von ERK1/2 und AKT in hPASC.	60
Abbildung 26: Knockdown-Experimente zur Analyse der Wechselwirkungen zwischen ETV5, SPRY2 und SHH in hPASC.	61
Abbildung 27: Einfluss des ETV5-, SPRY2- bzw. SHH- Knockdowns auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC.	62
Abbildung 28: Einfluss des ETV5, SPRY2 bzw. SHH <i>Knockdowns</i> auf die Proliferation von hPASC nach chronischer CSE-Behandlung.	63
Abbildung 29: Effekte der hEC nach Stimulation mit CSE auf die Expression von FGF- und SHH-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC.	64
Abbildung 30: Proliferation von hPASC nach Stimulation mit hEC-Kulturüberstand nach CSE-Inkubation.	65
Abbildung 31: Modell für die Beteiligung der FGF- und SHH-Signalwege an der Pathogenese von COPD-PH.	72
Abbildung 32: 48 Std. SiRNA-Transfektion führt zur signifikant inhibierten mRNA-Expression von ETV5, SPRY2 und SHH in hPASC.	126
Abbildung 33: Western-Blots von ETV5 und SPRY2 in humanen Lungen.	126
Abbildung 34: Western-Blots von SHH, SHH-N und PTCH2 in humanen Lungen.	127
Abbildung 35: Western-Blots von CCND1, ERK1/2 und AKT in humanen Lungen.	128
Abbildung 36: Western-Blot von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC nach akuter CSE-Inkubation.	128
Abbildung 37: Western-Blots von SHH-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC nach akuter CSE-Inkubation.	129

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 38: Western-Blots von CCND1, ERK1/2 und AKT in hPASMC nach akuter CSE-Inkubation.....	130
Abbildung 39: Western-Blots von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASMC nach chronischer CSE-Inkubation.	130
Abbildung 40: Western-Blot von SHH in hPASMC nach chronischer CSE-Inkubation. .	131
Abbildung 41: Western-Blot von CCND1 und PCNA in hPASMC nach chronischer CSE-Inkubation.....	131
Abbildung 42: Western-Blots von ERK1/2 und AKT in hPASMC nach chronischer CSE-Inkubation.....	132
Abbildung 43: Western-Blots von ETV5, SPRY2 und SHH in hPASMC nach Knockdown.	133
Abbildung 44: Western-Blots von CCND1 und PCNA in hPASMC nach Knockdown von ETV5, SPRY2 und SHH.	134

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Einteilung der PH (verändert nach Simonneau et al. 2019 [2]).....	2
Tabelle 2: GOLD-Klassifizierung der COPD-Schweregrade	9
Tabelle 3: Charakteristika von Spendern und COPD-Patienten	31
Tabelle 4: Programm für die cDNA-Synthese	34
Tabelle 5: Programm für die RTqPCR.....	34

10 Literaturverzeichnis

1. Badesch, D.B., Champion, H.C., Sanchez, M.A.G., Hoeper, M.M., Loyd, J.E., Manes, A., McGoon, M., Naeije, R., Olschewski, H., Oudiz, R.J. and Torbicki, A. Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 55-66 (2009).
2. Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D.S., Denton, C.P., Gatzoulis, M.A., Krowka, M., Williams, P.G. and Souza, R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 53 (2019).
3. Simonneau, G., Galiè, N., Rubin, L.J., Langleben, D., Seeger, W., Domenighetti, G., Gibbs, S., Lebrec, D., Speich, R., Beghetti, M., Rich, S. and Fishman, A. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 43, 5-12 (2004).
4. Tuder, R.M., Abman, S.H., Braun, T., Capron, F., Stevens, T., Thistlethwaite, P.A. and Haworth, S.G. Development and pathology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 54, 3-9 (2009).
5. Galiè, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., Ghofrani, A., Gomez Sanchez, M.A., Hansmann, G., Klepetko, W., Lancellotti, P., Matucci, M., McDonagh, T., Pierard, L.A., Trindade, P.T., Zompatori, M. and Hoeper, M. ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* 37, 67–119 (2016).
6. Galiè, N., Hoeper, M.M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J.-L., Barbera, J.A., Beghetti, M., Corris, P., Gaine, S., Gibbs, J.S., Gomez-Sanchez, M.A., Jondeau, G., Klepetko, W., Opitz, C., Peacock, A., Rubin, L., Zellweger, M. and Simonneau, G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34, 1219–1263 (2009).

7. Barberà, J.A., Peinado, V.I. and Santos, S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21, 892–905 (2003).
8. Eddahibi, S., Chaouat, A., Morrell, N., Fadel, E., Fuhrman, C., Bugnet, A.-S., Dartevielle, P., Housset, B., Hamon, M., Weitzenblum, E. and Adnot, S. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 108, 1839–1844 (2003).
9. Chaouat, A., Bugnet, A.-S., Kadaoui, N., Schott, R., Enache, I., Ducoloné, A., Ehrhart, M., Kessler, R. and Weitzenblum, E. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172, 189–194 (2005).
10. Wright, J.L., Levy, R.D. and Churg, A. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease: current theories of pathogenesis and their implications for treatment. *Thorax* 60, 605–609 (2005).
11. Dias, C.A., Assad, R.S., Caneo, L.F., Abduch, M.C.D., Aiello, V.D., Dias, A.R., Marcial, M.B. and Oliveira, S.A. Reversible pulmonary trunk banding. II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 124, 999–1006 (2002).
12. Naeije, R. Pulmonary hypertension and right heart failure in chronic obstructive pulmonary disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2, 20–22 (2005).
13. Cottin, V., Le Pavec, J., Prevot, G., Mal, H., Humbert, M., Simonneau, G. and Cordier, J.-F. Pulmonary hypertension in patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema syndrome. *Eur Respir J* 35, 105–111 (2010).
14. Machado, R.D., Aldred, M.A., James, V., Harrison, R.E., Patel, B., Schwalbe, E.C., Gruenig, E., Janssen, B., Koehler, R., Seeger, W., Eickelberg, O., Olschewski, H., Elliott, C.G., Glissmeyer, E., Carlquist, J., Kim, M., Torbicki, A., Fijalkowska, A., Szewczyk, G., Parma, J., Abramowicz, M.J., Galie, N., Morisaki, H., Kyotani, S., Nakanishi, N., Morisaki, T., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O., Soubrier, F., Coulet, F., Morrell, N.W. and Trembath, R.C. Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Human Mutation* 27, 121–132 (2006).

15. Soubrier, F., Chung, W.K., Machado, R., Grünig, E., Aldred, M., Geraci, M., Loyd, J.E., Elliott, C.G., Trembath, R.C., Newman, J.H. and Humbert, M. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 13-21 (2013).
16. Rembath, R.C., Thomson J. R., Machado R. D., Morgan N. V., Atkinson C., Winship I., Simmoneau G., Galie N., Loyd J. E., Hummbert M., Nichols W. C. and Morell N. W. Clinical and Molecular Genetic Features of Pulmonary Hypertension in Patients with Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *The New England Journal of Medicine* 345, 325–334 (2001).
17. Chaouat, A., Coulet, F., Favre, C., Simonneau, G., Weitzenblum, E., Soubrier, F. and Humbert, M. Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 59, 446–448 (2004).
18. Morecroft, I., Heeley, R.P., Prentice, H.M., Kirk, A. and MacLean, M.R. 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *British Journal of Pharmacology* 128, 730–734 (1999).
19. Vogelmeier, C., Buhl, R. and Criece, C. Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD) - Antwort. *Pneumologie* 61, 551 (2007).
20. Barnes, P.J. Kinases as Novel Therapeutic Targets in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacological Reviews* 68, 788–815 (2016).
21. MacNee, W. Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2, 258–266 (2005).
22. Elbehairy, A.F., Ciavaglia, C.E., Webb, K.A., Guenette, J.A., Jensen, D., Mourad, S.M., Neder, J.A. and O'Donnell, D.E. Pulmonary Gas Exchange Abnormalities in Mild Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Implications for Dyspnea and Exercise Intolerance. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 191, 1384–1394 (2015).

Literaturverzeichnis

23. Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W. M., Buzatu, L., Cherniack, R. M., Rogers, R. M., Sciurba, F. C., Coxson, H. O., Paré, P. D. The Nature of Small-Airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine* 350 (2004).
24. Pauwels, R.A. and Rabe, K.F. Burden and clinical features of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *The Lancet* 364, 613–620 (2004).
25. Scanlon, P.D., Connett, J.E., Waller, L.A., Altose, M.D., Bailey, W.C., Buist, A.S. and Tashkin, D. Smoking Cessation and Lung Function in Mild-to-Moderate Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation* 20, 265 (2000).
26. Anthonisen, N.R., Connett, J.E. and Murray, R.P. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 166, 675–679 (2002).
27. Held, M. and Jany, B.H. Pulmonary hypertension in COPD. *Respiratory Care* 58, e86-91 (2013).
28. Barnes, P.J. and Celli, B.R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur Respir J* 33, 1165–1185 (2009).
29. Wouters, E.F.M., Groenewegen, K.H., Dentener, M.A. and Vernooy, J.H.J. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: the role of exacerbations. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4, 626–634 (2007).
30. Agustí, A. and Soriano, J.B. COPD as a systemic disease. *COPD* 5, 133–138 (2008).
31. NICE. Chronic obstructive pulmonary disease in over 16s: diagnosis and management. *National Institute for Health and Care Excellence*, 1–60 (2010).
32. Pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention. *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*, 1–33 (2017).
33. Rabe, K.F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P.J., Buist, S.A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C. and Zielinski, J. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176, 532–555 (2007).

34. Bousquet, J., ed. *Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases. A comprehensive approach*. WHO, Geneva (2007).
35. Murray, C.J.L. and Lopez A. D. The Global Burden of Disease. *The Harvard School of Public Health, WHO*, 1–43 (1996).
36. Han, M.K., Postma, D., Mannino, D.M., Giardino, N.D., Buist, S., Curtis, J.L. and Martinez, F.J. Gender and chronic obstructive pulmonary disease: why it matters. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176, 1179–1184 (2007).
37. Sansores, R.H. and Ramírez-Venegas, A. COPD in women: susceptibility or vulnerability? *Eur Respir J* 47, 19–22 (2016).
38. Bartal, M. COPD and tobacco smoke. *Monaldi Archives for Chest Disease* 63, 213–225 (2005).
39. Church, D.F. and Pryor, W.A. Free-Radical Chemistry of Cigarette Smoke and Its Toxicological Implications. *Environmental Health Perspectives* 64, 111 (1985).
40. Pryor, W.A. and Stone, K. Oxidants in Cigarette Smoke. Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. *Annals New York Academy of Sciences*, 12–27 (1993).
41. Behr, J. and Nowak, D. Tobacco smoke and respiratory disease. *Eur Respir J* 21, 161–179 (2002).
42. Fischer, B.M., Voynow, J.A. and Ghio, A.J. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 10, 261–276 (2015).
43. Valavanidis, A., Vlachogianni, T. and Fiotakis, K. Tobacco smoke: involvement of reactive oxygen species and stable free radicals in mechanisms of oxidative damage, carcinogenesis and synergistic effects with other respirable particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6, 445–462 (2009).
44. Repine, J.E., Bast, A., Lankhorst, I.D.A. and The Oxidative Stress Study Group. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156, 341–357 (1997).
45. MacNee, W. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *European Journal of Pharmacology* 429, 195–207 (2001).
46. Halliwell, B. Antioxidants in Human Health and Disease. *Annual Review of Nutrition* 16, 33–50 (1996).

Literaturverzeichnis

47. Dekhuijzen, P.N., Aben, K.K., Dekker, I., Aarts, L.P., Wielders, P.L., van Herwaarden, C.L. and Bast, A. Increased exhalation of hydrogen peroxide in patients with stable and unstable chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154, 813–816 (1996).
48. Barnes, P.J. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine* 343, 269–280 (2000).
49. Mezzetti, A., Lapenna, D., Pierdomenico, S. D., Calafiore, A. M., Costantina, F. C., Giuseppe, R. S. and Imbastaro, T., Neri, M., Cucurullo, F. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Arteriosclerosis*, 91–99 (1995).
50. Cosio, M.G., D, M., Saetta, M., Agusti, A. and From. Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine* 360, 2445–2454 (2009).
51. King, P.T. Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in cardiovascular disease and lung cancer. *Clinical and Translational Medicine* 4, 68 (2015).
52. Hautamaki, R.D., Kobayashi, D.K., Senior, R.M. and Shapiro, S.D. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science (New York, N.Y.)* 277, 2002–2004 (1997).
53. Drost, E.M., Skwarski, K.M., Sauleda, J., Soler, N., Roca, J., Agusti, A. and MacNee, W. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax* 60, 293–300 (2005).
54. Kao, R.C., Wehner, N.G., Skubitz, K.M., Gray, B.H. and Hoidal, J.R. Proteinase 3 A Distinct Human Polymorphonuclear Leukocyte Proteinase that Produces Emphysema in Hamsters. *J. Clin. Invest.* 82, 1963–1973 (1988).
55. Finlay, G.A., O’Driscoll, L.R., Russell, K.J., D’arcy, E.M., Masterson, J.B., Fitzgerald, M.X. and O’Connor, C.M. Matrix Metalloproteinase Expression and Production by Alveolar Macrophages in Emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156, 240–247 (1997).

56. Majo, J., Ghezzi, H., Cosio, M.G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *European Respiratory Journal* 17, 946–953 (2001).
57. Di Stefano, A., Capelli, A., Lusuardi, M., Balbo, P., Vecchio, C., Maestrelli, P., Mapp, C.E., Fabbri, L.M., Donner, C.F. and Saetta, M. Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158, 1277–1285 (1998).
58. Sana, A., Somda, S.M.A., Meda, N. and Bouland, C. Chronic obstructive pulmonary disease associated with biomass fuel use in women: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open Respiratory Research* 5 (2018).
59. Fullerton, D.G., Suseno, A., Semple, S., Kalambo, F., Malamba, R., White, S., Jack, S., Calverley, P.M. and Gordon, S.B. Wood smoke exposure, poverty and impaired lung function in Malawian adults. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 15, 391–398 (2011).
60. Balmes, J., Becklake, M., Blanc, P., Henneberger, P., Kreiss, K., Mapp, C., Milton, D., Schwartz, D., Toren, K. and Viegi, G. American Thoracic Society Statement: Occupational contribution to the burden of airway disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167, 787–797 (2003).
61. Viegi, G., Pistelli, F., Sherrill, D.L., Maio, S., Baldacci, S. and Carrozzi, L. Definition, epidemiology and natural history of COPD. *Eur Respir J* 30, 993–1013 (2007).
62. Adamson, J., Haswell, L.E., Phillips, G. and Gaça, M.D. In Vitro Models of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). *Chest*, 41-66 (2011).
63. Stoller, J.K. and Aboussouan, L.S. A review of α 1-antitrypsin deficiency. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 185, 246–259 (2012).
64. Elwing Jean and Panos Ralph J. Pulmonary hypertension associated with COPD. *International Journal of COPD* 3, 55–70 (2008).
65. Santos, S., Peinado, V.I., Ramírez, J., Melgosa, T., Roca, J., Rodriguez-Roisin, R. and Barberà, J.A. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J* 19, 632–638 (2002).
66. Gibbons, G. H., Dzau, V. J. The Emerging Concept of Vascular Remodeling. *The New England Journal of Medicine* 330, 1431–1437 (1994).

67. Voelkel, N.F., Quaife, R.A., Leinwand, L.A., Barst, R.J., McGoon, M.D., Meldrum, D.R., Dupuis, J., Long, C.S., Rubin, L.J., Smart, F.W., Suzuki, Y.J., Gladwin, M., Denholm, E.M. and Gail, D.B. Right ventricular function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure. *Circulation* 114, 1883–1891 (2006).
68. Magee, F., Wright, J.L., Wiggs, B.R., Pare, P.D. and Hogg, J.C. Pulmonary vascular structure and function in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 43, 183–189 (1988).
69. Peinado, V.I., Barberà, J.A., Ramírez, J., Gómez, F.P., Roca, J., Jover, L., Gimferrer, J.M. and Rodriguez-Roisin, R. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 274, 908-913 (1998).
70. Peinado, V.I., Barberá, J.A., Abate, P., Ramírez, J., Roca, J., Santos, S. and Rodriguez-Roisin, R. Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159, 1605–1611 (1999).
71. Gao, Y., Chen, T. and Raj, J.U. Endothelial and Smooth Muscle Cell Interactions in the Pathobiology of Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54, 451–460 (2016).
72. Engelen, M. P. KJ, Schols, M. M. W., Does, J. D., Deutz, N. E. P., Wouters, E. F. M. Altered Glutamate Metabolism Is Associated with Reduced Muscle Glutathione Levels in Patients with Emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161, 98–103 (2000).
73. Königshoff, M., Kneidinger, N., Eickelberg, O. TGF- β signaling in COPD: deciphering genetic and cellular susceptibilities for future therapeutic regimen. *Swiss Med WKLY* 139, 39–40 (2009).
74. Guignabert, C., Tu, L., Girerd, B., Ricard, N., Huertas, A., Montani, D. and Humbert, M. New molecular targets of pulmonary vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: importance of endothelial communication. *Chest* 147, 529–537 (2015).
75. Pittilo, R.M. Cigarette smoking, endothelial injury and cardiovascular disease. *International Journal of Experimental Pathology* 81, 219–230 (2000).

76. Kasahara, Y., Rubin, Tuder, R.M., Cool, D., Lynch, D.A. and Flores, S.C., Velkel, N.F. Endothelial Cell Death and Decreased Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 in Emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163, 737–744 (2001).
77. Ferrer, E., Peinado, V.I., Díez, M., Carrasco, J.L., Musri, M.M., Martínez, A., Rodríguez-Roisin, R. and Barberà, J.A. Effects of cigarette smoke on endothelial function of pulmonary arteries in the guinea pig. *Respiratory Research* 10, 76 (2009).
78. Li, J., Liu, S., Cao, G., Sun, Y., Chen, W., Dong, F., Xu, J., Zhang, C. and Zhang, W. Nicotine induces endothelial dysfunction and promotes atherosclerosis via GTPCH1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 22, 5406–5417 (2018).
79. Li, M., Qian, M., Kyler, K. and Xu, J. Endothelial-Vascular Smooth Muscle Cells Interactions in Atherosclerosis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 5, 151 (2018).
80. Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T. and Ignarro, L.J. Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights. *Journal of the American College of Cardiology* 62, 89–95 (2013).
81. Barberà, J.A., Peinado, V.I., Santos, S., Ramirez, J., Roca, J. and Rodriguez-Roisin, R. Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Arteries of Smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164, 109–713 (2001).
82. Adams, M.R., Jessup, W. and Celermajer, D.S. Cigarette Smoking Is Associated With Increased Human Monocyte Adhesion to Endothelial Cells: Reversibility With Oral L-Arginine but Not Vitamin C. *Journal of the American College of Cardiology* 29, 491–497 (1997).
83. Czernin, J. and Waldherr, C. Cigarette smoking and coronary blood flow. *Progress in Cardiovascular Diseases* 45, 395–404 (2003).
84. Yunchao, S., Weihong, H., Carlos, G., Yong, D. L., Edward, R. B. Effect of Cigarette Smoke Extract on Nitric Oxide Synthase in Pulmonary Artery Endothelial Cells. *J Resp Cell Mol Biology* 19, 819–825 (1998).
85. Seimetz, M., Parajuli, N., Pichl, A., Veit, F., Kwapiszewska, G., Weisel, F.C., Milger, K., Egemnazarov, B., Turowska, A., Fuchs, B., Nikam, S., Roth, M., Sydykov, A., Medebach, T., Klepetko, W., Jaksch, P., Dumitrascu, R., Garn, H., Voswinckel, R.,

- Kostin, S., Seeger, W., Schermuly, R.T., Grimminger, F., Ghofrani, H.A. and Weissmann, N. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 147, 293–305 (2011).
86. Nana-Sinkam, S.P., Lee, J.D., Sotto-Santiago, S., Stearman, R.S., Keith, R.L., Choudhury, Q., Cool, C., Parr, J., Moore, M.D., Bull, T.M., Voelkel, N.F. and Geraci, M.W. Prostacyclin prevents pulmonary endothelial cell apoptosis induced by cigarette smoke. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175, 676–685 (2007).
87. Sitbon, O. and Vonk Noordegraaf, A. Epoprostenol and pulmonary arterial hypertension: 20 years of clinical experience. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* 26 (2017).
88. Sang-Do, L., Dong-Soon, L., Yong-Gam, C., Tae-Sun, S., Chae-Man, L. Younsuck, K., Woo-Sung, K., Dong-Soon, K., Won-Dong, K. Cigarette smoke extract induces endothelin-1 via protein kinase C in pulmonary artery endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 281, 403–411 (2001).
89. Spiropoulos, K., Trakada, G., Nikolaou, E., Prodromakis, E., Efremidis, G., Pouli, A. and Koniavitou, A. Endothelin-1 levels in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Respiratory Medicine* 97, 983–989 (2003).
90. Giaid, A., Yanagisawa, M., Langleben, D., Michel, R. P., Levy, R., Shennib, H., Kimura, S., Masaki, T., Duguid, W. P., Stewart, D. J. Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *The New England Journal of Medicine* 328, 1732–1739 (1993).
91. Joppa, P., Petrasova, D., Stancak, B. and Tkacova, R. Systemic inflammation in patients with COPD and pulmonary hypertension. *Chest* 130, 326–333 (2006).
92. Sørensen, A.K., Holmgaard, D.B., Mygind, L.H., Johansen, J. and Pedersen, C. Neutrophil-to-lymphocyte ratio, calprotectin and YKL-40 in patients with chronic obstructive pulmonary disease: correlations and 5-year mortality - a cohort study. *Journal of Inflammation (London, England)* 12, 20 (2015).
93. Greenway, S., van Suylen, R. J., Sarvaas, G. D. M., Kwan, E., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., Rabinovitch, M. S100A4/Mts1 Produces Murine Pulmonary Artery

- Changes Resembling Plexogenic Arteriopathy and Is Increased in Human Plexogenic Arteriopathy. *American Journal of Pathology* 164 (2004).
94. Balabanian, K., Foussat, A., Dorfmueller, P., Durand-Gasselino, I., Capel, F., Bouchet-Delbos, L., Portier, A., Marfaing-Koka, A., Krzysiek, R., Rimaniol, A.-C., Simonneau, G., Emilie, D. and Humbert, M. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 165, 1419–1425 (2002).
95. Adams, T., Wan, E., Wei, Y., Wahab, R., Castagna, F., Wang, G., Emin, M., Russo, C., Homma, S., Le Jemtel, T.H. and Jelic, S. Secondhand Smoking Is Associated With Vascular Inflammation. *Chest* 148, 112–119 (2015).
96. Zare, M., Moghanibashi, M. and Rastgar, F. Growth Factors, Signal Transduction Pathways, and Tumor Suppressor Genes in Esophageal Cancer. *Esophageal Cancer – Cell and Molecular Biology, Biomarkers, Nutrition and Treatment* (2012).
97. Schlessinger, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* 103, 211–225 (2000).
98. Pawson T, Raina M and Nasha, P. Interaction domains: from simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS letters* 503, 2–10 (2001).
99. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado, Anderson KD and Cardoso WV. The molecular basis of lung development. *Mechanisms of Development* 92, 55–81 (2000).
100. Wellington, V.C. Molecular Regulation of Lung Development. *Annual Review of Physiology* 63, 471–494 (2001).
101. Desai TJ, C.W.V. Growth factors in lung development and disease: friends or foe? *Respiratory Research* 3, 1–4 (2002).
102. Ornitz, D.M. and Itoh, N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 4, 215–266 (2015).
103. Potthoff, M.J., Kliewer, S.A. and Mangelsdorf, D.J. Endocrine fibroblast growth factors 15/19 and 21: from feast to famine. *Genes & Development* 26, 312–324 (2012).
104. Benjamin, J.T., Smith, R.J., Halloran, B.A., Day, T.J., Kelly, D.R. and Prince, L.S. FGF-10 is decreased in bronchopulmonary dysplasia and suppressed by Toll-like receptor activation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 292, 550-558 (2007).

105. Müller, A.K., Meyer, M. and Werner, S. The roles of receptor tyrosine kinases and their ligands in the wound repair process. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23, 963–970 (2012).
106. Kardami, E., Detillieux, K., Ma, X., Jiang, Z., Santiago, J.-J., Jimenez, S.K. and Cattini, P.A. Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection. *Heart Failure Reviews* 12, 267–277 (2007).
107. Braun, S., dem Keller, U. auf, Steiling, H. and Werner, S. Fibroblast growth factors in epithelial repair and cytoprotection. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 359, 753–757 (2004).
108. Gupte, V.V., Ramasamy, S.K., Reddy, R., Lee, J., Weinreb, P.H., Violette, S.M., Guenther, A., Warburton, D., Driscoll, B., Minoo, P. and Bellusci, S. Overexpression of fibroblast growth factor-10 during both inflammatory and fibrotic phases attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180, 424–436 (2009).
109. Shute, J.K., Solic, N., Shimizu, J., McConnell, W., Redington, A.E. and Howarth, P.H. Epithelial expression and release of FGF-2 from heparan sulphate binding sites in bronchial tissue in asthma. *Thorax* 59, 557–562 (2004).
110. Tu, L., Dewachter, L., Gore, B., Fadel, E., Dartevelle, P., Simonneau, G., Humbert, M., Eddahibi, S. and Guignabert, C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45, 311–322 (2011).
111. Medebach, T. Morphometrische Analyse des pulmonalvaskulären Remodelings in der COPD unter Berücksichtigung der Regulationsenzyme des NO/CGMP- Signalweges. *Dissertation* (2011).
112. Klar, J., Blomstrand, P., Brunmark, C., Badhai, J., Håkansson, H.F., Brange, C.S., Bergendal, B. and Dahl, N. Fibroblast growth factor 10 haploinsufficiency causes chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Medical Genetics* 48, 705–709 (2011).
113. Kranenburg, A.R., Boer, W.I. de, van Krieken, J.H.J.M., Mooi, W.J., Walters, J.E., Saxena, P.R., Sterk, P.J. and Sharma, H.S. Enhanced expression of fibroblast growth factors and receptor FGFR-1 during vascular remodeling in chronic obstructive

- pulmonary disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 27, 517–525 (2002).
114. Herriges, J.C., Verheyden, J.M., Zhang, Z., Sui, P., Zhang, Y., Anderson, M.J., Swing, D.A., Zhang, Y., Lewandoski, M. and Sun, X. FGF-Regulated ETV Transcription Factors Control FGF-SHH Feedback Loop in Lung Branching. *Developmental Cell* 35, 322–332 (2015).
115. Joannes, A., Brayer, S., Besnard, V., Marchal-Sommé, J., Jaillet, M., Mordant, P., Mal, H., Borie, R., Crestani, B. and Mailleux, A.A. FGF9 and FGF18 in idiopathic pulmonary fibrosis promote survival and migration and inhibit myofibroblast differentiation of human lung fibroblasts in vitro. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 310, 615-629 (2016).
116. Marek, L., Ware, K.E., Fritzsche, A., Hercule, P., Helton, W.R., Smith, J.E., McDermott, L.A., Coldren, C.D., Nemenoff, R.A., Merrick, D.T., Helfrich, B.A., Bunn, P.A. and Heasley, L.E. Fibroblast growth factor (FGF) and FGF receptor-mediated autocrine signaling in non-small-cell lung cancer cells. *Molecular Pharmacology* 75, 196–207 (2009).
117. Madtes, D.K., Rubenfeld, G., Klima, L.D., Milberg, J.A., Steinberg, K.P., Martin, T.R., Raghu, G., Hudson, L.D. and Clark, J.G. Elevated Transforming Growth Factor- α Levels in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 158, 424–430 (1998).
118. Ohgino, K., Soejima, K., Yasuda, H., Hayashi, Y., Hamamoto, J., Naoki, K., Arai, D., Ishioka, K., Sato, T., Terai, H., Ikemura, S., Yoda, S., Tani, T., Kuroda, A. and Betsuyaku, T. Expression of fibroblast growth factor 9 is associated with poor prognosis in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 83, 90–96 (2014).
119. Coffey, E., Newman, D.R. and Sannes, P.L. Expression of fibroblast growth factor 9 in normal human lung and idiopathic pulmonary fibrosis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 61, 671–679 (2013).

120. Kuschner, W.G., D'Alessandro, A., Wong, H. and Blanc, P.D. Dose-dependent cigarette smoking-related inflammatory responses in healthy adults. *The European respiratory journal* 9, 1989–1994 (1996).
121. Burke, W. M. J., Roberts, C. M., Bryant, D. H., Cairns, D., Yeates, M., Morgan, G. W. Smoking-induced changes in epithelial lining fluid volume, cell density and protein. *Eur Respir J* 5, 780–784 (1992).
122. Tibuakuu, M., Kamimura, D., Kianoush, S., DeFilippis, A.P., Al Rifai, M., Reynolds, L.M., White, W.B., Butler, K.R., Mosley, T.H., Turner, S.T., Kullo, I.J., Hall, M.E. and Blaha, M.J. The association between cigarette smoking and inflammation: The Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) study. *PloS One* 12, (2017).
123. Kim, Y.-S., Hong, G., Kim, D.H., Kim, Y.M., Kim, Y.-K., Oh, Y.-M. and Jee, Y.-K. The role of FGF-2 in smoke-induced emphysema and the therapeutic potential of recombinant FGF-2 in patients with COPD. *Experimental & molecular medicine* 50, 1–10 (2018).
124. Brehm, J.M., Hagiwara, K., Tesfaigzi, Y., Bruse, S., Mariani, T.J., Bhattacharya, S., Boutaoui, N., Ziniti, J.P., Soto-Quiros, M.E., Avila, L., Cho, M.H., Himes, B., Litonjua, A.A., Jacobson, F., Bakke, P., Gulsvik, A., Anderson, W.H., Lomas, D.A., Forno, E., Datta, S., Silverman, E.K. and Celedón, J.C. Identification of FGF7 as a novel susceptibility locus for chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 66, 1085–1090 (2011).
125. Li, L., Zhang, S., Wei, L., Wang, Z., Ma, W., Liu, F. and Qian, Y. FGF2 and FGFR2 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer. *Oncology Letters* 16, 2490–2494 (2018).
126. MacKenzie, B., Korfei, M., Henneke, I., Sibinska, Z., Tian, X., Hezel, S., Dilai, S., Wasnick, R., Schneider, B., Wilhelm, J., El Agha, E., Klepetko, W., Seeger, W., Schermuly, R., Günther, A. and Bellusci, S. Increased FGF1-FGFRc expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research* 16, 83 (2015).
127. El Agha, E., Schwind, F., Ruppert, C., Günther, A., Bellusci, S., Schermuly, R.T. and Kosanovic, D. Is the fibroblast growth factor signaling pathway a victim of receptor tyrosine kinase inhibition in pulmonary parenchymal and vascular remodeling?

- American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 315, 248-252 (2018).
128. Parker, B.C., Engels, M., Annala, M. and Zhang, W. Emergence of FGFR family gene fusions as therapeutic targets in a wide spectrum of solid tumours. *The Journal of Pathology* 232, 4–15 (2014).
129. Kouhara, H. and Hadari, Y.R., Spivak-Kroizman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., Schlessinger, J. A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signalling Pathway. *Cell* 89, 693–702 (1997).
130. Zhang, W., Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research* 12, 9–18 (2002).
131. Thornton, T. M., Rincon, M. Non-Classical P38 Map Kinase Functions: Cell Cycle Checkpoints and Survival. *International Journal of Biol. Science* 5, 44–52 (2009).
132. Yu, J.S.L. and Cui, W. Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination. *Development (Cambridge, England)* 143, 3050–3060 (2016).
133. House, S.L., Branch, K., Newman, G., Doetschman, T. and Schultz, J.E.J. Cardioprotection induced by cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 is mediated by the MAPK cascade. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 289, 2167-2175 (2005).
134. Kanazawa, S., Fujiwara, T., Matsuzaki, S., Shingaki, K., Taniguchi, M., Miyata, S., Tohyama, M., Sakai, Y., Yano, K., Hosokawa, K. and Kubo, T. bFGF regulates PI3-kinase-Rac1-JNK pathway and promotes fibroblast migration in wound healing. *PLoS One* 5 (2010).
135. Tan, Y., Rouse, J., Zhnag, A., Cariati, S., Cohen, P. and Comb, M.J. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAPkinase-2. *The EMBO Journal* 15, 4629–4642 (1996).
136. Hu, Y., Fu, J. and Xue, X. Association of the proliferation of lung fibroblasts with the ERK1/2 signaling pathway in neonatal rats with hyperoxia-induced lung fibrosis. *Experimental and Therapeutic Medicine* 17, 701–708 (2019).
137. Vicent, S., López-Picazo, J.M., Toledo, G., Lozano, M.D., Torre, W., Garcia-Corchón, C., Quero, C., Soria, J.-C., Martín-Algarra, S., Manzano, R.G. and Montuenga, L.M.

- ERK1/2 is activated in non-small-cell lung cancer and associated with advanced tumours. *British Journal of Cancer* 90, 1047–1052 (2004).
138. Pelaia, G., Cuda, G., Vatrella, A., Gallelli, L., Caraglia, M., Marra, M., Abbruzzese, A., Caputi, M., Maselli, R., Costanzo, F.S. and Marsico, S.A. Mitogen-activated protein kinases and asthma. *Journal of Cellular Physiology* 202, 642–653 (2005).
139. Church, A.C., Martin, D.H., Wadsworth, R., Bryson, G., Fisher, A.J., Welsh, D.J. and Peacock, A.J. The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK-alpha: a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 309, 333–347 (2015).
140. Yu, M., Liu, X., Wu, H., Ni, W., Chen, S. and Xu, Y. Small interfering RNA against ERK1/2 attenuates cigarette smoke-induced pulmonary vascular remodeling. *Experimental and Therapeutic Medicine* 14, 4671–4680 (2017).
141. Mercer, B.A., Kolesnikova, N., Sonett, J. and D'Armiento, J. Extracellular regulated kinase/mitogen activated protein kinase is up-regulated in pulmonary emphysema and mediates matrix metalloproteinase-1 induction by cigarette smoke. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 17690–17696 (2004).
142. Galang, C.K., Muller, W.J., Foos, G., Oshima, R.G. and Hauser, C.A. Changes in the expression of many Ets family transcription factors and of potential target genes in normal mammary tissue and tumors. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 11281–11292 (2004).
143. Hollenhorst, P.C., Jones, D.A. and Graves, B.J. Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors. *Nucleic Acids Research* 32, 5693–5702 (2004).
144. T'sas, F., Brenner, C., Mauén, S., Putmans, P., Monté, D., van Lint, C., Moser, M., Baert, J.-L. and Launoit, Y. de. Expression of the Ets transcription factor Erm is regulated through a conventional PKC signaling pathway in the Molt4 lymphoblastic cell line. *FEBS letters* 579, 66–70 (2005).
145. Firnberg, N. and Neubüser, A. FGF signaling regulates expression of Tbx2, Erm, Pea3, and Pax3 in the early nasal region. *Developmental biology* 247, 237–250 (2002).

146. Herriges, M. and Morrisey, E.E. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development (Cambridge, England)* 141, 502–513 (2014).
147. Eo, J., Song, H. and Lim, H.J. Etv5, a transcription factor with versatile functions in male reproduction. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* 39, 41–45 (2012).
148. Monge, M., Colas, E., Doll, A., Gonzalez, M., Gil-Moreno, A., Planaguma, J., Quiles, M., Arbos, M.A., Garcia, A., Castellvi, J., Llaurodo, M., Rigau, M., Alazzouzi, H., Xercavins, J., Alameda, F., Reventos, J. and Abal, M. ERM/ETV5 up-regulation plays a role during myometrial infiltration through matrix metalloproteinase-2 activation in endometrial cancer. *Cancer Research* 67, 6753–6759 (2007).
149. Firlej, V., Ladam, F., Brysbaert, G., Dumont, P., Fuks, F., Launoit, Y. de, Benecke, A. and Chotteau-Lelievre, A. Reduced tumorigenesis in mouse mammary cancer cells following inhibition of Pea3- or Erm-dependent transcription. *Journal of Cell Science* 121, 3393–3402 (2008).
150. Llaurodo, M., Abal, M., Castellví, J., Cabrera, S., Gil-Moreno, A., Pérez-Benavente, A., Colás, E., Doll, A., Dolcet, X., Matias-Guiu, X., Vazquez-Levin, M., Reventós, J. and Ruiz, A. ETV5 transcription factor is overexpressed in ovarian cancer and regulates cell adhesion in ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer* 130, 1532–1543 (2012).
151. Pham, D., Sehra, S., Sun, X. and Kaplan, M.H. The transcription factor Etv5 controls TH17 cell development and allergic airway inflammation. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 134, 204–214 (2014).
152. Zhang, Z., Newton, K., Kummerfeld, S.K., Webster, J., Kirkpatrick, D.S., Phu, L., Eastham-Anderson, J., Liu, J., Lee, W.P., Wu, J., Li, H., Junttila, M.R. and Dixit, V.M. Transcription factor Etv5 is essential for the maintenance of alveolar type II cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 3903–3908 (2017).
153. Nilsson A.H., Lövdahl C., Blombren K., Kallin B. and Thyberg J. Expression of phenotype-and proliferation-related genes in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Cardiovascular Research* 34, 418–430 (1997).

154. Shah, A.V., Birdsey, G.M. and Randi, A.M. Regulation of endothelial homeostasis, vascular development and angiogenesis by the transcription factor ERG. *Vascular Pharmacology* 86, 3–13 (2016).
155. Asano, Y., Stawski, L., Hant, F., Highland, K., Silver, R., Szalai, G., Watson, D.K. and Trojanowska, M. Endothelial Fli1 deficiency impairs vascular homeostasis: a role in scleroderma vasculopathy. *The American Journal of Pathology* 176, 1983–1998 (2010).
156. Oettgen, P. Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors. *Circulation Research* 99, 1159–1166 (2006).
157. Qiao, L.-f., Xu, Y.-j., Liu, X.-s., Xie, J.-g., Wang, J., Du, C.-l., Zhang, J., Ni, W. and Chen, S.-x. PKC promotes proliferation of airway smooth muscle cells by regulating cyclinD1 expression in asthmatic rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 29, 677–686 (2008).
158. Wei, L., Liu, Y., Kaneto, H. and Fanburg, B.L. JNK regulates serotonin-mediated proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 298, 863-869 (2010).
159. Zhou, S., Li, M., Zeng, D., Sun, G., Zhou, J. and Wang, R. Effects of basic fibroblast growth factor and CCND1 on cigarette smoke-induced pulmonary vascular remodeling in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 9, 33–38 (2015).
160. Zeng, D.-x., Liu, X.-s., Xu, Y.-j., Wang, R., Xiang, M., Xiong, W.-n., Ni, W. and Chen, S.-x. Plasmid-based short hairpin RNA against CCND1 attenuated pulmonary vascular remodeling in smoking rats. *Microvascular Research* 80, 116–122 (2010).
161. Zeng, D.-x., Xu, Y.-j., Liu, X.-s., Wang, R. and Xiang, M. Cigarette smoke extract induced rat pulmonary artery smooth muscle cells proliferation via PKC α -mediated CCND1 expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 112, 2082–2088 (2011).
162. Ravenhall, C., Guida, E., Harris, T., Koutsoubos, V. and Stewart, A. The importance of ERK activity in the regulation of CCND1 levels and DNA synthesis in human cultured airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 131, 17–28 (2000).
163. Chang, M.-M., Lai, M.-S., Hong, S.-Y., Pan, B.-S., Huang, H., Yang, S.-H., Wu, C.-C., Sun, H.S., Chuang, J.-I., Wang, C.-Y. and Huang, B.-M. FGF9/FGFR2 increase cell proliferation by activating ERK1/2, Rb/E2F1, and cell cycle pathways in mouse Leydig tumor cells. *Cancer Science* 109, 3503–3518 (2018).

164. Herriges, J.C., Verheyden, J.M., Zhang, Z., Sui, P., Zhang, Y., Anderson, M.J., Swing, D.A., Zhang, Y., Lewandoski, M. and Sun, X. FGF-Regulated ETV Transcription Factors Control FGF-SHH Feedback Loop in Lung Branching. *Developmental Cell* 35, 322–332 (2015).
165. Chapouly, C., Guimbal, S., Hollier, P.-L. and Renault, M.-A. Role of Hedgehog Signaling in Vasculature Development, Differentiation, and Maintenance. *International Journal of Molecular Sciences* 20 (2019).
166. Hanna, A. and Shevde, L.A. Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment. *Molecular Cancer* 15, 24 (2016).
167. Kern, D., Regl, G., Hofbauer, S.W., Altenhofer, P., Achatz, G., Dlugosz, A., Schnidar, H., Greil, R., Hartmann, T.N. and Aberger, F. Hedgehog/GLI and PI3K signaling in the initiation and maintenance of chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 34, 5341–5351 (2015).
168. Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Tbinden, M., Correa, R., Piguat, V., Beermann, F. and Altaba, A.R. Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactins between GLI1 and RAS-MEK pathways. *PNAS* 104, 5895–5900 (2007).
169. Giroux-Leprieur, E., Costantini, A., Ding, V.W. and He, B. Hedgehog Signaling in Lung Cancer: From Oncogenesis to Cancer Treatment Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 1–17 (2018).
170. Li, F., Duman-Scheel, M., Yang, D., Du, W., Zhang, J., Zhao, C., Qin, L. and Xin, S. Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 1787–1794 (2010).
171. Belgacemi, R., Luczka, E., Ancel, J., Diabasana, Z., Perotin, J.-M., Germain, A., Lalun, N., Birembaut, P., Dubernard, X., Mérol, J.-C., Delepine, G., Polette, M., Deslée, G. and Dormoy, V. Airway epithelial cell differentiation relies on deficient Hedgehog signalling in COPD. *EBioMedicine* 51, 2352–3964 (2020).
172. Kugler, M.C., Joyner, A.L., Loomis, C.A. and Munger, J.S. Sonic hedgehog signaling in the lung. From development to disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 52, 1–13 (2015).

173. Marada, S., Navarro, G., Truong, A., Stewart, D.P., Arensdorf, A.M., Nachtergaele, S., Angelats, E., Opferman, J.T., Rohatgi, R., McCormick, P.J. and Ogden, S.K. Functional Divergence in the Role of N-Linked Glycosylation in Smoothened Signaling. *PLoS Genetics* 11, 1-27 (2015).
174. Pillai, S.G., Ge, D., Zhu, G., Kong, X., Shianna, K.V., Need, A.C., Feng, S., Hersh, C.P., Bakke, P., Gulsvik, A., Ruppert, A., Lødrup Carlsen, K.C., Roses, A., Anderson, W., Rennard, S.I., Lomas, D.A., Silverman, E.K. and Goldstein, D.B. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genetics* 5 (2009).
175. Zhou, X., Baron, R.M., Hardin, M., Cho, M.H., Zielinski, J., Hawrylkiewicz, I., Sliwinski, P., Hersh, C.P., Mancini, J.D., Lu, K., Thibault, D., Donahue, A.L., Klanderman, B.J., Rosner, B., Raby, B.A., Lu, Q., Geldart, A.M., Layne, M.D., Perrella, M.A., Weiss, S.T., Choi, A.M.K. and Silverman, E.K. Identification of a chronic obstructive pulmonary disease genetic determinant that regulates HHIP. *Human Molecular Genetics* 21, 1325–1335 (2012).
176. Yang, S.-R., Chida, A.S., Bauter, M.R., Shafiq, N., Seweryniak, K., Maggirwar, S.B., Kilty, I. and Rahman, I. Cigarette smoke induces proinflammatory cytokine release by activation of NF-kappaB and posttranslational modifications of histone deacetylase in macrophages. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 291, 46-57 (2006).
177. Volpi, G., Facchinetti, F., Moretto, N., Civelli, M. and Patacchini, R. Cigarette smoke and α,β -unsaturated aldehydes elicit VEGF release through the p38 MAPK pathway in human airway smooth muscle cells and lung fibroblasts. *British Journal of Pharmacology* 163, 649–661 (2011).
178. Yi, L., Domyan, E.T., Lewandoski, M. and Sun, X. Fibroblast growth factor 9 signaling inhibits airway smooth muscle differentiation in mouse lung. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 238, 123–137 (2009).
179. Mailleux, A.A., Kelly, R., Veltmaat, J.M., Langhe, S.P. de, Zaffran, S., Thiery, J.P. and Bellusci, S. Fgf10 expression identifies parabronchial smooth muscle cell progenitors and is required for their entry into the smooth muscle cell lineage. *Development (Cambridge, England)* 132, 2157–2166 (2005).

180. Volckaert, T., Campbell, A. and Langhe, S. de. c-Myc regulates proliferation and Fgf10 expression in airway smooth muscle after airway epithelial injury in mouse. *PloS One* 8, 1-9 (2013).
181. Chao, C.-M., Moiseenko, A., Kosanovic, D., Rivetti, S., El Agha, E., Wilhelm, J., Kampschulte, M., Yahya, F., Ehrhardt, H., Zimmer, K.-P., Barreto, G., Rizvanov, A.A., Schermuly, R.T., Reiss, I., Morty, R.E., Rottier, R.J., Bellusci, S. and Zhang, J.-S. Impact of Fgf10 deficiency on pulmonary vasculature formation in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Human Molecular Genetics* 28, 1429–1444 (2019).
182. Baert, J.-L., Monte, D., Verreman, K., Degerny, C., Coutte, L. and Launoit, Y. de. The E3 ubiquitin ligase complex component COP1 regulates PEA3 group member stability and transcriptional activity. *Oncogene* 29, 1810–1820 (2010).
183. Weathington, N.M., Sznajder, J.I. and Mallampalli, R.K. The emerging role of the ubiquitin proteasome in pulmonary biology and disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 188, 530–537 (2013).
184. van Rijt, S.H., Keller, I.E., John, G., Kohse, K., Yildirim, A.Ö., Eickelberg, O. and Meiners, S. Acute cigarette smoke exposure impairs proteasome function in the lung. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 303, 814–823 (2012).
185. Min, T., Bodas, M., Mazur, S. and Vij, N. Critical role of proteostasis-imbalance in pathogenesis of COPD and severe emphysema. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 89, 577–593 (2011).
186. Zhang, Y.-W. and Vande Woude, G.F. MIG-6 and SPRY2 in the Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling: Balancing Act via Negative Feedback Loops. In *Future Aspects of Tumor Suppressor Gene* (Y. Cheng, ed.). InTech (2013).
187. Edwin, F., Anderson, K. and Patel, T.B. HECT domain-containing E3 ubiquitin ligase Nedd4 interacts with and ubiquitinates Sprouty2. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 255–264 (2010).
188. Wang, G., Zhang, Z., Xu, Z., Yin, H., Bai, L., Ma, Z., Decoster, M.A., Qian, G. and Wu, G. Activation of the sonic hedgehog signaling controls human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation in response to hypoxia. *Biochimica et Biophysica Acta* 1803, 1359–1367 (2010).

189. Savani M., Guo Y., Carbone D.P. and Csiki I. Sonic hedgehog pathway expression in non-small cell lung cancer. *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 4, 225–233 (2012).
190. Lemjabbar-Alaoui, H., Dasari, V., Sidhu, S.S., Mengistab, A., Finkbeiner, W., Gallup, M. and Basbaum, C. Wnt and Hedgehog are critical mediators of cigarette smoke-induced lung cancer. *PLoS One* 1, 1-11 (2006).
191. Li, J., Zong, D., Chen, Y. and Chen, P. Anti-apoptotic effect of the Shh signaling pathway in cigarette smoke extract induced MLE 12 apoptosis. *Tobacco Induced Diseases* 17, 49 (2019).
192. Baxter, M., Eltom, S., Dekkak, B., Yew-Booth, L., Dubuis, E.D., Maher, S.A., Belvisi, M.G. and Birrell, M.A. Role of transient receptor potential and pannexin channels in cigarette smoke-triggered ATP release in the lung. *Thorax* 69, 1080–1089 (2014).
193. Wheaton, A. G., Yong, L., Croft, J. B., VanFrank, B., Croxton, T. L. Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Smoking Status — United States, 2017 68 (2019).
194. El Agha, E., Seeger, W. and Bellusci, S. Therapeutic and pathological roles of fibroblast growth factors in pulmonary diseases. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 246, 235–244 (2017).
195. Wedgwood, S., DeVol, J.M., Grobe, A., Benavidez, E., Azakie, A., Fineman, J.R. and Black, S.M. Fibroblast growth factor-2 expression is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Pediatric research* 61, 32–36 (2007).
196. Izikki, M., Guignabert, C., Fadel, E., Humbert, M., Tu, L., Zadigue, P., Dartevelle, P., Simonneau, G., Adnot, S., Maitre, B., Raffestin, B. and Eddahibi, S. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *The Journal of Clinical Investigation* 119, 512–523 (2009).
197. Black, S.M., DeVol, J.M. and Wedgwood, S. Regulation of fibroblast growth factor-2 expression in pulmonary arterial smooth muscle cells involves increased reactive oxygen species generation. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 294, 345-354 (2008).
198. Sarkar, J., Gou, D., Turaka, P., Viktorova, E., Ramchandran, R. and Raj, J.U. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell

- proliferation and migration. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 299, 861-871 (2010).
199. Bolaños, A.L., Milla, C.M., Lira, J.C., Ramírez, R., Checa, M., Barrera, L., García-Alvarez, J., Carbajal, V., Becerril, C., Gaxiola, M., Pardo, A. and Selman, M. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 303, 978-990 (2012).
200. Henno, P., Grassin-Delyle, S., Belle, E., Brollo, M., Naline, E., Sage, E., Devillier, P. and Israël-Biet, D. In smokers, Sonic hedgehog modulates pulmonary endothelial function through vascular endothelial growth factor. *Respiratory Research* 18, 102 (2017).
201. Guo, Y., Shi, G., Wan, H. and Zhou, M. Hedgehog signaling regulates the expression levels of inflammatory mediators in cigarette-induced airway inflammation. *Molecular medicine reports* 17, 8557–8563 (2018).
202. Rabinovitch, M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *The Journal of Clinical Investigation* 122, 4306–4313 (2012).
203. Hangjun Wang, Xiangde Liu, Takeshi Umino, C. Magnus Sköld, Yunkui Zhu, Tadashi Kohyama, John R. Spurzem, Debra J. Romberger, and Stephen I. Rennard. Cigarette Smoke Inhibits Human Bronchial Epithelial Cell Repair Processes. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 225, 772–779 (2001).
204. Miglino, N., Roth, M., Lardinois, D., Sadowski, C., Tamm, M. and Borger, P. Cigarette smoke inhibits lung fibroblast proliferation by translational mechanisms. *The European respiratory journal* 39, 705–711 (2012).
205. Chang, Y., Al-Alwan, L., Audusseau, S., Chouiali, F., Carlevaro-Fita, J., Iwakura, Y., Baglolle, C.J., Eidelman, D.H. and Hamid, Q. Genetic deletion of IL-17A reduces cigarette smoke-induced inflammation and alveolar type II cell apoptosis. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 306, 132-143 (2014).
206. Zhou, S.-j., Li, M., Zeng, D.-x., Zhu, Z.-m., Hu, X.-w., Li, Y.-h., Wang, R. and Sun, G.-y. Expression variations of connective tissue growth factor in pulmonary arteries from smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Scientific Reports* 5, 1-9 (2015).

207. Wang, X.-D., Li, F., Ma, D.-B., Deng, X., Zhang, H., Gao, J., Hao, L., Liu, D.-D. and Wang, J. Periostin mediates cigarette smoke extract-induced proliferation and migration in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 83, 514–520 (2016).
208. Xu, G.-N., Yang, K., Xu, Z.-P., Zhu, L., Hou, L.-N., Qi, H., Chen, H.-Z. and Cui, Y.-Y. Protective effects of anisodamine on cigarette smoke extract-induced airway smooth muscle cell proliferation and tracheal contractility. *Toxicology and Applied Pharmacology* 262, 70–79 (2012).
209. He, Z.-H., Chen, P., Chen, Y., Zhu, Y.-Q., He, S.-D., Ye, J.-R., Liu, D. and Yang, Y. Dual effects of cigarette smoke extract on proliferation of endothelial progenitor cells and the protective effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on EPCs against the damage caused by CSE. *BioMed research international* 2014, 640752 (2014).
210. Stacey, D.W. CCND1 serves as a cell cycle regulatory switch in actively proliferating cells. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 158–163 (2003).
211. Wang, R., Xu, Y.-j., Liu, X.-s., Zeng, D.-x. and Xiang, M. CCN2 promotes cigarette smoke-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through upregulating CCND1 expression. *Journal of Cellular Biochemistry* 113, 349–359 (2012).
212. Pera, T., Gosens, R., Lesterhuis, A.H., Sami, R., van der Toorn, M., Zaagsma, J. and Meurs, H. Cigarette smoke and lipopolysaccharide induce a proliferative airway smooth muscle phenotype. *Respiratory Research* 11, 1-12 (2010).
213. Zhou, D., Li, Y., Zhou, L., Tan, R.J., Xiao, L., Liang, M., Hou, F.F. and Liu, Y. Sonic hedgehog is a novel tubule-derived growth factor for interstitial fibroblasts after kidney injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 25, 2187–2200 (2014).
214. Kim A Dora. Cell-cell communication in the vessel wall. *Vascular Medicine* 6, 43–50 (2001).
215. Triggle, C.R., Samuel, S.M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G. and Ding, H. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 90, 713–738 (2012).

216. Nakayama, A., Nakayama, M., Turner, C.J., Höing, S., Lepore, J.J. and Adams, R.H. Ephrin-B2 controls PDGFR β internalization and signaling. *Genes & Development* 27, 2576–2589 (2013).
217. Eddahibi, S., Guignabert, C., Barlier-Mur, A.-M., Dewachter, L., Fadel, E., Dartevielle, P., Humbert, M., Simonneau, G., Hanoun, N., Saurini, F., Hamon, M. and Adnot, S. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 113, 1857–1864 (2006).
218. Sanchez, O., Marcos, E., Perros, F., Fadel, E., Tu, L., Humbert, M., Dartevielle, P., Simonneau, G., Adnot, S. and Eddahibi, S. Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176, 1041–1047 (2007).
219. Balcells, M., Martorell, J., Olivé, C., Santacana, M., Chitalia, V., Cardoso, A.A. and Edelman, E.R. Smooth muscle cells orchestrate the endothelial cell response to flow and injury. *Circulation* 121, 2192–2199 (2010).
220. Herman I.M. and Castellot J.J. Regulation of vascular smooth muscle cell growth by endothelial-synthesized extracellular matrices. *Arteriosclerosis* 7 (1987).
221. Roland M, Bhowmik A, Sapsford RJ, Seemungal T A R, JeVries D J, Warner T D, Wedzicha J A. Sputum and plasma endothelin-1 levels in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 56, 30–35 (2001).
222. Yogi, A., Callera, G.E., Montezano, A.C.I., Aranha, A.B., Tostes, R.C., Schiffrin, E.L. and Touyz, R.M. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 1960–1967 (2007).
223. Lambers, C., Roth, M., Zhong, J., Campregher, C., Binder, P., Burian, B., Petkov, V. and Block, L.-H. The interaction of endothelin-1 and TGF- β 1 mediates vascular cell remodeling. *PloS One* 8, e73399 (2013).
224. Pirina, P., Zinellu, E., Paliogiannis, P., Fois, A.G., Marras, V., Sotgia, S., Carru, C. and Zinellu, A. Circulating serotonin levels in COPD patients: a pilot study. *BMC Pulmonary Medicine* 18, 167 (2018).

225. Xu, S.-c., Kuang, J.-y., Liu, J., Ma, C.-l., Feng, Y.-l. and Su, Z.-g. Association between fibroblast growth factor 7 and the risk of chronic obstructive pulmonary disease. *Acta Pharmacologica Sinica* 33, 998–1003 (2012).
226. Ulich, T. R., Yi, E. S., Longmuir, K., Yin, S., Biltz, R., Morris, C. F., Housley, R. M., Pierce, G. F. Keratinocyte Growth Factor Is a Growth Factor for Type II Pneumocytes In Vivo. *The Journal of Clinical Investigation* 93, 1298–1306 (1993).
227. Prince, L. S., Karp, P. H., Moninger, T. O., Welsh, M. J. KGF alters gene expression in human airway epithelia: potential regulation of the inflammatory response. *The Physiological Genomics* 6, 81–89 (2001).
228. Sakamoto, S., Yazawa, T., Baba, Y., Sato, H., Kanegae, Y., Hirai, T., Saito, I., Goto, T. and Kurahashi, K. Keratinocyte growth factor gene transduction ameliorates pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45, 489–497 (2011).
229. Ware, L.B. and Matthay, M.A. Keratinocyte and hepatocyte growth factors in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 282, 924-940 (2002).
230. Yi, E. S., Williams, S. T., Lee, H., Malicki, D. M., Chin, E. M., Yin, S., Tarpley, J., Ulich, T. R. Keratinocyte Growth Factor Ameliorates Radiation- and Bleomycin-Induced Lung Injury and Mortality. *American Journal of Pathology* 149, 1963–1970.
231. Tu, L., Dewachter, L., Gore, B., Fadel, E., Dartevielle, P., Simonneau, G., Humbert, M., Eddahibi, S. and Guignabert, C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 45, 311–322 (2011).
232. Turner, N. and Grose, R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature reviews. Cancer* 10, 116–129 (2010).
233. Firth, A.L., Mandel, J. and Yuan, J.X.-J. Idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Disease models & mechanisms* 3, 268–273 (2010).
234. Blanco, I., Tura-Ceide, O., Peinado, V.I. and Barberà, J.A. Updated Perspectives on Pulmonary Hypertension in COPD. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 15, 1315–1324 (2020).

235. Kessaris, N., Jamen, F., Rubin, L.L. and Richardson, W.D. Cooperation between sonic hedgehog and fibroblast growth factor/MAPK signalling pathways in neocortical precursors. *Development (Cambridge, England)* 131, 1289–1298 (2004).
236. Kwong, L., Bijlsma, M.F. and Roelink, H. Shh-mediated degradation of Hhip allows cell autonomous and non-cell autonomous Shh signalling. *Nature communications* 5, 4849 (2014).
237. Holmes, A., Bonner, F. and Jones, D. Assessing drug safety in human tissues - what are the barriers? *Nature Reviews. Drug Discovery* 14, 585–587 (2015).
238. Edwards, J., Belvisi, M., Dahlen, S.-E., Holgate, S. and Holmes, A. Human tissue models for a human disease: what are the barriers? *Thorax* 70, 695–697 (2015).
239. Jackson, S.J., Prior, H. and Holmes, A. The use of human tissue in safety assessment. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 93, 29–34 (2018).
240. Morissette, M.C., Lamontagne, M., Bérubé, J.-C., Gaschler, G., Williams, A., Yauk, C., Couture, C., Laviolette, M., Hogg, J.C., Timens, W., Halappanavar, S., Stampfli, M.R. and Bossé, Y. Impact of cigarette smoke on the human and mouse lungs: a gene-expression comparison study. *PloS One* 9, 1-11 (2014).
241. Wright, J.L., Cosio, M. and Churg, A. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 295, 1-15 (2008).
242. Vlahos, R. and Bozinovski, S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clinical science (London, England : 1979)* 126, 253–265 (2014).
243. Groneberg, D.A., Niimi, A., Dinh, Q.T., Cosio, B., Hew, M., Fischer, A. and Chung, K.F. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170, 1276–1280 (2004).
244. Bell, W.C., Sexton, K.C. and Grizzle, W.E. How to efficiently obtain human tissues to support specific biomedical research projects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : a Publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, 1676–1679 (2009).

245. Dash, A., Maine, I.P., Varambally, S., Shen, R., Chinnaiyan, A.M. and Rubin, M.A. Changes in Differential Gene Expression because of Warm Ischemia Time of Radical Prostatectomy Specimens. *American Journal of Pathology* 161, 1743–1748 (2002).
246. Ng, C.S.H., Hui, C.W.C., Wan, S., Wan, I.Y.P., Ho, A.M.H., Lau, K.M., Darzi, A.W. and Underwood, M.J. Lung ischaemia-reperfusion induced gene expression. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery : Official Journal of the European Association for Cardio-Toracic Surgery* 37, 1411–1420 (2010).
247. Baker, A.F., Tomislav Dragovich, Ihle, N.T., Ryan Williams, Cecilia Fenoglio-Preiser and Garth Powis. Stability of Phosphoprotein as a Biological Marker of Tumor Signaling. *Clinical Cancer Research* 11 (2005).
248. Ayala, G., Thompson, T., Yang, G., Frolov, A., Li, R., Scardino, P., Otori, M., Wheeler, T. and Harper, W. High Levels of Phosphorylated Form of Akt-1 in Prostate Cancer and Non-Neoplastic Prostate Tissues Are Strong Predictors of Biochemical Recurrence. *Clinical Cancer Research* 10, 6572–6578 (2004).
249. Lu, Q., Gottlieb, E. and Rounds, S. Effects of cigarette smoke on pulmonary endothelial cells. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 314, 743-756 (2018).
250. Wang H., Liu X., Umino T., Sköld C. M., Zhu Y., Kohyama T., Spurzem J. R., Romberger D.J., Rennard S.I. Cigarette Smoke Inhibits Human Bronchial Epithelial Cell Repair Processes. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 25, 772–779 (2001).
251. Yuma Hoshino, Tadashi Mio, Sonoko Nagai, Hiroyuki Miki, Isao Ito and Takateru Izumi. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *American Journal Lung Cell Mol Physiology* 281, 509–516 (2001).
252. Baglole, C.J., Bushinsky, S.M., Garcia, T.M., Kode, A., Rahman, I., Sime, P.J. and Phipps, R.P. Differential induction of apoptosis by cigarette smoke extract in primary human lung fibroblast strains: implications for emphysema. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 291, 19-29 (2006).
253. Higashi, T., Mai, Y., Noya, Y., Horinouchi, T., Terada, K., Hoshi, A., Nepal, P., Harada, T., Horiguchi, M., Hatate, C., Kuge, Y. and Miwa, S. A simple and rapid method for standard preparation of gas phase extract of cigarette smoke. *PloS One* 9 (2014).

254. Dirnfeld, M., Goldman S., Gonen Y., Koifman, M., Calderon, I. and Abramovici, H. A simplified coculture system with luteinized granulosa cells improves embryo quality and implantation rates: a controlled study. *Fertility and Sterility* 67 (1997).
255. Bogdanowicz, D.R. and Lu, H.H. Studying cell-cell communication in co-culture. *Biotechnology Journal* 8, 395–396 (2013).
256. Muresan, X.M., Cervellati, F., Sticozzi, C., Belmonte, G., Chui, C.H., Lampronti, I., Borgatti, M., Gambari, R. and Valacchi, G. The loss of cellular junctions in epithelial lung cells induced by cigarette smoke is attenuated by corilagin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1–12 (2015).
257. Budhiraja, R., Tuder, R.M. and Hassoun, P.M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109, 159–165 (2004).
258. Gairhe, S., Bauer, N.N., Gebb, S.A. and McMurtry, I.F. Serotonin passes through myoendothelial gap junctions to promote pulmonary arterial smooth muscle cell differentiation. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 303, 767-777 (2012).
259. Garland, C.J., Hiley, C.R. and Dora, K.A. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *British Journal of Pharmacology* 164, 839–852 (2011).
260. Gredic, M., Blanco, I., Kovacs, G., Helyes, Z., Ferdinandy, P., Olschewski, H., Barberà, J.A. and Weissmann, N. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *British Journal of Pharmacology* (2020).
261. Comer, D. M., Elborn, J, S and Ennis, M. Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyd and cigarette extract on human nasal epithelial cells. *BMC Pulmonary Medicine* 14, 1–11 (2014).
262. Ahmad, S., Zafar, I., Mariappan, N., Husain, M., Wei, C.-C., Vetal, N., Eltoum, I.A. and Ahmad, A. Acute pulmonary effects of aerosolized nicotine. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 316, 94-104 (2019).
263. Moiseenko, A., Kheirollahi, V., Chao, C-M., Ahmadvand, N., Quantius, J., Wilhelm, J., Albrecht, K., Morty, R. E., Rizvanov, A. A., Minoo, P., El Agha, E., Bellusci, S. Origin and characterization of alpha smooth muscle actin-positive cells during murine lung development. *Stem Cells* 35, 1566-1578 (2017).

11 Anhang

11.1 RTqPCR

zu 3.5 Knockdown-Experimente an hPASMC

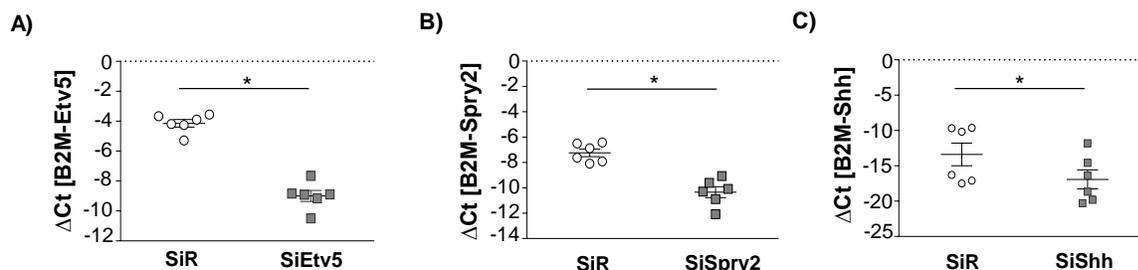


Abbildung 32: 48 Std. SiRNA-Transfektion führt zur inhibierten mRNA-Expression von ETV5, SPRY2 und SHH in hPASMC.

mRNA-Expression von A) ETV5, B) SPYR2 und C) SHH nach Transfektion (48 Std.) von hPASMC mit spezifischen SiRNAs gegen ETV5, SPRY2 und SHH im Vergleich zur Kontrolle (SiRandom, SiR). Signifikanz sind wie folgt angegeben: * ($p \leq 0,05$).

11.2 Western Blots

zu 3.1 Expressionsanalyse von FGF-Signalweg-assozierten Genen in den Lungen von COPD-Patienten

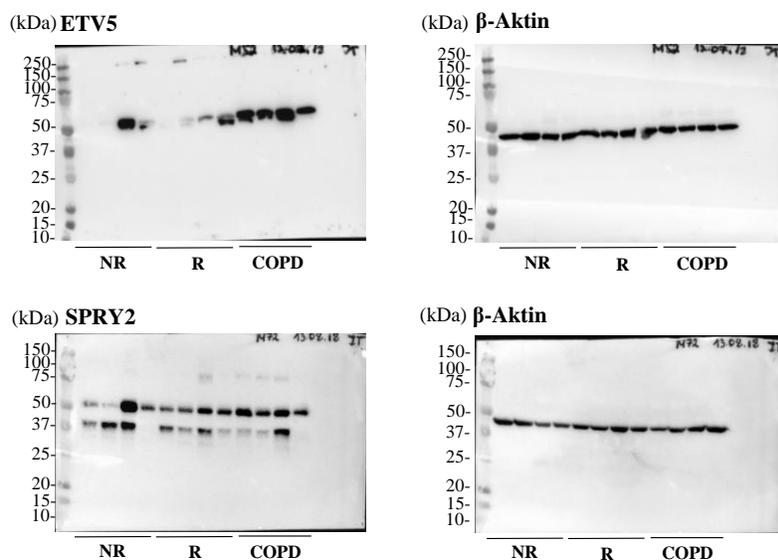


Abbildung 33: Western-Blots von ETV5 und SPRY2 in humanen Lungen.

Western-Blots von ETV5 (62 kDa) und SPRY2 (35 kDa) in homogenisierten humanen Lungen von NR, R und COPD. β -Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

zu **3.2 Expressionsanalyse von SHH-Signalweg-assozierten Genen in den Lungen von COPD-Patienten**

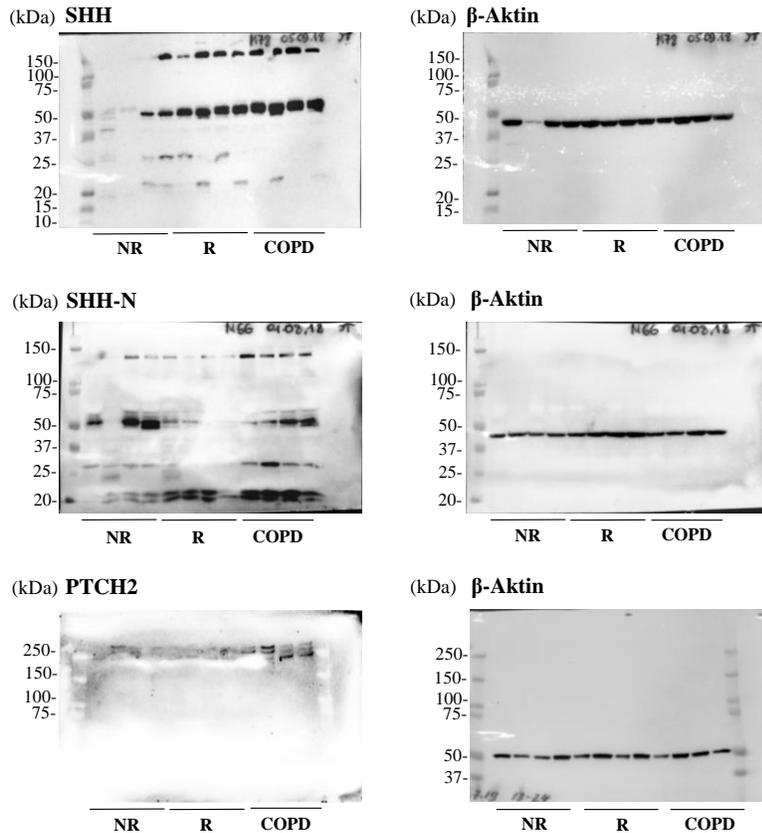
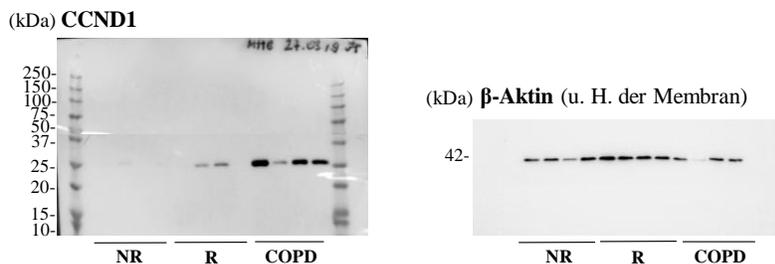


Abbildung 34: Western-Blots von SHH, SHH-N und PTCH2 in humanen Lungen.

Western-Blots von SHH (45 kDa), SHH-N (19 kDa) und PTCH2 (200 kDa) in homogenisierten humanen Lungen von NR, R und COPD. β -Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

zu **3.3 Expression von Proliferationsmarkern in COPD-Lunge**



Anhang

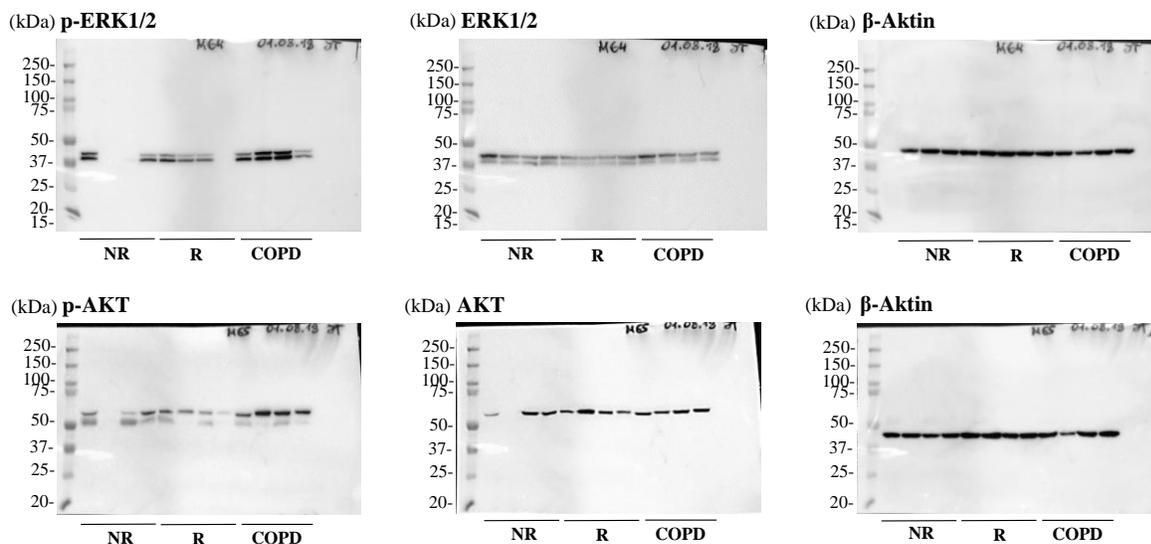


Abbildung 35: Western-Blots von CCND1, ERK1/2 und AKT in humanen Lungen.

Western-Blots von CCND1(34 kDa), ERK1/2 (42/44 kDa) und p-ERK1/2 (42/44 kDa), AKT (60 kDa) und p-AKT (60 kDa) in homogenisierten humanen Lungen von NR, R und COPD. β-Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. NR: Nichtraucher, R: Raucher.

zu 3.4.1 Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Expression von FGF-Signalweg-assozierten Genen

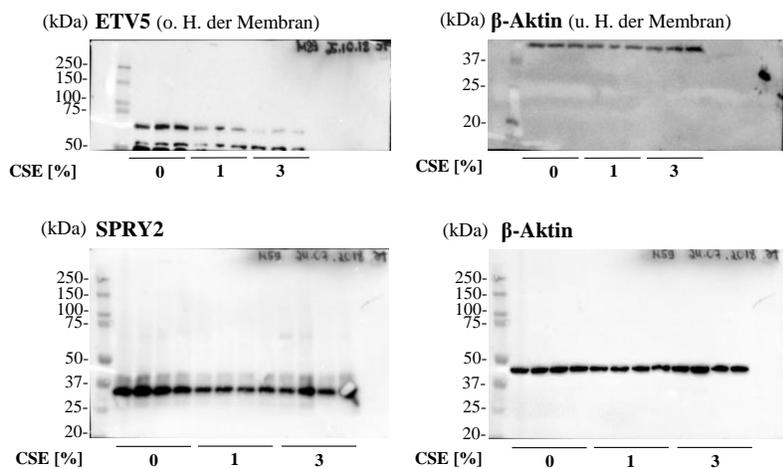


Abbildung 36: Western-Blot von FGF-Signalweg-assozierten Genen in hPASMC nach akuter CSE-Inkubation.

Western-Blots von ETV5 (62 kDa) und SPRY2 (35 kDa) nach 24 Std.-Inkubation von hPASMC mit CSE (0, 1 und 3%ig). β-Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*, u. H.: untere Membranhälfte, o. H.: obere Membranhälfte.

zu 3.4.2 Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Expression von SHH-Signalweg-assozierten Genen

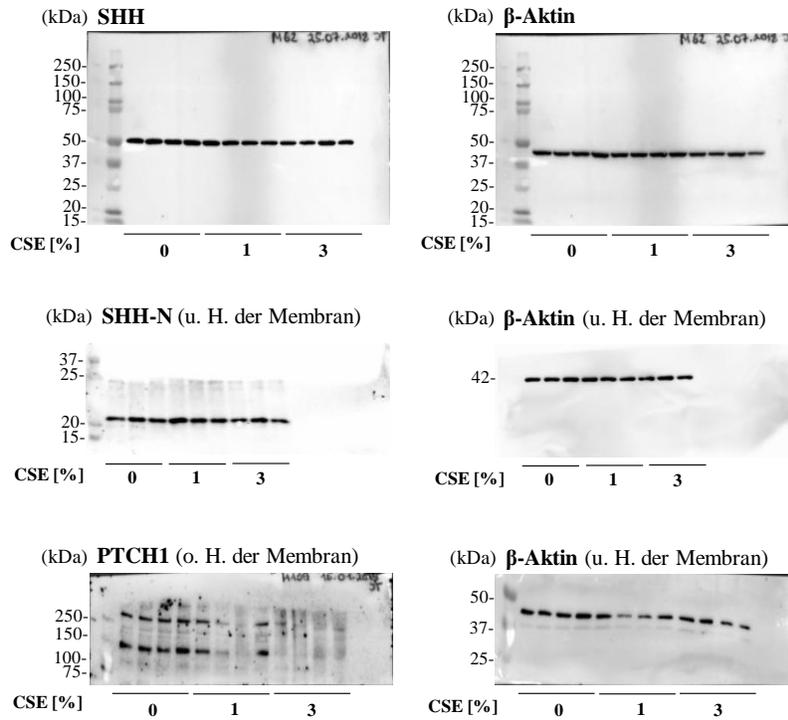
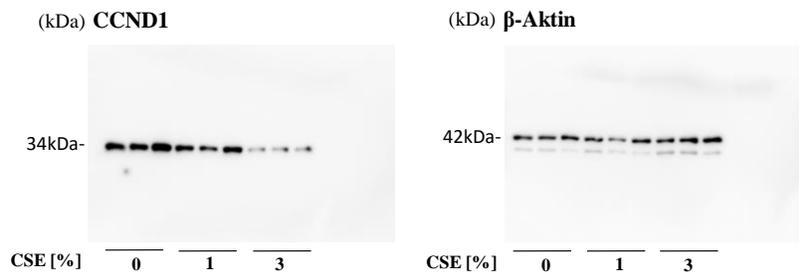


Abbildung 37: Western-Blots von SHH-Signalweg-assozierten Genen in hPASC nach akuter CSE-Inkubation.

Western-Blots von SHH (45 kDa), SHH-N (19 kDa) und PTCH1 (160 kDa) nach 24 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 1 und 3%ig). β -Aktin als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*, u.H.: untere Membranhälfte, o. H.: obere Membranhälfte.

zu 3.4.3 Effekte der akuten CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASC



Anhang

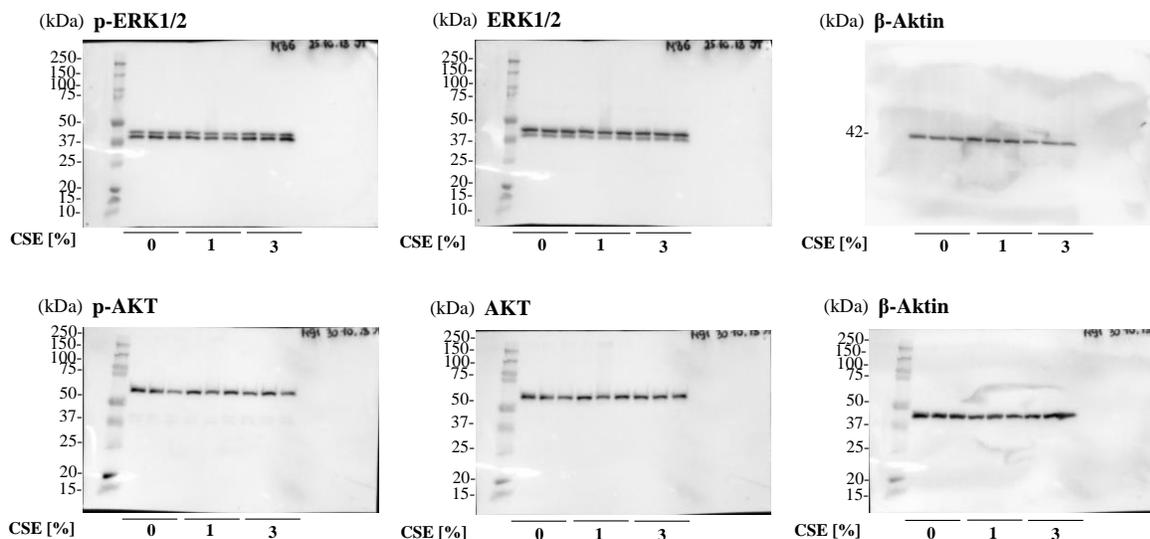


Abbildung 38: Western-Blots von CCND1, ERK1/2 und AKT in hPASC nach akuter CSE-Inkubation.

Western-Blots von CCND1 (34 kDa), ERK1/2 (42/44 kDa) und p-ERK1/2 (42/44 kDa), AKT (60 kDa) und p-AKT (60 kDa) nach 24 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 1 und 3%ig). β-Aktin als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*.

zu 3.4.4 Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Expression von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC

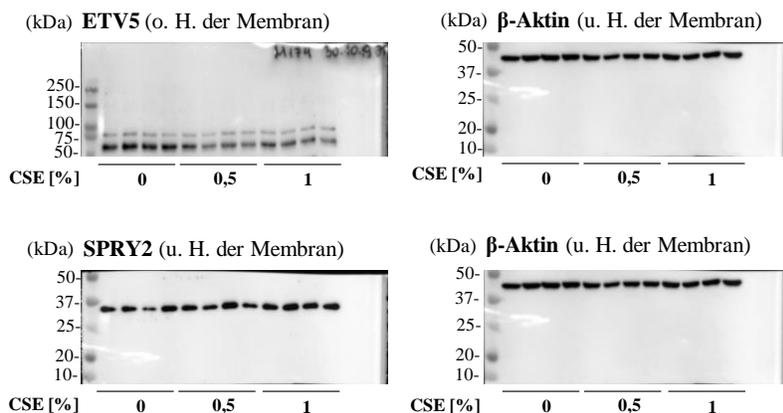


Abbildung 39: Western-Blots von FGF-Signalweg-assoziierten Genen in hPASC nach chronischer CSE-Inkubation.

Western-Blots von ETV5 (62 kDa) und SPRY2 (35 kDa) nach 120 Std.-Behandlung von hPASC mit CSE (0, 0,5 und 1%ig). β-Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*, u. H.: untere Membranhälfte, o. H.: obere Membranhälfte.

zu 3.4.5 Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Expression von SHH-Signalweg-assozierten Genen in hPASC

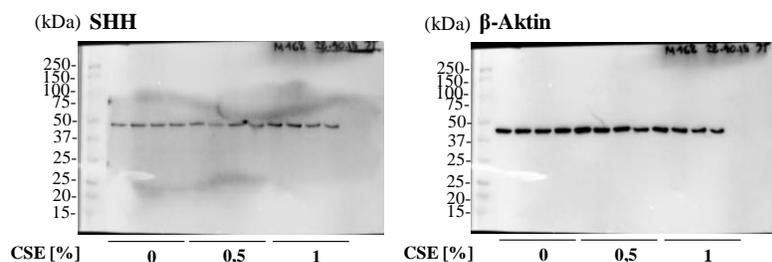


Abbildung 40: Western-Blot von SHH in hPASC nach chronischer CSE-Inkubation. Western-Blot von SHH (45 kDa) nach 120 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 0,5 und 1% ig). β -Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*.

zu 3.4.6 Effekte der chronischen CSE-Exposition auf die Proliferation von hPASC

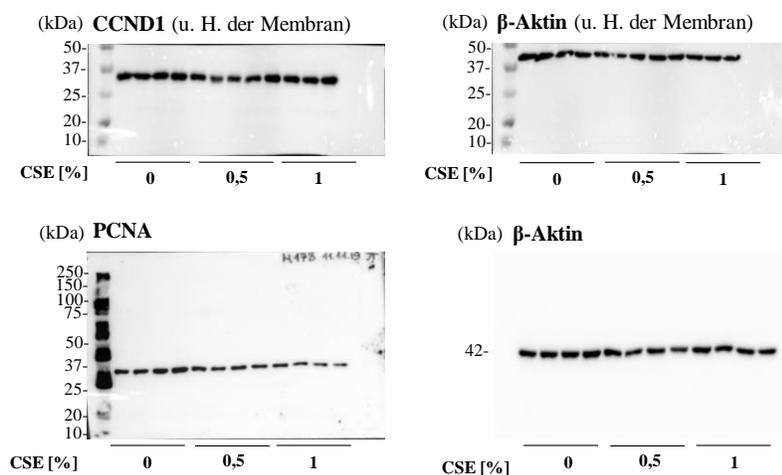


Abbildung 41: Western-Blot von CCND1 und PCNA in hPASC nach chronischer CSE-Inkubation. Western-Blot von CCND1 (34 kDa) und PCNA (29 kDa) nach 120 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 0,5 und 1% ig). β -Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*, u. H.: untere Membranhälfte, o. H.: obere Membranhälfte.

Anhang

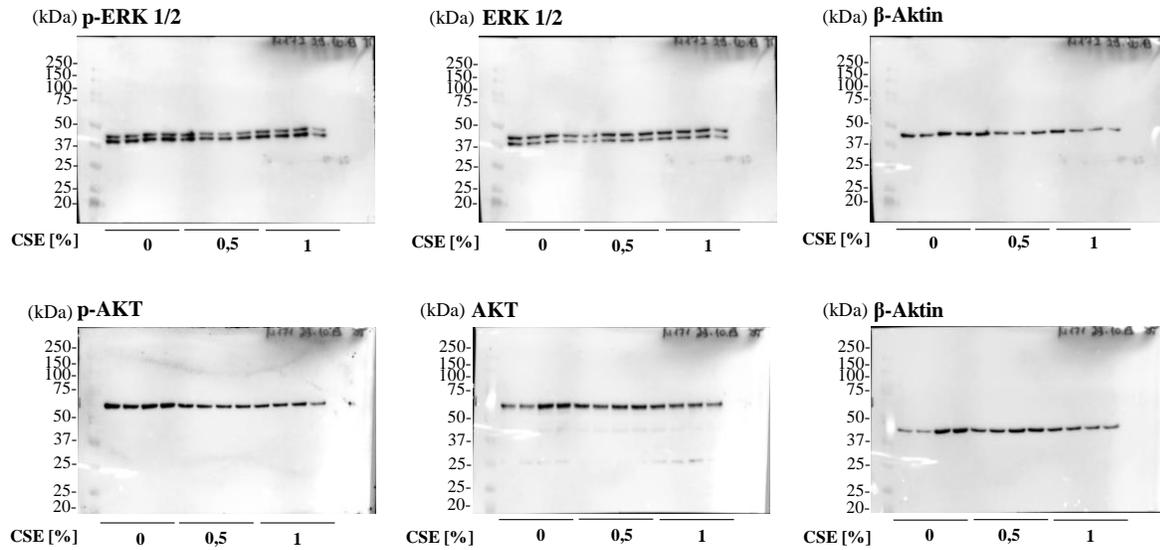


Abbildung 42: Western-Blots von ERK1/2 und AKT in hPASC nach chronischer CSE-Inkubation.

Western-Blots von ERK1/2 (42/44 kDa) und p-ERK1/2 (42/44 kDa), AKT (60 kDa) und p-AKT (60 kDa) nach 120 Std.-Inkubation von hPASC mit CSE (0, 1 und 1,5%ig). β -Aktin (kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. CSE: *cigarette smoke extract*.

zu 3.5.1 Wechselwirkungen zwischen ETV5, SHH und SPRY2 in hPASC

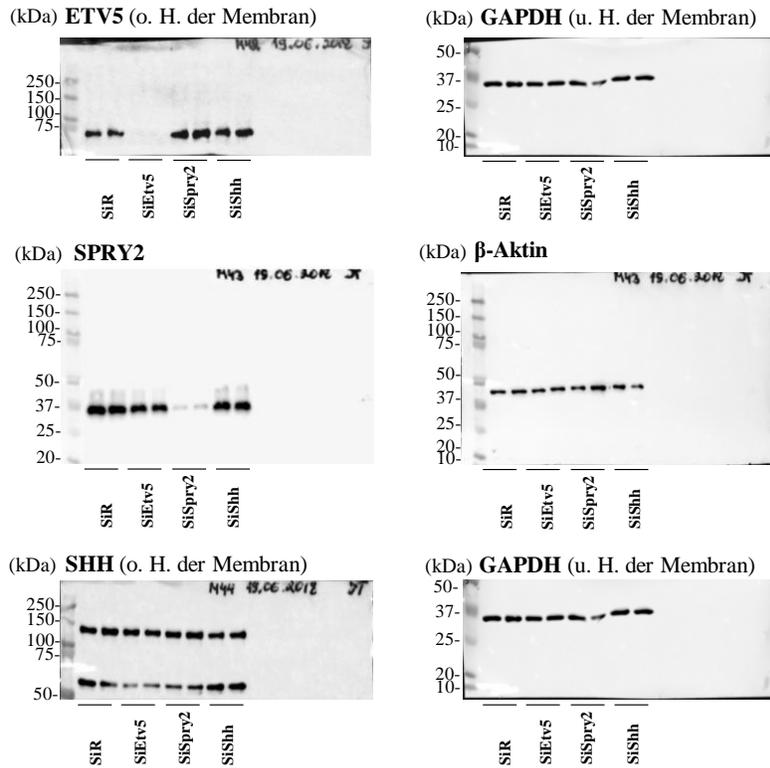


Abbildung 43: Western-Blots von ETV5, SPRY2 und SHH in hPASC nach Knockdown.

Western-Blots von ETV5 (62 kDa), SPRY2 (35 kDa) und SHH (45 kDa) nach SiRNA-Transfektion (48 Std.) gegen ETV5 (SiETV5), SPRY2 (SiSPRY2) oder SHH (SiSHH) im Vergleich zur Kontrolle (SiRandom, SiR). β -Aktin (42 kDa) und GAPDH (37 kDa) als interne Kontrollen (*housekeeping genes*) verwendet. u. H.: untere Membranhälfte, o. H.: obere Membranhälfte.

zu 3.5.2 Einfluss von ETV5, SPRY2 bzw. SHH auf die Expression von Proliferationsmarkern in hPASC

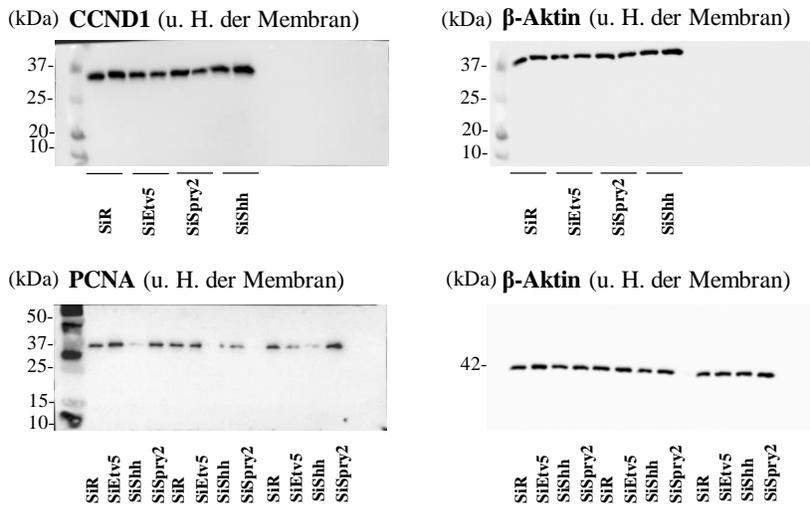


Abbildung 44: Western-Blots von CCND1 und PCNA in hPASC nach Knockdown von ETV5, SPRY2 und SHH.

Western-Blots von CCND1 (34 kDa) und PCNA (29 kDa) nach SiRNA-Transfektion (48 Std.) gegen ETV5 (SiETV5), SPRY2 (SiSPRY2) oder SHH (SiSHH) im Vergleich zur Kontrolle (SiRandom, SiR). β -Aktin (42 kDa) als interne Kontrolle (*housekeeping gene*) verwendet. u. H.: untere Membranhälfte.

11.3 Veröffentlichungen

Hackstein H, **Tshipakow I**, Bein G, Nold P, Brendel C, Baal N (2016). Contact-dependent abrogation of bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cell differentiation by murine mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*.

Hackstein H, Lippitsch A, Krug P, **Schevtschenko I**, Kranz S, Hecker M, Dietert K, Gruber AD, Bein G, Brendel C, Baal N (2015). Prospectively defined murine mesenchymal stem cells inhibit *Klebsiella pneumoniae*-induced acute lung injury and improve pneumonia survival. *Resp Research*.

11.4 Poster Präsentationen

Tshipakow I, Weißmann N, Seeger W, Kraut S, Brosien M. Identification of new pathways in the pathogenesis of pulmonary hypertension (PH) in human chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

12th Annual International Gießen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL) Conference, September 2019, Gießen.

Tshipakow I, Veith-Berger C, Seeger W, Weißmann N, Bednorz M, Kraut S, Brosien M. Identification of new pathways in the pathogenesis of emphysema and pulmonary hypertension in human chronic obstructive pulmonary disease.

11th Annual International Gießen Graduate Centre for the Life Sciences (GGL) Conference, September 2018, Gießen.

12 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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

13 Danksagung

Ich möchte meine Dissertation zum Anlass nehmen, um mich bei Menschen zu bedanken, die mich unterstützt und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Mein Dank geht an Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Professur für *Molecular Mechanisms of Emphysema, Hypoxia and Lung Aging*, im *Cardio-Pulmonary Institute*, Justus-Liebig-Universität Gießen durchzuführen und für die Betreuung.
- Ein herzliches Dankeschön gilt Dr. Monika Brosien für die geduldige und unermüdliche Unterstützung sowie wertvolle Ideen und Anregungen. Ohne ihre fachliche Betreuung wäre diese Arbeit sicher nicht zustande gekommen.
- Bei Dr. Simone Kraut und Dr. Mariola Bednorz möchte ich mich für ihre engagierte Mitbetreuung und Mitorganisation bedanken.
- Weiters möchte ich mich bei Dr. Christine Veith und Ingrid Breitenborn-Müller für die Unterstützung bei der Laborarbeit und für die stets sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Ich danke euch für den geselligen Austausch bei gemeinsamen Mittagspausen.
- Meinen Kolleginnen Anika Nolte, Dr. Ipek Vartürk, Dr. Magdalena Wujak und meinem Kollegen Cheng-Yu Wu danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre sowie für den fachlichen und privaten Austausch.
- Anna Kunz möchte ich für die Unterstützung in der Endphase meiner Doktorarbeit danken.
- Zu guter Letzt danke ich besonders meinem Mann Iwan Tschipakow, meinen Eltern und meiner Schwester, die mich in Zeiten mit geringer Motivation ermutigt haben, nicht aufzugeben, sondern nach vorne zu schauen. Außerdem betreuten sie häufig meine Tochter, um mir meine Arbeit zu ermöglichen.