

Identifizierung und Charakterisierung molekularer Mechanismen vaskulärer Umbauprozesse bei pulmonaler Hypertonie

**Inauguraldissertation
eingereicht im Fachbereich Medizin
in Erfüllung der Anforderungen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Ph.D.
der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von
Friederike Christine Weisel
aus Gießen**

Gießen 2012

Aus dem Exzellenz-Cluster Cardiopulmonales System

Direktor: Prof. Dr. W. Seeger

des Fachbereichs Medizin

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission:

Herr Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission:

Frau Prof. Gabriele Grunig, DVM, PhD

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Frau Prof. Dr. med. vet. Kerstin Fey

Herr Prof. Dr. med. Wolfgang Kummer

Tag der Disputation: 13.07.2012

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Friederike Christine Weisel

Gießen, den 07.05.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in die Thematik.....	1
1.1.1	Anatomie und Physiologie der Lunge	1
1.1.2	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	3
1.2	Pulmonale Hypertonie (PH)	6
1.2.1	Klinische Einteilung der Pulmonalen Hypertonie.....	8
1.3	Pulmonalvaskuläre Umbauprozesse	10
1.3.1	Histologische Veränderungen	10
1.3.2	Initiatoren der pulmonalvaskulären Umbauprozesse	12
1.3.2.1	Mechanische Reize	12
1.3.2.2	Immunsystem	12
1.3.2.3	Weitere Stimuli	13
1.3.2.3.1	Chronische Hypoxie	13
1.3.2.3.2	Vasoaktive Substanzen	13
1.3.2.3.3	Wachstumsfaktoren	14
1.3.3	Einfluss von Proliferation und Apoptose auf vaskuläre Umbauprozesse	15
1.4	Behandlung der PH.....	15
1.5	Tiermodelle in der PH	16
1.5.1	Das Modell der Hypoxie-induzierten PH	16
1.5.2	Das Modell der Monocrotalin-induzierten PH	18
1.5.3	Das Modell der kombinierten Applikation von SU5416 und chronischer Hypoxie	19
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit	19
2	Material und Methoden	21
2.1	Materialien.....	21
2.1.1	Geräte.....	21
2.1.2	Chemikalien/Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3	Zellkultur	25
2.1.4	Liganden und Inhibitoren	26

2.1.5	Enzyme und Größenstandards	26
2.1.6	Kits und Assays	27
2.1.7	Verwendete Antikörper	28
2.1.7.1	Primärantikörper	28
2.1.7.2	Sekundärantikörper	28
2.1.8	Computerprogramme	28
2.1.9	Tiere	29
2.1.10	Puffer und Lösungen	29
2.1.11	Primer- und siRNA-Sequenzen	31
2.1.12	Verwendete Gele	32
2.1.12.1	Polyacrylamidgele	32
2.1.12.2	weitere Gele	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	Versuchstiere	33
2.2.2	Tierversuchsgenehmigung	33
2.2.3	Patientencharakteristika	34
2.2.4	Physiologische Untersuchungen	34
2.2.4.1	Hämodynamische Messungen an der Maus	34
2.2.4.2	Entnahme der Mauslunge	35
2.2.4.3	Entnahme von <i>Arteria carotis</i> und Aorta der Maus	35
2.2.4.4	Präparation des Herzens	36
2.2.5	Zellkultur	36
2.2.5.1	Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen	36
2.2.5.2	Transfektion primärer Zellen	37
2.2.5.3	Bestimmung der Zellzahl	38
2.2.5.4	Stimulation primärer Zellen	38
2.2.6	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.6.1	Lasermikrodissektion	38
2.2.6.2	RNA Isolation	39
2.2.6.3	cDNA- <i>Microarrays</i>	39
2.2.6.4	cDNA Synthese	40
2.2.6.5	quantitative Polymerasekettenreaktion (q-PCR)	40
2.2.6.6	Proteinisolierung	41
2.2.6.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	41

2.2.6.8	Western Blot Analyse	42
2.2.6.9	Herstellung der Sonden für die <i>in situ</i> Hybridisierung.....	43
2.2.6.10	Nicht-isotopische <i>in situ</i> Hybridisierung (NISH) kombiniert mit Immun- fluoreszenz.....	44
2.2.6.11	Immunhistochemische Färbung von PCNA	46
2.2.6.12	Immunhistochemische Doppelfärbung von SMA und vWF	46
2.2.6.13	Bestimmung des Muskularisierungsgrades	47
2.2.6.14	Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)	47
2.2.6.15	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	49
2.2.6.16	MTS Assay	49
2.2.6.17	Thymidin-Inkorporations-Assay	50
2.2.6.18	Apoptose Assay	50
2.2.6.19	Promotoranalyse	51
2.2.7	Statistische Auswertung.....	51
2.2.7.1	Allgemeine statistische Auswertung.....	51
2.2.7.2	Statistische Auswertung von cDNA- <i>Microarrays</i>	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Genomweite Analyse der mRNA-Expression während der Reversion der Hypoxie-bedingten Gefäßumbauprozesse	53
3.2	Lokalisation von AMD-1 in der Mauslunge.....	56
3.3	Lokalisation von AMD-1 in der humanen Lunge.....	58
3.4	AMD-1-Expression in systemischen Gefäßen	61
3.5	Physiologische Untersuchungen von AMD-1 ^{+/-} -Mäusen nach chronisch hypoxischer Exposition	61
3.6	Expression von ODC-1 in der pulmonalen Zirkulation	64
3.7	Physiologische Untersuchungen von ODC-1 ^{+/-} -Mäusen in chronischer Hypoxie	65
3.8	Einfluss der normoxischen Reexposition auf die Hypoxie-induzierte Proliferation	67
3.9	Auswirkung von verminderter AMD-1-Expression auf das Gleichgewicht von Proliferation und Apoptose.....	69
3.10	Einfluss von HIF auf die Hypoxie-induzierte Hochregulation von AMD-1	70

3.11	Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die AMD-1-mRNA-Expression	72
3.12	Regulation der AMD-1-Expression durch EGF-Stimulation	73
3.13	Aufklärung der AMD-1 vorgeschalteten Signalkaskade	76
3.14	Auswirkung einer verminderten AMD-1-Expression auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege	78
4	Diskussion.....	81
4.1	Auswahl des Tiermodells	81
4.2	Auswahl eines Kandidatengens aus den reversiblen Gefäßumbauprozessen der Hypoxie-induzierten PH.....	83
4.3	Polyamine	85
4.3.1	Polyaminbiosynthese	87
4.3.2	Polyaminabbau	87
4.4	Charakterisierung von AMD-1 in der Hypoxie-induzierten PH.....	89
4.5	Aufklärung des Upstream-Signaltransduktionsweges von AMD-1 im Hypoxiemodell	91
4.6	Aufklärung des Downstream-Signaltransduktionsweges von AMD-1 im Hypoxiemodell	94
4.7	Fazit	95
5	Zusammenfassung.....	98
6	Summary	100
7	Anhang I.....	102
8	Anhang II	104
9	Literaturverzeichnis.....	106
10	Abbildungsverzeichnis	123
11	Tabellenverzeichnis.....	125

12 Danksagung	126
13 Lebenslauf	128
13.1 Veröffentlichungen	129
13.1.1 Originalarbeiten	129
13.1.2 Vorträge	129
13.2 Posterpräsentationen.....	130

Abkürzungsverzeichnis

Δ	delta, Differenz
∞	unendlich
5-HT	5-Hydroxytryptamin / Serotonin
%	Prozent
AEZ	Alveolare Epithelzelle
ALK1	<i>Activin receptor-like kinase 1</i> – Aktivinrezeptor-ähnliche Kinase 1
AMD-1	S-Adenosylmethionindecaboxylase 1
AP	Alkalische Phosphatase
APAH	<i>acquired pulmonary arterial hypertension</i> – erworbene pulmonalarterielle Hypertonie
APAO	N ¹ -Acetylpolyaminoxidase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Bronchus
BHK-Zellen	<i>baby hamster kidney cells</i> - Baby-Hamster Nierenzellen
B2M	β_2 Mikroglobulin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> – basaler Fibroblasten Wachstumsfaktor
BMPR2	<i>bone morphogenetic protein receptor type 2</i> – Knochenmorphogentischer Proteinrezeptor 2
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
cADPR	<i>cyclic adenosine diphosphate ribose</i> - zyklische Adenosindiphosphat-Ribose
cDNA	<i>complementary DNA</i> – komplementäre DNA
cGMP	<i>Cyclic guanosine monophosphate</i> – zyklisches Guanosinmonophosphat
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation

cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> – Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX-2	<i>mitogen-inducible cyclo-oxygenase-2</i> – Mitogen-induzierbare Cyclooxygenase 2
cpm	<i>counts per minute</i> – Zähler pro Minute
C _t	<i>Cycle Threshold</i> - Schwellenzyklus
CTEPH	<i>Chronic thromboembolic pulmonary hypertension</i> – Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerol
DEPC	Diethylcarbonat
DFMO	alpha-Difluormethylornithin
DIG	Digoxigenin
DIG-POD-Fab	Digoxigeninperoxidase-Fab Fragmente
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
d-SAM	decarboxyliertes S-Adenosylmethionin
dt	Desoxy-Thymidin-Überhang
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> - Epidermaler Wachstumsfaktor
Egr1	<i>Early Growth Response Protein 1</i> –Frühes Wachstumsantwortprotein 1
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> – Elektrophoretischer Mobilitätsschift Untersuchung
Erk1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinases 1 and 2</i> – Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1 und 2
ET-1	Endothelin-1
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> - und andere
fmol	femtomol (10 ⁻¹⁵)

FPAH	<i>familial pulmonary arterial hypertension</i> – erbliche pulmonalarterielle Hypertonie
FCS	<i>fetal calf serum</i> – fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Gefäß
G1-Phase	<i>gap phase 1</i> - Lückenphase 1
h	<i>hour</i> - Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB-EGF	heparin-bindendes EGF
HCl	Salzsäure
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> - humanes Immundefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
hPASCs	humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
HRE	<i>hypoxic response element</i>
HPV	hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
IgG	Immunglobulin G
IL-1	Interleukin 1
IP ₃	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPAH	idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
K	Kilo
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Ki67	Antigen Ki67
K _v	<i>voltage dependent potassium channel</i> – spannungsabhängiger Kaliumkanal
LV	linker Ventrikel
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

m	Milli (10^{-3})
m ²	Quadratmeter
M	Molar (Mol pro Liter)
mAmp	Milliampère
MAPK	mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
MCT	Monocrotalin
MCT-P	Monocrotalin-Pyrrol
Min	Minute
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPASCs	<i>murine pulmonary arterial smooth muscle cells</i> – murine pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
mRNA	messenger RNA – Boten-RNA
MTA	5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
n	Nummer an Experimenten
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat
NISH	Nicht-isotopische <i>in situ</i> Hybridisierung
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
Np-40	Tergitol Typ NP-40
NPR3	natriuretischer Peptidrezeptor 3
Nr.	Nummer

NYHA	<i>New York Heart Association</i> – New Yorker Herzgesellschaft
O ₂	Sauerstoff
ODC-1	Ornithindecaboxylase 1
P	Perfusion
PAP	<i>pulmonary arterial pressure</i> – Pulmonalarterieller Druck
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie
PASMC	<i>pulmonary arterial smooth muscle cell</i> – pulmonalarterielle glatte Muskelzelle
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBST	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
PCH	<i>pulmonary capillary hemangiomas</i> – pulmonal-kapilläre Hämangiomatose
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDGF-BB	<i>Platelet-derived growth factor</i> – thrombozyten-abstammender Wachstumsfaktor
p-Erk1/2	phosphorylierte Erk1/2
PGI ₂	Prostaglandin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PH	pulmonale Hypertonie
PKC	Proteinkinase C
PLC-γ1	Phospholipase C gamma 1
pmol	Pikomol (10 ⁻¹² mol)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPHN	<i>persistent pulmonary hypertension of the newborn</i> – persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen
p-PLC-γ1	phosphorylierte PLC gamma 1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVOD	<i>pulmonary veno-occlusive disease</i> – pulmonale venookklusive Erkrankung

PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i> - pulmonalvaskulärer Widerstand
p-Wert	<i>p-value, probability value</i> - Signifikanzwert
RIPA	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i> – Radioimmunopräzipitationsassaypuffer
ROC	<i>receptor-operated channel</i> – rezeptor-aktivierter Kanal
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> - Umdrehungen pro Minute
RV	rechter Ventrikel
RVSP	rechtsventrikulärer systolischer Druck
s	Sekunde
S	Septum
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> - Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small-interfering RNA</i> – kleine interferierende RNA
SEM	<i>standard error of the mean</i> – Standardfehler des Mittelwerts
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i> – lösliche Guanylatzyklase
SMA	<i>alpha smooth muscle actin</i> – glattmuskuläres alpha-Aktin
SMO	Sperminoxidase
SOCE	<i>store-operated calcium entry</i> – speicher-aktiverter Calcium-Eintritt
S-Phase	Synthese-Phase
SSAT	Spermidin/Spermin-N ¹ -acetyltransferase
SSC	<i>saline-sodium citrate</i> – Natriumcitrat-Lösung
Stauro	Staurosporin
SU5416	Semaxanib
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> - <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TBST	<i>tris buffer saline</i> mit 0,1 % Tween20
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> – transformierender Wachstumsfaktor beta
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPC6	<i>transient receptor potential channel 6</i>

tRNA	transfer RNA
TXA ₂	Thromboxan A ₂
U	<i>unit</i> – Einheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> – vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
v/v	Volumen pro Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> – Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

1.1.1 Anatomie und Physiologie der Lunge

Die Hauptfunktion der Lunge stellt der Gasaustausch¹ dar. Die Lunge (*Pulmo*) liegt in der Brusthöhle (*Cavitas thoracis*)¹ und umschließt das Herz². Nach unten wird die Lunge durch das Zwerchfell (*Diaphragma*) begrenzt³. Die menschliche Lunge besteht aus 2 Lungenflügeln. Der rechte Lungenflügel (*Pulmo dexter*) wird durch so genannte Furchen in 3, der linke Lungenflügel (*Pulmo sinister*) in 2 Lungenlappen (*Lobi pulmones*) unterteilt³. Die Lappen werden weiterhin in Segmente gegliedert, die jeweils von einem eigenen Segmentbronchus versorgt werden⁴.

Die Atemwege der Lunge werden in luftzuführendes und respiratorisches Gewebe unterteilt. Das luftzuführende Gewebe umfasst die Luftröhre (*Trachea*), die Hauptbronchien (*Bronchi principales*), die Lappenbronchien (*Bronchi lobares*), die Segmentbronchien (*Bronchi segmentales*), sowie mehrere Verzweigungen von Bronchi und Bronchioli. Das anschließende respiratorische System besteht aus den respiratorischen Bronchiolen (*Bronchioli respiratorii*), die in Alveolargängen (*Ductuli alveolares*) und Alveolarsäckchen (*Sacculi alveolares*) enden². Alveolarsäckchen bezeichnen eine Gruppe von Lungenbläschen (*Alveoli*). In den Alveolen findet der Gasaustausch statt. Die Lunge eines erwachsenen Menschen besitzt etwa 300 Millionen Alveolen, die jeweils einen Durchmesser von ca. 200 - 300 µm haben^{3,5}. Für die gesamte Lunge ergibt sich folglich eine respiratorische Fläche von ca. 100 m²². Das sauerstoffarme Blut wird aus der rechten Herzkammer (*Ventriculus cordis dexter*) in den Lungenstamm (*Truncus pulmonalis*) und weiter in die Lungenarterien (*Arteriae pulmonales*) geleitet. Die pulmonalarteriellen Blutgefäße folgen dem Bronchialbaum und verzweigen sich mehrfach, bis sie in Kapillaren enden⁵.

Blutgefäße bestehen im Allgemeinen aus drei verschiedenen Schichten: Die innere Schicht (*Intima*) besteht aus einer einzelnen Schicht von Endothelzellen⁵. Die mittlere Schicht (*Media*) setzt sich vor allem aus Bindegewebe und glatten Muskelzellen zusammen⁵. Den Abschluss formt die äußere Schicht (*Adventitia*), die hauptsächlich aus elastischen und

kollagenen Fasern gebildet wird⁵. Im Gegensatz zu anderen Gefäßen bestehen Kapillaren dagegen nur aus einer einzigen Schicht, der *Intima*, um den Gasaustausch zu vereinfachen⁵. Die Kapillaren bilden ein dichtes Netz, welches die Alveolen umgibt⁵. Hier erfolgt der Gasaustausch (Abbildung 1). Dieser ist durch die große Austauschfläche und die dünne Wandstärke der Kapillaren (ca. 1 μm) begünstigt, wodurch der Diffusionsweg maximal verkürzt ist⁵. Kohlenstoffdioxid (CO_2) wird über die alveolo-kapilläre Membran aus dem Blut in die Alveolen abgegeben³. Sauerstoff (O_2) gelangt entgegengesetzt von den Alveolen in das Blut³. Der Gasaustausch erfolgt passiv durch Diffusion, die sich durch den Unterschied der Partialdrücke in den Alveolen und im Blut ergibt⁵. Der Sauerstoffpartialdruck liegt im venösen Blut der Pulmonalarterie bei etwa 40 mmHg, der für CO_2 bei ca. 46 mmHg. In den Alveolen herrscht ein pO_2 von etwa 100 mmHg sowie ein pCO_2 von ca. 40 mmHg⁵. Dass trotz des geringen Unterschieds im pCO_2 zwischen Alveolen und Blut eine ausreichender Abtransport von CO_2 zu Stande kommt, liegt an einem etwa 23-fach höheren Diffusionskoeffizienten für CO_2 gegenüber O_2 ⁵.

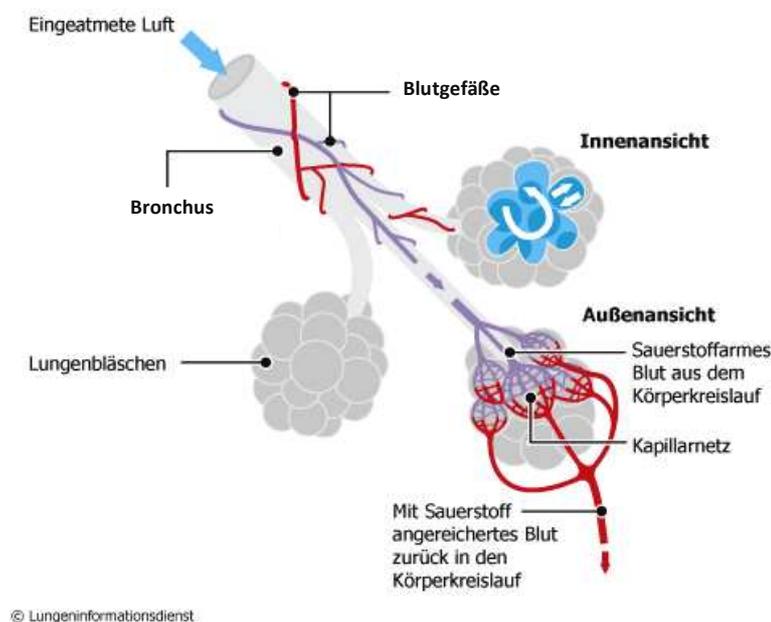


Abbildung 1: Gasaustausch in den Alveolen

Eingeatmete Luft wird über die Luftwege in die Alveolen gebracht, wo O_2 in das Blut abgegeben und im Körperkreislauf verteilt wird. Auf umgekehrtem Weg wird im Körper entstandenes CO_2 vom Blut in die Alveolen überführt und schließlich abgeatmet. Modifiziert mit freundlicher Genehmigung des Helmholtz Zentrums München - Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt⁶.

Das nun mit O₂ angereicherte Blut wird über die Lungenvenen (*Venae pulmonales*) in den linken Vorhof (*Atrium cordis sinistrum*) transportiert, anschließend in die linke Herzkammer (*Ventriculus cordis sinister*) gepumpt und in den großen Körperkreislauf eingebracht⁵.

Die pulmonale Zirkulation stellt unter physiologischen Bedingungen ein System dar, in dem ein hoher Blutfluss, ein niedriger Widerstand der Gefäße sowie ein niedriger Blutdruck herrscht⁷. Der pulmonalarterielle Druck (*pulmonary arterial pressure* – PAP) wird hierbei durch das die Lunge durchfließende Herzzeitvolumen, den Druck im linken Vorhof sowie den pulmonalen Widerstand (*pulmonary vascular resistance* – PVR) bestimmt^{7, 8}. Unter physiologischen Bedingungen kann das pulmonale Gefäßsystem einen Anstieg des Herzzeitvolumens bis auf das sechsfache durch Vasodilatation und Rekrutierung vormals nicht perfundierter Gefäße ausgleichen, ohne dass nennenswerte Anstiege im PAP entstehen⁹.

1.1.2 Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Sauerstoff (O₂) ist für die meisten Lebewesen inklusive des Menschen essentiell. O₂ wird zum einen in der mitochondrialen Atmungskette zur Bildung von ATP und somit zur Energiefixierung benötigt; zum anderen findet O₂ als Substrat Anwendung in vielen Stoffwechselreaktionen. Daher ist eine optimale Sauerstoffversorgung von großer Bedeutung. Kommt es zu einer Abnahme der Sauerstoffkonzentration (Hypoxie), führt dies in den meisten systemischen Arterien durch einen erhöhten Kalium(K⁺)-Auswärtsstrom und einem dadurch bedingten Absinken der intrazellulären Calcium(Ca²⁺)-Konzentration ([Ca²⁺]_i) zu einer Gefäßdilatation¹⁰. Dies ist ein physiologisch notwendiger Prozess, um den Blutfluss als Antwort auf eine Ischämie oder eine erhöhte Nachfrage des Stoffwechsels aufrechtzuerhalten¹¹.

In der pulmonalen Zirkulation liegt ein hoher Blutfluss und geringer Widerstand der Blutgefäße vor, letzterer, um die Blut-Gas-Barriere vor hohen intravaskulären Drücken zu schützen und somit einer alveolären Ödembildung vorzubeugen¹². Hier führt ein lokaler Sauerstoffmangel dagegen durch Inhibition des auswärts gerichteten K⁺-Stroms in den glatten Muskelzellen der Gefäße zu einer Membrandepolarisation und einer dadurch bedingten Vasokonstriktion¹⁰.

Die Tatsache, dass eine alveoläre Hypoxie z.B. durch Minderbelüftung eine Drosselung der Durchblutung (Perfusion) der Lunge auslöst, wird als hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) oder als von-Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet¹³. Die HPV stellt einen konservierten Mechanismus dar, der bei den meisten Säugetieren zu finden ist¹⁴⁻¹⁶. In lokaler Hypoxie wird das Blut durch einen lokal erhöhten Gefäßtonus in sauerstoffreichere Gebiete der Lunge umgeleitet, wodurch eine optimale Abstimmung zwischen Perfusion und Ventilation gewährleistet werden kann (Abbildung 2A). Dieser physiologisch wichtige Adaptionsmechanismus wird bereits durch milde Hypoxie (alveolärer $pO_2 < 100$ mmHg)¹⁷ ausgelöst und ist bei nachfolgender Normoxie vollständig reversibel. Eine weitere physiologische Funktion kommt der HPV in der Embryonalentwicklung zu. Eine permanente Vasokonstriktion in den pulmonalen Gefäßen minimiert den Blutfluss der nicht inflatierten Lunge und schützt somit die pulmonale Zirkulation des Ungeborenen¹⁸. Eine Beeinträchtigung der HPV kann in einer lebensbedrohlichen Hypoxämie enden (Abbildung 2B)¹⁹.

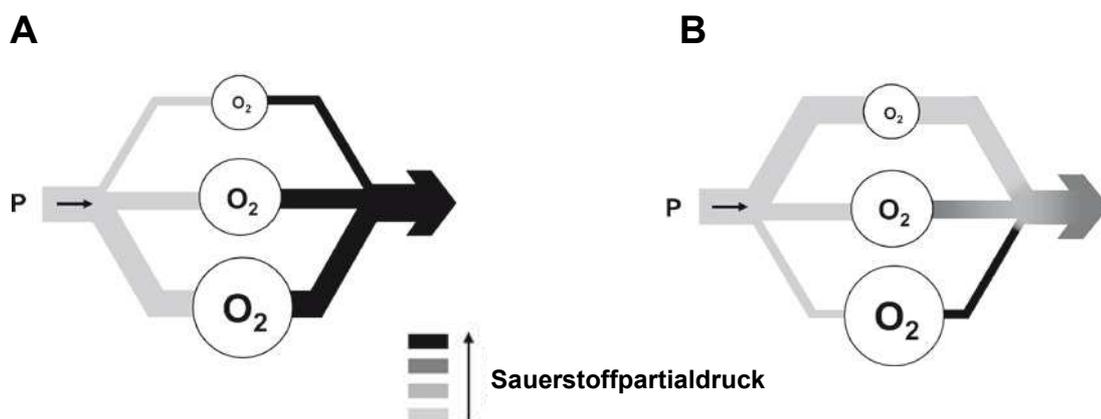


Abbildung 2: Abstimmung von Ventilation und Perfusion durch HPV in der Lunge unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

A) Unter physiologischen Bedingungen wird die Perfusion (P) durch die HPV an den alveolären Sauerstoffpartialdruck (pO_2) angepasst. B) Unter pathologischen Bedingungen kann es dagegen zu einem gestörten Verhältnis von Blutfluss und alveolärer Ventilation kommen, welche in einer Hypoxämie resultieren kann. Die Grautöne des Blutflusses indizieren die Sauerstoffkonzentration im Blut, je dunkler desto höher ist diese. Die großen Kreise symbolisieren einen hohen pO_2 , kleine einen niedrigen. Fuchs et. al.¹⁹, modifiziert.

Die HPV lässt sich in 3 Phasen unterteilen: Die akute alveoläre Phase dauert Sekunden bis wenige Minuten an, die protrahierte alveoläre Phase liegt in einem Bereich der bis zu

mehreren Stunden anhält und geht schließlich in die chronische Hypoxie über²⁰.

Eine solche generalisierte und chronische Hypoxie kann bei vielen Lungenerkrankungen wie chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease* - COPD), Pneumonie oder Fibrose sowie bei Bewohnern großer Höhen auftreten.

Als Einflussfaktoren für die HPV gelten unter anderem lokale und zirkulierende vasoaktive Substanzen wie z.B. Endothelin-1 (ET-1) oder NO, geschlechtsspezifische Unterschiede sowie Abweichungen in pH und PCO_2 ^{18, 21}. Es konnte jedoch noch nicht hinreichend geklärt werden, durch welchen Sauerstoffsensor eine HPV ausgelöst wird. Sommer *et al.* definieren aber die Eigenschaften, die dieser besitzen muss: Zum einen muss der Sensor selbst sensibel auf milde Hypoxie reagieren, zum anderen muss der Sensor mit den Effektorzellen der HPV kommunizieren¹⁸. Als solche Effektor-Zellen werden präkapillare pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (*Pulmonary arterial smooth muscle cells* - PASMCs) angesehen²²⁻²⁴.

Veränderungen im Calciumhaushalt sind von entscheidender Bedeutung für die pulmonale Vaskonstriktion und in vaskulären Umbauprozessen, da ein Anstieg im intrazellulären Calcium ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) einer der Hauptauslöser für die Kontraktion und das Wachstum der glatten Muskelzellen ist⁹. Eine Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann entweder durch Ca^{2+} -Einstrom oder durch die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern erfolgen²⁵.

Es gibt mehrere Hypothesen, auf welche Weise der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ während der HPV ansteigt: So wird eine Aktivierung der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK), welche zu einer cADPR (zyklische Adenosindiphosphat-Ribose - *cyclic Adenosine diphosphate ribose*)-abhängigen Mobilisierung von Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums führt²⁶, diskutiert. Dies induziert nachfolgend einen speicher-aktivierten Calcium-Eintritt (*store-operated calcium entry* – soce)²⁷. Ebenso werden Veränderungen in der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* - ROS)²² erwogen. Hierbei ist allerdings nicht geklärt, ob die Bildung von ROS unter Hypoxie erniedrigt oder erhöht ist.

Manche Autoren gehen von einer Abnahme der ROS-Produktion unter hypoxischen Bedingungen aus. Ein Abfall von ROS führt laut dieser Hypothese zu einer verminderten Oxidierung von Sulfhydrylgruppen an spannungsabhängigen K^+ -Kanälen (*voltage-dependent potassium channels*, K_v), wodurch diese inhibiert werden^{7, 28}. Als Folge kommt es zur Depolarisation und zu einem Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -

Kanäle¹⁰. Gegen die alleinige Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle spricht allerdings, dass die Gabe von Ca^{2+} -Kanalblockern vom L-Typ wenig Einfluss auf die HPV hat²⁹ und dass die HPV nach Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher nicht mehr ablaufen kann³⁰. Des Weiteren führt die verminderte Funktion von K^+ -Kanälen aber auch zur gesteigerten Produktion von Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP_3). Dies hat eine Freisetzung von Ca^{2+} aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum und die Umkehrung der Arbeitsweise des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers zur Folge, was ebenso die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration erhöht⁹. Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass Antioxidantien nicht den gleichen Effekt wie Hypoxie bewirken²². Eine weitere Hypothese geht dagegen von einer Hypoxie-induzierten Erhöhung der ROS-Produktion in den Mitochondrien oder durch Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADPH)-Oxidasen aus, welche zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus Ryanodin-sensitiven Ca^{2+} -Speichern, Aktivierung von L-Typ- und intrazellulären Ca^{2+} -Kanälen sowie von Rho-Kinasen und der Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktor-1 (HIF-1) führen kann^{22, 31, 32}. Des Weiteren induziert freigesetztes ROS einen Influx von extrazellulärem Ca^{2+} durch die Inhibierung von K_v -Kanälen und die Aktivierung von TRPC-Kanälen (*transient receptor potential channel*) was zu einem starken Anstieg an intrazellulärem Ca^{2+} in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen führt³³.

Als Folge einer anhaltenden HPV durch chronische Hypoxie können pulmonale Hypertonie (PH) und Rechtsherzversagen auftreten^{34, 35}.

1.2 Pulmonale Hypertonie (PH)

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Sammelbezeichnung für Krankheiten, die durch eine progressive Erhöhung des Gefäßwiderstands und einen Anstieg des Blutdrucks im Lungenkreislauf gekennzeichnet sind. Fasst man alle Formen der PH zusammen, so leiden bis zu 100 Millionen Menschen weltweit an dieser Erkrankung³⁶. Unbehandelt liegt die mittlere Lebenserwartung bei 2,8 Jahren ab der Diagnosestellung³⁷.

Der Normbereich des pulmonalarteriellen Drucks (*pulmonary arterial pressure* - PAP) in Ruhe wird in der aktuellen Klassifikation mit Werten bis 20 mmHg beschrieben³⁸. Als Grenzwerte gelten demnach folgende: ein PAP < 21 mmHg wird als normal bezeichnet, Werte zwischen 21 und 25 mmHg gelten als grenzwertig, ein PAP ab 25 mmHg entspricht

einer manifesten PH. Die zuvor in der Definition der PH aufgeführten Grenzwerte unter Belastung wurden in der neusten Klassifikation ausgenommen, da diese stark altersabhängig sind³⁸ und auch Gesunde weit höhere Werte erzielen können³⁹.

Des Weiteren ist die PH durch vaskuläre Proliferation und strukturellen Veränderungen in der Gefäßwand (pulmonalvaskuläre Gefäßumbauprozesse, siehe Punkt 1.3) gekennzeichnet⁴⁰. Der rechte Ventrikel muss eine höhere Kraft aufbringen, um das Blut gegen den erhöhten PVR in die Lunge zu pumpen. Wenn der rechte Ventrikel diese Kraft im Verlauf der PH nicht mehr aufbringen kann, manifestiert sich meist eine Rechtsherzinsuffizienz, die zum Tode des Patienten führen kann⁷. Die Stadien der PH sind in Anlehnung an die Klassifizierung der Herzinsuffizienz durch die *New York Heart Association* (NYHA) wie folgt unterteilt (Tabelle 1):

Tabelle 1: Funktionelle Klassifikation der PH

Modifiziert von der funktionellen Einteilung der Herzinsuffizienz durch die New York Heart Association gemäß WHO 1998⁴¹. Galie *et al.*⁴², modifiziert.

Funktionelle Klasse	Definition
I	Patienten mit PH aber ohne daraus resultierende Einschränkungen der physischen Aktivität. Normale physische Aktivität verursacht weder übermäßige Dyspnoe noch Fatigue, Brustschmerzen oder drohende Synkope.
II	Patienten mit PH, die durch die Krankheit leichte Einschränkungen der physischen Aktivität haben. In Ruhe sind keine Symptome spürbar. Normale physische Aktivität resultiert in übermäßiger Dyspnoe, Fatigue, Brustschmerzen oder drohender Synkope.
III	Patienten mit PH, die deutliche Einschränkungen der physischen Aktivität besitzen. Die Patienten spüren keine Symptome in Ruhe. Geringe physische Aktivitäten verursachen jedoch übermäßige Dyspnoe, Fatigue, Brustschmerzen oder drohender Synkope.
IV	Patienten mit PH, die unfähig sind körperliche Aktivitäten jeglicher Form durchzuführen ohne Symptome zu erleiden. Diese Patienten zeigen Zeichen einer Rechtsherzinsuffizienz. Dyspnoe und/oder Fatigue können sogar in Ruhe auftreten. Das Unwohlsein wird durch jegliche Art von physischer Aktivität erhöht.

1.2.1 Klinische Einteilung der Pulmonalen Hypertonie

Die erste Klassifikation der PH erfolgte 1973 auf der ersten internationalen Konferenz der PH und wurde seitdem mehrfach überarbeitet⁴². Die neuste Fassung wurde auf dem vierten Welt-Symposium der PH 2008 in Dana Point, Kalifornien, USA, aufgestellt.

PH besitzt eine multifaktorielle Pathogenese. Sie kann ohne bekannte Ursache auftreten (idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie, *idiopathic pulmonary arterial hypertension*, IPAH), vererbbar sein oder im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen^{43, 44} auftreten. Alle Formen der PH sind durch vaskuläre Proliferation und strukturelle Veränderungen in der Gefäßwand gekennzeichnet (pulmonalvaskuläre Umbauprozesse, siehe Punkt 1.3)⁴⁰.

Die erste Gruppe umfasst Patienten, bei denen die primäre Ursache in den kleinen Pulmonalarterien lokalisiert ist⁴⁵. Man spricht daher auch von einer pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH). Darin sind idiopathische, vererbbare und erworbene (*acquired pulmonary arterial hypertension* - APAH) Fälle eingeschlossen. Als genetisch prädisponierende Faktoren werden Mutationen im *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2* (BMPR2), in der *Aktivin Rezeptor-like Kinase Typ 1* (ALK1) sowie Endoglin angesehen; dies sind alles Rezeptoren der TGF- β -Familie^{46, 47}. Des Weiteren werden arzneimittel- und toxin-induzierte Erkrankungen der Gruppe eins zugeordnet. Zu den APAH zählen Fälle von PH in Verbindung mit Kollagenosen, HIV-Infektionen, portaler Hypertonie, angeborenen Herzfehlern und Schistosomiasis. Schließlich bilden Fälle von persistierender pulmonalarterieller Hypertonie der Neugeborenen (*persistent pulmonary hypertension of the newborn* - PPHN), pulmonale venookklusive Erkrankungen (*pulmonary veno-occlusive disease* - PVOD) und/oder pulmonal kapillärer Hämangiomatose (*pulmonary capillary hemangiomatosis* - PCH) den Abschluss dieser Gruppe⁴².

In Gruppe zwei werden Fälle zusammengefasst, die auf Grund von Erkrankungen des linken Herzens entstehen, daher spricht man auch von „pulmonal-venöser Hypertonie“⁴⁵. Ist der linke Ventrikel nicht in der Lage, genügend Blut in den Körperkreislauf zu pumpen, erfolgt ein Rückstau in die Lunge und somit dort ein Druckerhöhung.

Eine der häufigsten Ursachen einer PH ist die chronische Hypoxie⁴⁸ und wird in der aktuellen Klassifikation in Gruppe drei „PH auf Grund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie“ geführt. Treten bei Patienten Hypoxie und Lungenerkrankungen in Kombination auf, so ist die Überlebensrate gering⁴⁵. Pathologische Veränderungen in dieser Gruppe

schließen mediale Hypertrophie und intimale obstruktive Proliferation der distalen Pulmonalarterien ein. Des Weiteren können Zerstörungen des Gefäßbettes in emphysematösen oder fibrotischen Gebieten ebenfalls auftreten. Die zu Grunde liegenden Mechanismen sind vielfältig und schließen hypoxische Vasokonstriktion, mechanischen Stress von hyperinflatierten Lungen, Kapillarverlust, Inflammation und toxische Effekte durch Zigarettenrauch mit ein⁴².

Gruppe vier umfasst Fälle, die durch chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (*chronic thromboembolic pulmonary hypertension* - CTEPH) charakterisiert sind. Hierbei führt eine unvollständige Auflösung von pulmonalen Embolien zu einem Anstieg im PAP und schließlich zum Rechtsherzversagen⁴⁵.

In Gruppe fünf werden schließlich alle anderen Formen zusammengefasst, in denen unklare und multifaktorielle Ursachen zur Ausbildung einer PH führen. Eine detaillierte Klassifikation ist in Tabelle 2 aufgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wird vor allem auf die „Pulmonale Hypertonie auf Grund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie“ (Gruppe 3) eingegangen, da die Verwendung des Mausmodells der Hypoxie-induzierten PH diesem Patientenkollektiv am nächsten steht. Aber auch die Gruppe 1 (PAH), wird in dieser Arbeit berücksichtigt, da sie histologisch nicht einwandfrei von der Hypoxie-induzierten Form abgrenzbar ist⁷. So führt in beiden Fällen ein initialer Stimulus vor allem zu Gefäßumbauprozessen in den Arterien^{42, 45} bzw. haben auch Untersuchungen am Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH in vorangegangenen Studien Schlüsse auf das pathophysiologische Geschehen bei IPAH zugelassen⁴⁹.

Tabelle 2: Klinische Klassifikation der PH

Simonneau *et al.*³⁶, modifiziert.

Klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Dana Point, 2008)
1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)
1.1. Idiopathische PAH (IPAH)
1.2. Erbliche pulmonalarterielle Hypertonie (FPAH)
1.2.1. BMPR2
1.2.2. ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hemorrhagischer Teleangiektasie)
1.2.3. unbekannter Genese
1.3. arzneimittel- und toxin-induziert
1.4. Assoziierte Pulmonalarterielle Hypertonie (APAH); bei:
1.4.1. Kollagenosen
1.4.2. HIV-Infektion
1.4.3. Portale Hypertonie
1.4.4. angeborene Herzfehler
1.4.5. Schistosomiasis
1.4.6. Chronisch hämolytische Anämie

1.5 Persistente pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
1'. Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
2. Pulmonale Hypertonie auf Grund von Erkrankungen des linken Herzens
2.1. Systolische Dysfunktion
2.2. Diastolische Dysfunktion
2.3. Herzklappenerkrankung
3. Pulmonale Hypertonie auf Grund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
3.2. Interstitielle Lungenerkrankung
3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischtem restriktiven und obstruktiven Erscheinungsbild
3.4. Schlafapnoe-Syndrom
3.5. Alveoläre Hypoventilation
3.6. Chronische Exposition in großer Höhe
3.7. Entwicklungsstörungen
4. Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen
5.1. Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenectomie
5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vasculitis
5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeichererkrankung, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
5.4. Andere: Tumorale Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse

1.3 Pulmonalvaskuläre Umbauprozesse

1.3.1 Histologische Veränderungen

In der Etablierung der PH erfährt das pulmonale Gefäßbett strukturelle Veränderungen, die auch pulmonalvaskuläres *Remodeling* genannt werden⁵⁰. Diese pulmonalen Gefäßumbauprozesse sind durch die Verdickung aller drei in der Gefäßwand vorkommenden Schichten charakterisiert⁵¹. Diese kommen durch Zellwachstum (Hypertrophie) und/oder Zellproliferation (Hyperplasie) der prädominanten Zelltypen in den jeweiligen Schichten zustande⁵¹ (Abbildung 3). Da die Muskelschicht in Arterien stärker ausgeprägt ist als in Venen, tritt dort auch die Verdickung der Media stärker auf⁵². Des Weiteren ist eine Ausdehnung einer neuen Muskelschicht in normalerweise nur teil- oder nicht muskularisierte Bereiche von peripheren Arterien zu beobachten. Diese neue Muskelschicht entsteht durch Migration von glatten Muskelzellen und/oder durch Rekrutierung und Differenzierung von Fibroblasten in glatte Muskelzellen^{53, 54} und wird als Neomuskularisierung bezeichnet. Die Verdickung der Gefäße und die Neomuskularisierung führen zu einer verminderten *Compliance*, wodurch Anstiege im Herzzeitvolumen nicht mehr durch arterielle Distension abgemildert werden können, ohne große Anstiege im PAP und PVR zu verursachen⁷. Des Weiteren wird das Lumen der

Gefäße eingeengt⁵⁵, wodurch ebenso der Gefäßwiderstand erhöht wird. Der Verlust der *Compliance* und die darausfolgende Erhöhung von PVR und PAP führen zur Aktivierung von Genen, die Gewebeumbauprozesse in pulmonalen Arterien induzieren. Somit steigt der PVR noch stärker und ein positives *Feedback* zwischen PVR und PAP entsteht⁷.

Ein weiteres histologisches Merkmal der PH kann die Bildung von plexiformen Läsionen sein. Hierbei handelt es sich um auffällige pulmonalvaskuläre Strukturen, die durch Verschluss des arteriellen Lumens, aneurysmatischen Aussackungen der Arterien sowie Proliferation von Endothel- und glatten Muskelzellen charakterisiert sind⁵⁶. Diese finden sich vor allem in kleinen Arterien $< 300 \mu\text{m}$ ⁵⁴ und treten insbesondere bei IPAH auf, können aber auch bei anderen Formen der PH vorhanden sein⁹. Es wird auch ein Verlust peripherer Gefäße beobachtet, der durch Veränderungen in Endothelzellen und/oder in Perizyten bedingt sein könnte⁵⁷.

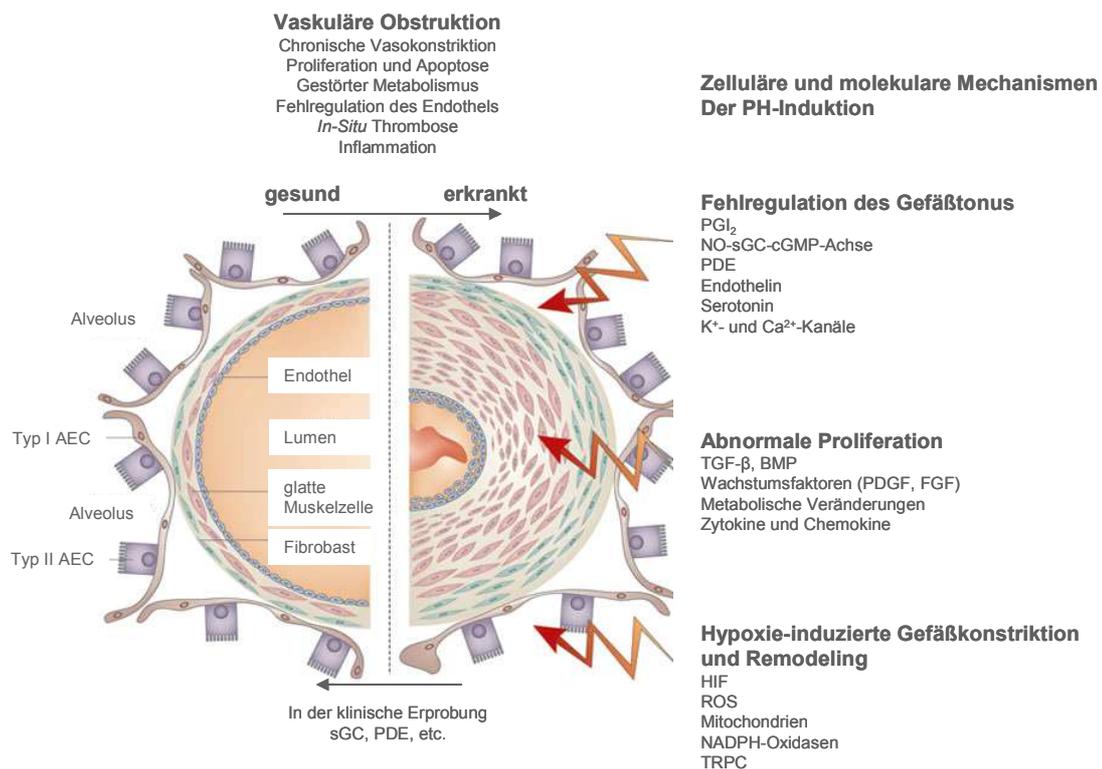


Abbildung 3: Vaskuläre Veränderungen in der PH

Schematische Darstellung der Gefäßveränderungen und möglichen Einflussfaktoren in der PH. Die erhöhte Proliferation von Fibroblasten, glatten Muskel- und Endothelzellen führt zu einem eingeschränkten Lumen und somit zu einem großen Anstieg der Nachlast des rechten Ventrikels. (AEC = Alveolare Epithelzelle, PGI₂ = Prostaglandin, NO = Stickstoffmonoxid, sGC = lösliche Guanylatzyklase, cGMP = zyklisches

Guanosinmonophosphat, PDE = Phosphodiesterase, K^+ = Kalium, Ca^{2+} = Calcium, TGF- β = transformierender Wachstumsfaktor β , BMPR2 = *Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2*, PDGF = *Platelet-derived growth factor*, FGF = *Fibroblast growth factor*, HIF = Hypoxie-induzierbarer Faktor, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, NADPH = Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat, TRPC = *transient receptor potential channel*). Schermuly *et al.*⁵⁸, modifiziert.

1.3.2 Initiatoren der pulmonalvaskulären Umbauprozesse

Es werden verschiedene mögliche Ursachen diskutiert, die alleine und/oder in Kombination für die Umbauprozesse verantwortlich sein könnten^{50, 59} und Abweichungen von der Norm auf multigenetischer, zellulärer und molekularer Basis sowie auf der Ebene des Immunsystems vereinen⁹.

So können diese Veränderungen durch physikalische Reize und/oder durch chemische Stimuli ausgelöst werden⁵¹. Des Weiteren werden initiale Ereignisse wie Inflammation, virale Infektion und genetische Prädisposition diskutiert⁶⁰. Allgemein wird angenommen, dass diese Stimuli eine Fehlfunktion des Endothels bedingen und somit eine veränderte Freisetzung von Mediatoren auslösen⁶⁰.

1.3.2.1 Mechanische Reize

Zu den mechanischen Reizen gehören mechanische Ausdehnung, Scherstress und ein erhöhter transmuraler Druck⁵¹. Sie induzieren eine erhöhte Produktion von Bestandteilen der extrazellulären Matrix⁶¹, fördern die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten⁶² und steigern die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration⁵¹. Durch Scherstress können darüber hinaus sogenannte Scherstress-*Response* Elemente aktiviert werden, die in den Promotoren wichtiger Wachstumsfaktoren wie dem *Platelet-derived growth factor* (PDGF) gefunden wurden⁶³.

1.3.2.2 Immunsystem

Auf humoraler Ebene ist eine vermehrte Sekretion von Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1),

Tumor-Nekrose-Faktor und Interferonen zu nennen. Inflammatorische Zellen können darüber hinaus auch die Expression von Wachstumsfaktoren in Zellen der Gefäße verändern⁵⁰.

1.3.2.3 Weitere Stimuli

1.3.2.3.1 Chronische Hypoxie

Eine chronisch hypoxische Exposition kann ebenso Gefäßumbauprozesse induzieren. Chronische Hypoxie führt zu einem erhöhten pulmonalarteriellen Druck, einer Rechtsherzhypertrophie sowie zu einer verstärkten Muskularisierung der kleinen präkapillären Gefäße der Lunge^{54, 64}. Ebenso nimmt chronische Hypoxie Einfluss auf die Expression bestimmter Gene: So können Wachstumsfaktoren wie der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)⁶⁵ durch Hypoxie induziert werden, genauso wie der Hypoxie-induzierbare Faktor (*hypoxia-inducible factor* - HIF), welcher ein Schlüsselprotein für die Regulation vieler Gene unter hypoxischen Bedingungen darstellt^{50, 66}. Hypoxie verhindert darüber hinaus die Ausschüttung von antimitogenen Faktoren wie Prostazyklin⁶⁷ und führt zur vermehrten Produktion von Transkriptionsfaktoren, die Gene von mitogenen Mediatoren wie die Mitogen-induzierbare Cyclooxygenase 2 (*mitogen-inducible cyclooxygenase-2* – COX-2) aktivieren⁶⁵. Ebenso wird die Produktion und/oder die Freisetzung von mitogenen Faktoren wie Endothelin-1 (ET-1)⁶⁸ oder Interleukin 1 (IL-1)⁶⁹ unter hypoxischen Bedingungen erhöht⁵¹. Schließlich wird durch Hypoxie die HPV ausgelöst (Abschnitt 1.1.2) was zu einem Anstieg im PAP, PVR und Scherstress führt, und somit eine positive *Feedback*-Schleife aktivieren kann⁵¹.

1.3.2.3.2 Vasoaktive Substanzen

In der PH ist das Gleichgewicht zwischen im Endothel gebildeten Vasokonstriktoren und -dilatatoren verschoben. So werden vermehrt Stoffe gebildet, die die Gentranskription und Promotion des Zellzyklus beeinflussen, wodurch ein proliferatives und vaskonstruktives Milieu im Gefäßbett entsteht⁹. Zu den involvierten Vasokonstriktoren gehört u.a. Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), welches auch im Plasma von IPAH-Patienten erhöht ist⁷⁰. Ein Polymorphismus im Serotoninstoffwechsel wird in bestimmten IPAH-Fällen und in hypoxämischen Patienten mit COPD vermutet^{42, 71}. Mäuse mit einer gezielten 5-HT-

Deletion sind weniger empfänglich, eine Hypoxie-induzierte PH zu etablieren⁷², während eine Überexpression desselben Gens zu einer schwereren PH führt⁷³. Eine weitere vasoaktive Substanz ist der mitogene Vasokonstriktor ET-1⁷⁴. Dieser ist in PH-⁷⁵ und COPD-^{76, 77} Patienten erhöht und eine Inhibition des ET-1-Rezeptors in Ratten führt zur Reversion der Hypoxie-induzierten PH⁷⁸. Darüber hinaus wird eine vermehrte Produktion der Vasokonstriktoren Thromboxan A₂ (TXA₂) und Angiotensin II⁷⁹ in PH-Patienten berichtet. Neben ihrer vasokonstriktorischen Funktion wird Angiotensin II⁸⁰, TXA₂⁸¹ und 5-HT⁷⁷ auch eine Rolle in der Thrombozytenaktivierung und der Entstehung von Thromben zugesprochen⁹.

Die Vasodilatation ist dagegen herabgesetzt. Als verminderte Vasodilatoren sind vor allem Prostazyklin, Stickstoffmonoxid (NO) und dessen *Second Messenger*-Molekül, das zyklische Guanosinmonophosphat (*cyclic guanosine monophosphate* - cGMP), zu nennen⁹.

1.3.2.3.3 Wachstumsfaktoren

Des Weiteren wurden Veränderungen in der Produktion von Wachstumsfaktoren und/oder ihren Rezeptoren in der Entwicklung der PH beobachtet. Eine vermehrte Expression des Wachstumsfaktors PDGF, der stark mitogen auf pulmonalarterielle glatte Muskelzellen wirkt⁸², wurde sowohl im Tiermodell⁸³ als auch in Patienten mit schwerer PH nachgewiesen^{83, 84}. Eine Überexpression führte zur Verstärkung der Hypoxie-induzierten PH⁸⁵, eine Inhibition dagegen in verschiedenen experimentellen PH-Modellen zum Rückgang der Symptome^{83, 85, 86}. Darüber hinaus wurden veränderte Spiegel der Wachstumsfaktoren *basic fibroblast growth factor* (bFGF)⁸⁷, *transforming growth factor β* (TGF-β), *epidermal growth factor* (EGF) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) sowohl in humanem Gewebe als auch in experimentellen Tiermodellen der PH gefunden⁸⁸.

Den Wachstumsfaktoren PDGF und VEGF wird des Weiteren eine Funktion in der Thrombozytenaktivierung und der Entstehung von Thromben zugesprochen⁹.

1.3.3 Einfluss von Proliferation und Apoptose auf vaskuläre Umbauprozesse

In der pulmonalen Zirkulation besteht ein fragiles Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose, welches zur Aufrechterhaltung der normalen Gefäßstruktur und der funktionalen Integrität der pulmonalen Gefäße wichtig ist. In der PH ist dieses Gleichgewicht gestört, es wird eine erhöhte Proliferation und eine verminderte Apoptose verzeichnet²⁸. Durch Akkumulation von Zellen mit einem hohen proliferativen Potential, die auch eine relative Apoptose-Resistenz aufweisen können, werden Gefäßumbauprozesse initiiert⁹⁰. Diese führen zu einer Verdickung der Gefäßwand, einer Verengung des Lumens und schließlich zu einer Obliteration des Gefäßes⁷. Dadurch wird die Querschnittsfläche des Gefäßes vermindert, was zu einem erhöhten PVR führt⁷. Darüber hinaus wird die vaskuläre *Compliance* vermindert, welche wichtig für das Auffangen des angestiegenen Herzzeitvolumens durch Vasodilatation und dem Rekrutieren vormals nicht perfundierter Gefäße ist⁷. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose kann auch durch eine verminderte Expression und Funktion von K⁺-Kanälen bewirkt werden²⁸.

1.4 Behandlung der PH

Obwohl sich die therapeutischen Optionen in den letzten Jahren verbessert haben, ist die PH immer noch nicht heilbar⁹¹.

Liegt eine positive Antwort auf die Applikation von Vasodilatoren vor, gelten Calcium(Ca²⁺)-Kanalinhibitoren wie Nifedipin oder Diltiazem in diesen Fällen als Mittel der Wahl. Dies ist jedoch nur bei weniger als 10 % der Patienten der Fall⁹².

Die besten therapeutischen Ergebnisse werden aktuell durch die Wiederherstellung des verschobenen Gleichgewichts zwischen Vasokonstriktion und –dilatation erzielt⁹³. Je nach Schwere der Erkrankung wird eine Mono- oder Kombinationstherapie aus ET-1- und/oder Phosphodiesterase-5(PDE-5)-Inhibitoren sowie Prostanoiden eingesetzt⁴². Die PDE-5 ist ein Enzym, welches den Abbau des vasodilatatorisch wirkenden zyklischen Guanosinmonophosphat (*cyclic guanosine monophosphate* – cGMP) hemmt und somit dessen Wirkdauer verlängert. Bessert sich der Zustand des Patienten durch die

medikamentöse Behandlung nicht, sollte eine Lungentransplantation in Erwägung gezogen werden⁴².

Mit Riociguat steht momentan ein Stickstoffmonoxid(NO)-unabhängiger Stimulator der löslichen Guanylatzyklase in Phase III der klinischen Prüfung, der die Bildung des zyklischen Guanosinmonophosphats fördert⁵⁸. Des Weiteren zeigten sich bereits positive Effekte im klinischen Einsatz des PDGF-Inhibitors Imatinib⁹⁴.

Mit den aktuell etablierten Behandlungsmöglichkeiten werden aber vermutlich nur die manifestierten Folgeerscheinungen statt der zentralen pathologischen Ursachen der Erkrankung selbst adressiert⁵⁶.

1.5 Tiermodelle in der PH

Um die PH, ihre Ursachen und die damit einhergehenden pathophysiologischen Veränderungen besser verstehen zu können, wurden verschiedene experimentelle Tiermodelle entwickelt, die die Symptome der humanen PH simulieren. Durch Verwendung dieser Modelle könnten neue Therapiekonzepte gefunden und somit die Krankheit geheilt werden.

Die beiden meistgenutzten Tiermodelle der PH werden auch als „klassische Modelle“ bezeichnet⁹⁵. Sie bestehen aus dem Modell der Hypoxie-induzierten PH sowie dem Monocrotalin(MCT)-Modell.

1.5.1 Das Modell der Hypoxie-induzierten PH

In der experimentellen, Hypoxie-induzierten PH erfährt das pulmonale Gefäßsystem nach chronisch hypoxischer Exposition einen Umbauprozess, der in einer anhaltenden Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands und einer gesteigerten Rechtsherzhypertrophie resultiert⁵⁴.

Der verminderte O₂-Partialdruck führt zu einer Muskularisierung vormals nicht muskularisierter Arterien, einer Verdickung präkapillärer Arterien⁵⁴ und einer Hypertrophie

von glatten Muskelzellen und Fibroblasten^{96,97}. Gleichzeitig kommt es durch Hypoxie auch zu einer veränderten Ausschüttung von Mediatoren, wodurch ein proliferatives und vaskonstriktives Milieu im Gefäßbett entsteht⁹. Dies induziert in der Folge einen erhöhten Scherstress⁵¹. Daneben wurde auch von einer inflammatorischen Antwort der Pulmonalarterien berichtet⁹⁸.

In der experimentellen Forschung wird das Modell der Hypoxie-induzierten PH vor allem an Maus und Ratte angewendet. Generell führt eine chronische hypoxische Exposition aber in fast allen Säugetieren zu ähnlichen strukturellen Veränderungen⁵⁴.

In der Klinischen Klassifikation der PH (siehe Punkt 1.2.1) steht das Tiermodell der Hypoxie-induzierten PH der Gruppe 3 „pulmonale Hypertonie auf Grund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie“⁵⁴ und somit einem großen Patientenkollektiv⁶⁰ am nächsten. Gleichzeitig sind die Hypoxie-bedingten strukturellen Veränderungen, die vor allem die Pulmonalarterien betreffen^{42, 45, 99}, histologisch nicht immer einwandfrei von denen der Gruppe 1 („pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)“) abzugrenzen⁷.

Als einziges Tiermodell der PH ist das Modell der Hypoxie-induzierten PH nach Aufheben des Stimulus reversibel. So wird die durch akute Hypoxie induzierte Kontraktion der pulmonalen Gefäße durch normoxische Sauerstoffzufuhr aufgehoben. Aber auch die in verschiedenen Tiermodellen durch chronische Hypoxie ausgelösten vaskulären Umbauprozesse sind durch Reoxygenierung reversibel¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ (Abbildung 4). Dieser Aspekt erlaubt Einblicke in die Mechanismen zu nehmen, die an der Umkehrung der Gefäßumbauprozesse beteiligt sind. Durch eine Stimulierung dieser Mechanismen, könnte diese lebensbedrohliche Erkrankung nicht nur wie bisher symptomatisch sondern endlich auch kausal und damit kurativ behandelt werden.

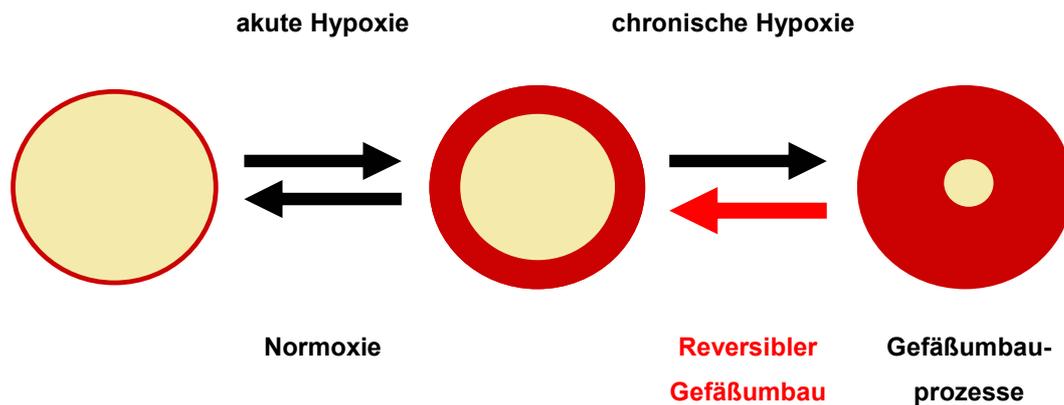


Abbildung 4: Hypoxie-induzierte Gefäßumbauprozesse sind im Tiermodell durch Reoxygenierung reversibel

In akuter Hypoxie kontrahieren pulmonale Gefäße, um einen optimalen Gasaustausch zu gewährleisten. Dieser physiologische Adaptionsmechanismus (siehe HPV, Punkt 1.1.2) ist bei Rückkehr in Normoxie spontan reversibel. Unter chronisch hypoxischen Bedingungen induziert die permanente Vasokonstriktion jedoch Gefäßumbauprozesse, die zu einer Verdickung der Gefäßwand und zu einer Obliteration des vaskulären Lumens führen. Diese Umbauprozesse sind durch anschließende normoxische Reexposition reversibel.

1.5.2 Das Modell der Monocrotalin-induzierten PH

Als weiteres Tiermodell zur experimentellen Simulation der PH steht die Monocrotalin(MCT)-induzierte PH zur Verfügung. Monocrotalin ist ein Pyrrolizidinalkaloid aus der Pflanze *Crotalaria spectabilis*, welches in der Leber zur aktiven Form, dem Monocrotalin-Pyrrol (MCT-P) umgesetzt wird⁵⁴. MCT-P löst endotheliale Verletzungen in der pulmonalen Gefäßstruktur und Umbauprozesse in präkapillären Gefäßen aus, die sich in einer progressiven PH manifestieren¹⁰⁵. Daneben löst MCT aber auch akute bis subakute Schäden an Niere, Leber und Herz aus⁵⁴. Die durch endotheliale Verletzungen erzeugten Gefäßveränderungen in der Lunge sind histologisch denen der pulmonalarteriellen PH sehr ähnlich¹⁰⁶, wodurch das MCT-Modell auch als Modell der Gruppe eins (siehe Punkt 1.2.1) herangezogen wird.

Im MCT-Modell ist jedoch zu beachten, dass die Reaktion auf MCT neben Spezies und Stamm auch vom Metabolismus des jeweiligen Organismus abhängig ist⁵⁴. So bilden Mäuse keine PH nach Monocrotalin-Injektion aus¹⁰⁷, was vermutlich auf Unterschieden im

Cytochrom P450 System zwischen Maus und Ratte beruht^{108, 109}. Zur Applikation des aktiven Metabolits MCT-P in der Maus gibt es widersprüchliche Daten in der Literatur. So berichten Raoul *et al.*¹¹⁰ 15 Tage nach der MCT-P-Injektion von erhöhten Werten im rechtsventrikulären systolischen Druck (*right ventricular systolic pressure* - RVSP), der Rechtsherzhypertrophie und der Muskularisierung intraazinärer Gefäße, während in einer anderen Studie auch bei doppelt so hoher Dosis keine Unterschiede zu Kontrolltieren gefunden werden konnten¹⁰⁷.

1.5.3 Das Modell der kombinierten Applikation von SU5416 und chronischer Hypoxie

Als ein neues, vielversprechendes Modell wird die Applikation des VEGF-Inhibitors Semaxanib (SU5416) in Kombination mit chronischer Hypoxie angesehen. Hierbei kommt es durch die Proliferation von Endothelzellen zu einer Okklusion des vaskulären Lumens¹¹¹. Dieses Modell war bisher nur in Ratten¹¹² verfügbar, konnte aber kürzlich erfolgreich auf den Modellorganismus Maus übertragen werden¹¹³.

Die PH ist eine sehr komplexe Erkrankung mit einem großen Spektrum an pathologischen Veränderungen⁹⁵. Bisher ist jedoch kein Tiermodell in der Lage, alle Merkmale dieser Erkrankung so abzubilden, wie sie in den Lungen von PH-Patienten zu finden sind⁵⁴. So finden sich z.B. in beiden klassischen Modellen keine plexiformen Läsionen⁹⁵.

Dennoch stellen Tiermodelle in der experimentellen Forschung in Verbindung mit Daten aus der Zellkultur und molekularbiologischen Methoden ein sehr wichtiges Instrument dar. Sie eröffnen die Möglichkeit, neue Erkenntnisse über den Krankheitsprozess zu erlangen, die zu Grunde liegenden Pathomechanismen zu finden, und schließlich zu neuen Therapien am Menschen zu gelangen^{49, 95}.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte in der Behandlung der PH erzielt werden konnten, stellt die PH noch immer eine unheilbare Krankheit dar⁹¹. Die traditionellen

Behandlungsstrategien sind eher symptomatisch und die Signaltransduktionswege, die der Krankheit unterliegen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Die bisherigen Untersuchungen befassen sich meist mit den pathophysiologischen Grundlagen der pulmonalen Hypertonie und versuchen diese Kaskade möglichst frühzeitig durch eine geeignete Intervention zu unterbrechen. Das Ziel einer Therapie besteht momentan darin, den Vasotonus zu reduzieren sowie den strukturellen Umbau der pulmonalen Gefäße zu verzögern. Allerdings wird die Krankheit meist erst zu einem Zeitpunkt diagnostiziert, an dem der Umbauprozess weit fortgeschritten ist. Bei dieser Arbeit steht jedoch mit der Erforschung der reversiblen Gefäßumbauprozesse ein völlig neuer Angriffspunkt im Vordergrund. Es wurde bereits in den 1970iger Jahren gezeigt, dass zumindest in Nagern der Hypoxie-induzierte Gefäßumbauprozess durch Reoxygenierung reversibel ist¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Obwohl dieser Prozess gut beschrieben und untersucht ist, sind die Faktoren die diesem Mechanismus zu Grunde liegen, bisher nicht bekannt. Daher ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, Schlüsselgene im Umkehrprozess der Hypoxie-induzierten vaskulären Umbauprozesse mittels *Microarray*-Untersuchungen zu identifizieren und zu charakterisieren. Durch diese Arbeit könnten wichtige neue Zielstrukturen in der Behandlung der PH entdeckt werden, die nicht nur den progressiven Krankheitsverlauf stoppen, sondern auch die Krankheit selbst heilen könnten. Folglich ist es wichtig, zunächst ein tieferes Verständnis über die Umkehrung der Hypoxie-induzierten Gefäßumbauprozesse zu erlangen.

Um Veränderungen in der Genexpression während dieser Prozesse zu untersuchen, werden Mäuse entweder 21 Tage chronischer Hypoxie (10 % O₂) ausgesetzt und/oder nach chronisch hypoxischer Behandlung erneut für 1, 3, 7, 14 oder 21 Tage normoxisch reexponiert. Die Veränderungen in der Genexpression werden mit Hilfe von Genchips analysiert und so identifizierte Gene genauer im Bezug auf die PH untersucht. Im Vordergrund stehen Expressionsprofile in murinem und humanem Gewebe, die Lokalisierung sowie die Entschlüsselung der zugehörigen Signaltransduktionswege. Schließlich ist die Validierung des möglichen therapeutischen Nutzens eines so gefundenen Kandidatengens unter Einbeziehung von *Knockout*-Tieren, also genetisch modifizierten Tieren, das übergeordnete Ziel dieser Arbeit.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Beckman LS 6500 Scintillation Counter	Long Island Scientific, East Setauket, NY, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Cell Disruptor B15 Sonifier	Branson Danbury, CT, USA
ChemiGenius Bio Imaging System	VWR, Bruchsal, Deutschland
Combi-Spin Zentrifuge	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
Curix 60 (Filmentwicklungsgerät)	Agfa, Morsel, Belgien
DMR Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Elektrophorese-Kammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Färbekammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
GenePix 4100A Scanner	Axon Instruments, Union City, NJ, USA
Hämatokrit 210 Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Heizblock	VWR, Bruchsal, Deutschland
Heizplatte Hi 1220	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
HERA Safe	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Hotplate/Stirrer (371)	VWR, Bruchsal, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	LO – Laboroptik GmbH, Bad Homburg, Deutschland
<i>iCycler</i> (Gradienteten PCR-Cycler)	Biorad, München, Deutschland
Kryostat (CM 1850UV)	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetischer Konzentrierer Dynal MPC	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Mikrodissektionssystem LMD 600	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mirax <i>Scanner</i>	Carl-Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Mx3000Pro (q-PCR Maschine)	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
MinUVIS-Lampe (UV-Crosslinking Gerät)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech, Steinfurt, Deutschland
OP-Besteck	Martin Medizintechnik Tuttlingen, Deutsch-

Heraeus (Ofen)	land
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Hilder & Kretschmer, Gießen, Deutschland
Schüttelgerät Eb Swip KL-2	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Semi-Dry-Kammer	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland
Spannungsgerät für Elektrophorese EPS 600	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Szinti-Reader	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf, Deutschland
TPersonal Thermocycler (PCR-Cycler)	Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland
Tischzentrifuge Mikro 200R	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vakuum Gewebeprozessor TP1050	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Vergrößerungslupe MS5	Leica, Bensheim, Deutschland
VERSA _{max} <i>lunable microplate reader</i>	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland
Vortexer MS1 Minishaker	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	IKA GmbH, Staufen, Deutschland (EMSA und Western Blotting Equipment)
Zellinkubator HERAcell 150	Biorad, München, Deutschland
Zentrifuge Rotanta 460R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.2 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien

0,9 % NaCl-Lösung	B. Braun, Melsungen, Deutschland
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
4x NuPage LDS-Ladepuffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ABgene® PCR-Platten	Thermo Scientific, Hamburg, Deutschland
Acetanhydrid	Merck, Darmstadt, Deutschland
AG 501-X8(D) Resin	Biorad, München, Deutschland
Aceton	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Agarose Type VII (niedrig schmelzend)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
AGFA Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsel, Belgien
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München, Deutschland

Amersham ECL Plus Western Blotting Detektions System	GE Healthcare, München, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Promega, Mannheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Beatmungsgas (50 % O ₂ , 50 % N ₂)	Air Liquid, Siegen, Deutschland
<i>Blocking</i> Reagenz	Roche, Basel, Schweiz
Bluecaps	Braun Melsungen, Deutschland
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
BSA-Lösung	Biorad, München, Deutschland
<i>Chemiluminescent Nucleic Acid Detection</i> <i>Module</i>	Thermo Scientific, Hamburg, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Collagenase Type IV	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Complete™ Protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Deckglas	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Destilliertes Wasser (dH ₂ O, DNase-/ RNase-frei)	Gibco™ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dextransulfat	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisenkügelchen (Eisen-II, III-Oxid, 98 % Fe ₃ O ₄)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eosin	Anatomical Pathology, Pittsburgh, PA, USA
Ethanol 70 %, 96 % und 100 %	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken, Deutsch- land
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethiconfaden	Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ficoll	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Filterpapier	Biorad, München, Deutschland
Formamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Hefe tRNA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Hämalaun	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Heparin Liquemin N 25000 [®]	Roche, Basel, Schweiz
Isopropylalkohol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanülen (BD Microlance [™] 3)	Becton Dickinson Heidelberg, Deutschland
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml Ketamin [®]	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Membran-Slides	Microdissect, Herborn, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methylgrün	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Microarray Objektträger <i>Mouse whole Genome 4x44K</i>	Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Promega, Mannheim, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Nylon-Membran, Amersham Hybond [™] -N ⁺	GE Healthcare, München, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck Emmendingen, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe, Deutschland
Pertex	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutsch- land
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Ambion, Darmstadt, Deutschland
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Polyvinylpyrrolidon	Merck, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Protein A-Sepharose™ CL-4B Kügelchen	GE Healthcare, München, Deutschland
PVDF-Membran	Pall Corporation, Dreieich, Deutschland
RNaseZap®	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Rompun® 2 %	Pharmacia, Erlangen, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Salmonsperm</i> DNA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SYBR® Safe	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Rotiszint® eco plus	Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tergitol® (NP-40)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
[³ H]Thymidin	Amersham, München, Deutschland
TissueTek®	Sakura Finetek, Staufen, Deutschland
Triethanolamin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tri-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS Base	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton-X	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trypsin	Zymed Laboratories Inc., Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Vials</i> (Szintillations-Spektroskopie)	Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Zellkultur

8-Well Chamber Slides	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland

Fluoreszenz Vectashield Eindeckmedium <i>including</i> DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Medium 199 (M199)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Opti-MEM Medium	Gibco BRL, Deutschland
PBS	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
<i>Pulmonary arterial smooth muscle cells</i>	Lonza, Köln, Deutschland
Serologische Pipetten 5, 10, 25, 50 ml	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
siRNA	BioSpring, Frankfurt, Deutschland
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
<i>X-tremeGENE</i>	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.4 Liganden und Inhibitoren

EGF, human	PAN Biotech, Aidenach, Deutschland
EGF, Maus	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
PDGF-BB, human	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
TGF-β1, human	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
U0126 (Erk Inhibitor)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
U73122 (PLC-Inhibitor)	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Enzyme und Größenstandards

Precision plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad, München, Deutschland
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Long PCR Enzyme Mix	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

2.1.6 Kits und Assays

96 [®] AQueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay Kit (MTS Assay)	Promega, Mannheim, Deutschland
AP-fast red Kit	Zytochem, Berlin, Deutschland
CaspACE Assay System	Promega, Mannheim, Deutschland
Chromatin Immunopräzipitation Kit	Millipore, Schwalbach, Deutschland
DAB Peroxidase <i>Substrate</i> Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
DIG RNA Labeling Mix	Roche, Basel, Schweiz
DC Protein Assay Kit	Biorad, München, Deutschland
<i>Dual-color</i> QuickAmp Kit	Agilent, Palo Alto, CA, USA
ImmPRESS <i>Anti-Rabbit</i> Ig Polymer Detektions-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
iScript cDNA Synthese Kit	Biorad, München, Deutschland
iTaq Sybr Green Supermix plus ROX	Biorad, München, Deutschland
<i>LightShift Chemiluminescent</i> EMSA Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>Mouse-on-mouse</i> HRP-Polymer Kit	Zytomed Systems
NE-PER [®] <i>Nuclear and Cytoplasmic Extraction</i> Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
QIAquick [®] PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PeqGOLD Taq-DNA Polymerase	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Pikrinsäure (wässrig, gesättigt)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Ribonuklease Triphosphat Set	Roche, Basel, Schweiz
RNeasy [®] Micro Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
T3 / T7 RNA Polymerase (5000 U)	Agilent, Palo Alto, CA, USA
VECTOR VIP Peroxidase <i>Substrate</i> Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
WT-Ovation [™] Pico RNA Amplifikations-System	Nugene, Bemmelen, Niederlande

2.1.7 Verwendete Antikörper

2.1.7.1 Primärantikörper

α -DIG-POD FAB Fragmente (11207733910)	Roche, Basel, Schweiz
α -glattes Muskelaktin (A2547)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
β -Aktin (A228)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Egr1 (4153S)	Cell Signaling, Boston, MA, USA
Erk1/2 (9102S)	Cell Signaling, Boston, USA
FITC-markiertes glattes Muskelaktin (F3777)	Sigma-Aldrich, Deutschland
IgG (PP64)	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Myosin (ab27718)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
PCNA (sc-7907)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
phospho-Erk1/2 Thr 202/Tyr 204 (9101S)	Cell Signaling, Boston, USA
phospho-PLC- γ 1 Y783 (2821L)	Cell Signaling, Boston, MA, USA
PLC- γ 1 (2822)	Cell Signaling, Boston, MA, USA
Von-Willebrand-Faktor (A0082)	Dako, Hamburg, Deutschland

2.1.7.2 Sekundärantikörper

Meerrettich-Peroxidase gekoppelt Anti-Kaninchen (W401)	Promega, Mannheim, Deutschland
Anti-Maus (W402)	
Alexa Fluor® 555 Tyramid (T-30954)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.8 Computerprogramme

<i>GraphPad Prism Version 5.01</i>	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
<i>GenePix Pro 5.0</i>	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

<i>Gene-Tools Software</i>	Syngene, Cambridge, Großbritannien
<i>Limma package</i>	Bioconductor (http://www.bioconductor.org/)
<i>Mirax Viewer Software</i>	Carl-Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Q-Win	Leica, Wetzlar, Deutschland
<i>R Software</i>	Bioconductor (http://www.bioconductor.org/)

2.1.9 Tiere

C57Bl/6J	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
AMD-1 ^{+/+} / AMD-1 ^{+/-}	Prof. Kazuei Igarashi (Chiba <i>University</i> , Chiba, Japan)
ODC-1 ^{+/+} / ODC-1 ^{+/-}	Prof. Kazuei Igarashi (Chiba <i>University</i> , Chiba, Japan)
Egr1 ^{+/+} / Egr1 ^{-/-}	Prof. Dr. Patrick Charnay (Paris Cedex, Frankreich)

2.1.10 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Substanz	Menge
RIPA-Puffer	PBS	99 ml
	NP-40, 1 %	1 ml
	Natrium-deoxycholat	0,5 g
	SDS, 10 %	0,1 ml
Laufpuffer, 10-fach (Western Blot)	Tris	30,28 g
	Glycin	144 g
	SDS	10 g
	dH ₂ O	1000 ml
Transfer-Puffer (Western Blot)	Tris	11,6 g
	Glycin	5,8 g
	SDS (20 %)	3,7 ml
	Methanol	400 ml
	dH ₂ O	1596,3 ml
TBS-Puffer, 10-fach, pH 7,5 (Western Blot)	Tris	24,23 g
	NaCl	87,66 g
	dH ₂ O	1000 ml
TBST-Puffer (Western Blot)	TBS-Puffer, 1-fach	999 ml
	Tween-20	1 ml
<i>Blocking</i> -Puffer (Western Blot)	Magermilchpulver	6 g
	Waschpuffer, einfach	100 ml
	dH ₂ O	90 ml
SSC-Puffer, 20-fach, pH 7,0 (ISH)	NaCl	175,32 g
	Tri-Natriumcitrat • 2 H ₂ O	88,23 g

	DEPC-dH ₂ O	500 ml
4 % Paraformaldehyd-Lösung (ISH)	NaH ₂ PO ₄	1,38 g
	Na ₂ HPO ₄	5,67 g
	Paraformaldehyd	20,0 g
	DEPC-dH ₂ O	500 ml
Prä-Hybridisierungspuffer, 2-fach (ISH)	DEPC-dH ₂ O	5,88 ml
	5M NaCl	2,4 ml
	1M Tris (pH 7,5)	200 µl
	50X Denhardts Reagenz	400 µl
	250 mM EDTA	80 µl
	10mg/ml <i>Salmon Sperm</i> DNA	1 ml
	50mg/ml Hefe tRNA	40 µl
Hybridisierungspuffer, 2-fach (ISH)	DEPC-dH ₂ O	6,68 ml
	5M NaCl	2,4 ml
	1M Tris (pH 7,5)	200 µl
	50X Denhardts Reagenz	400 µl
	250 mM EDTA	80 µl
	10mg/ml <i>Salmon Sperm</i> DNA	200 µl
	50mg/ml Hefe tRNA	40 µl
	Dextransulfat	2,0 g
Deionisiertes Formamid (ISH)	Formamid	150 ml
	<i>Mixed bed ion-exchange resin</i> (Duolite)	15 g
DEPC-dH ₂ O (ISH)	Diethylpyrocarbonat	5 Tropfen
	dH ₂ O	500 ml
Tris-Lösung, 1M, pH 7,5 (ISH)	Tris	12,11 g
	DEPC-dH ₂ O	100 ml
5M NaCl (ISH)	NaCl	29,22 g
	DEPC-dH ₂ O	100 ml
250mM EDTA Lösung (ISH)	EDTA	9,3 g
	DEPC-dH ₂ O	100 ml
<i>Blocking</i> Puffer (ISH)	<i>Blocking</i> Medium	2 g
	BSA	1 g
	1M Tris-Lösung pH 7,5	20 ml
	5M NaCl-Lösung	6 ml
	DEPC-dH ₂ O	174 ml
TBT-Puffer (ISH)	1M Tris HCl pH 7,5	50 ml
	5M NaCl	30 ml
	Triton-X	1 ml
	DEPC-dH ₂ O	919 ml
Kammer-Befeuchtungslösung (ISH)	SSC-Lösung, 20fach	10 ml
	Deionisiertes Formamid	50 ml
	DEPC-dH ₂ O	40 ml
Denhardts Reagenz, 50-fach (ISH)	Ficoll [®]	5 g
	Polyvinylpyrrolidon	5 g
	BSA	5 g
	DEPC-dH ₂ O	500 ml
PBS, 10-fach, pH 7,4 (Immunhistochemie, ISH)	NaCl	80 g
	KCl	2 g
	Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O	11,5 g
	KH ₂ PO ₄	2 g
	DEPC-dH ₂ O	1 L
BSA, 1 % (Immunhistochemie)	BSA	0,5 g
	NaN ₃	0,0065 g
	PBS, einfach	50 ml
BSA, 10 % (Immunhistochemie)	BSA	20 g
	NaN ₃	0,026 g
	PBS, einfach	200 ml
Zamboni's Fixativ, pH 7,3	Formaldehyd-Lösung, 16 %	125 ml

(Immunhistochemie)	0,1M Phosphatpuffer	725 ml
	Prikrinsäure; pH 7,3	150 ml
TBE-Puffer, 5-fach. pH 8,3 (EMSA)	Tris	54,0 g
	Borsäure	27,5
	EDTA-Lösung, 250mM	40 ml
	dH ₂ O	960 ml
TAE-Puffer, 50-fach (Agarosegele)	Tris Base	121 g
	Essigsäure	28,6 ml
	0,5 M EDTA-Lösung pH 8,0	50 ml
	dH ₂ O	500 ml
Agarose-Lösung (Zellkultur)	Agarose (Typ VII, niedrig schmelzend)	30 mg
	Medium-199	3 ml
Eisenoxid-Lösung (Zellkultur)	Eisen(III)oxid	15 mg
	Agarose (Typ VII, niedrig schmelzend)	15 mg
	Medium-199	3 ml

ISH = *in situ* Hybridisierung

2.1.11 Primer- und siRNA-Sequenzen

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primer

Gen	Accession number	Vorwärts-Primer (5'→3')	Rückwärts-Primer (5'→3')
q-PCR Maus			
AMD-1	NM_009665	TTTCCCAAATGGAGCAGCA	GCTGGGTCAAGCTCACTCATC
ODC-1	NM_013614	GTTTCCAGAGGCCAAACATCT	TCCTGGGCACAAGACATGG
Ki67	NM_001081 117	GTCGCTTTGGACAGTGAACCT	TTCTTGTTCTTAATTCTTGGTGCAT
B2M	NM_009735	AGCCCAAGACCGTCTACTGG	TTCTTTCTGCGTGCATAAATTG
q-PCR Human			
AMD-1	NM_001634	ACCACCCTCTTGCTGAAAGC	GCTCCATTTGGGAAAATTGC
Egr1	NM_001964	GTTTGCCAGGAGCGATGAAC	CCGAAGAGGCCACAACACTT
B2M	NM_004048	GCCGTGTGAACCATGTGACT	GCAAGCAAGCAGAATTGGGA
Ki67	NM_002417	GCAAGCACTTTGGAGAGC	TCTTGACACACACATTGT
ODC-1	NM_002539	GGTGGCTTTCCTGGATCTGA	TATCTGCCGGGCTCAGCTAT
NISH Maus			
AMD-1 T3/T7	NM_009665	AATTAACCCTCACTAAAGGGCC CAAGATCTGAATGGGATG	TAATACGACTCACTATAGGGAGACC AGTGTTTGATCTGGCTGA
NISH Human			
AMD-1 T3/T7	NM_001634	AATTAACCCTCACTAAAGGGAA GCACTGGTTCCCCTGTTG	TAATACGACTCACTATAGGGAGATG GCATCAATGACAGAACCTG
EMSA			

AMD-1	NM_001634	CTGGCCACCGTCCCCGCTGAAC CCC-biotin	GGGGTTGAGGGGGGAGGGTGGGGA G
ChIP			
AMD-1_Egr1	NM_001634	CTAATTCGACCCCTGGCAAC	GGTGGGTCCTTAGGGGTGTT

Tabelle 5: Verwendete siRNA

siRNA	Sequenz (5'→3')
siAMD-1	gaa uuu cau gaa gcc uuc u
siHif-1 α	ugu gag uuc gca ucu uga u

2.1.12 Verwendete Gele

2.1.12.1 Polyacrylamidgele

Tabelle 6: Herstellung von Polyacrylamid-Trenngelen

Konzentration	dH ₂ O	30 % Acrylamid	Tris-Puffer, 1,5 M, pH 8,8	SDS	APS (10 %)	TEMED
5 %	5,7 ml	1,7 ml	2,5 ml	0,10 ml	50 μ l	5 μ l
8 %	4,7 ml	2,7 ml	2,5 ml	0,10 ml	50 μ l	5 μ l
10 %	4,1 ml	3,3 ml	2,5 ml	0,10 ml	50 μ l	5 μ l
12 %	3,4 ml	4,0 ml	2,5 ml	0,10 ml	50 μ l	5 μ l

Tabelle 7: Herstellung eines Polyacrylamid-Sammelgels

Konzentration	dH ₂ O	30% Acrylamid	Tris-Puffer, 0,5 M, pH 6,8	SDS	APS (10 %)	TEMED
5 %	5,7 ml	1,7 ml	2,5 ml	0,10 ml	50 μ l	10 μ l

2.1.12.2 weitere Gele

Tabelle 8: Herstellung von Agarose- und TBE-Gelen

Gel	Substanz	Menge
Agarose-Gel, 1,5 %	Agarose	1,5 g
	TAE Puffer	100 ml
	sybr safe DNA gel stain 10.000x	10 µl
TBE-Gel, 5 % (EMSA)	Acrylamid (30 %)	4,15 ml
	TBE-Puffer, 5-fach	2,5 ml
	dH ₂ O	18,35 ml
	TEMED	10 µl
	APS (10 %)	100 µl

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Adulte Wildtyp C57Bl/6J Mäuse, 20-22 g, wurden von *Charles River Laboratories* erworben. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen mit gleichen Zyklen von 12 Stunden Tageslicht sowie Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Die Tiere wurden randomisiert in Gruppen eingeteilt, die entweder normoxisch oder chronisch hypoxisch (10 % O₂, normobar, 21 Tage) exponiert wurden. Gruppen der chronisch hypoxischen Tiere wurden nach der chronisch hypoxischen Exposition für 1, 3, 7, 14 oder 21 Tage wieder unter normoxischen Bedingungen gehalten. Von diesen Tieren wurden (i) vaskuläre Morphometrie inklusive rechtsventrikulärer und systemischer Blutdruck, (ii) Protein- und mRNA-Analysen durchgeführt.

Die ODC-1^{+/-}- und AMD-1^{+/-}-*Knockout*-Tiere wurden großzügiger Weise von Prof. Kazuei Igarashi (*Chiba University*, Chiba, Japan) zur Verfügung gestellt.

Die Egr1^{-/-}-*Knockout*-Mäuse wurden dankenswerter Weise von Prof. Dr. Patrick Charnay (*Paris Cedex*, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Tierversuchsgenehmigung

Die nötigen Versuche für die vorliegende Arbeit wurden vom Regierungspräsidium Gießen mit den Aktenzeichen Gi 20/11 Nr. 34/2006 und Gi20/10 Nr. 97/2010 genehmigt. Darüber

hinaus wurde Gewebe aus dem Aktenzeichen Gi20/11 Nr. 49/2003 in die Untersuchungen miteinbezogen. Die Isolation von murinen glatten Muskelzellen erfolgte unter der Tierversuchsanzeige Gi20/10 Nr. A28/2009.

2.2.3 Patientencharakteristika

Humanes Lungengewebe wurde von 6 Donoren (3 weiblichen, 3 männlichen, durchschnittliches Alter 54 Jahre \pm 7) sowie 6 IPAH-Patienten (4 weiblichen, 2 männlichen, durchschnittliches Alter 32 Jahre \pm 6) gewonnen, die eine Lungentransplantation erhielten. Das Lungengewebe wurde sofort nach der Explantation der Lunge für weitere Untersuchungen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Protokoll zur Gewebespende wurde durch die Ethikkommission am Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen des Universitätsklinikums Gießen in Einklang mit nationalem Recht und den Richtlinien zur Guten Klinischen Praxis/der Internationalen Konferenz zur Harmonisierung unter den Aktenzeichen 31/93 und 10/06 genehmigt.

2.2.4 Physiologische Untersuchungen

2.2.4.1 Hämodynamische Messungen an der Maus

Die Messungen des rechtsventrikulären systemischen Drucks (RVSP) wurden wie zuvor beschrieben⁸³ von der Tierärztin Dr. Christina Klöpping und der Diplom-B. Alexandra Pichl ausgeführt. Die hämodynamischen Daten und die Daten zur Rechtsherzhypertrophie der Tiere in den Versuchen zum reversiblen Gefäßumbau sind Gegenstand der Doktorarbeit von Christina Klöpping. Hierbei wurden die Tiere intraperitoneal mit Ketamin (50 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) und Rompun 2 % (0,6 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht) anästhesiert. Die linke Halsschlagader (*Arteria carotis communis*) wurde zur Messung des systemischen Blutdrucks kanüliert und ein Rechtsherzkatheter wurde durch die rechte Jugularvene (*Vena jugularis*) eingeführt, um den RVSP mit einem flüssigkeitsgefüllten Drucknehmer aufzuzeichnen. Auf Grund technischer Schwierigkeiten konnte nicht von jedem Versuchstier der Druck bestimmt werden, wodurch die Anzahl der Tiere pro Gruppe variiert.

2.2.4.2 Entnahme der Mauslunge

Zur Organentnahme wurde nach Tiertötung die Luftröhre (*Trachea*) vom umliegenden Gewebe freipräpariert und eröffnet. Eine weitere Öffnung wurde in den linken Ventrikel als Blutabfluss gesetzt und durch eine kleinere im rechten Ventrikel wurde ein Schlauch bis in die Pulmonalarterie (*Arteria pulmonalis*) vorgeschoben. Durch diesen wurde die Lunge mit isotonischer Kochsalzlösung unter einem Druck von 22 cm Wassersäule blutfrei gespült. Anschließend wurde die rechte Lunge abgebunden und für molekularbiologische Untersuchungen in flüssigen Stickstoff überführt. Für histologische Untersuchungen wurden die linke Lunge für 10 Minuten bei einem Druck von 22 cm Wassersäule mit mindestens 10 ml Zamboni's Fixativ perfundiert. Anschließend wurde eine Ligatur um *Arteria pulmonalis* und *Trachea* gelegt und die Lunge abgebunden. Daraufhin folgte die Entnahme der Lunge sowie Inkubation in Zamboni's Fixativ über Nacht bei 4 °C. In einem automatischen Vakuum-Gewebeprozessor wurden die Lungen mit 0,1 M PBS gewaschen. Nach Dehydrierung durch eine ansteigende Alkoholreihe wurden die Lungen schließlich in Paraffin eingebettet. Für vaskulär-morphometrische Bestimmungen wurden 3 µm dicke Schnitte hergestellt.

Für die *in situ* Hybridisierung und die Mikrodissektion wurden die Lungen über die Trachea mit TissueTek[®] fixiert. Pro Lunge wurden etwa 800 µl der auf 68 °C vorgewärmten Flüssigkeit eingebracht. Anschließend wurden die Lungen sofort in flüssigen Stickstoff bis zur weiteren Verwendung überführt.

2.2.4.3 Entnahme von *Arteria carotis* und Aorta der Maus

Die Entnahme von *Arteria Carotis* und Aorta erfolgte aus adulten, männlichen C57BL/6J Wildtyp-Mäusen (20 – 22 g), die zuvor normoxisch oder für 1, 7 oder 21 Tage chronisch hypoxisch exponiert wurden. Nach Tiertötung durch eine Überdosis Ketamin (50 µg/g Körpergewicht) und Rompun 2 % (0,6 µg/g Körpergewicht) durch eine Veterinärmedizinerin, wurden die *Arteriae carotides* inklusive der Bifurkation von *Arteria carotis interna* und *externa* freigelegt, freipräpariert und entnommen. Nach Waschen in sterilem, eiskaltem PBS wurden sie sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

Zur Isolierung der Aorta wurde diese auf der Höhe des Aortenbogens vom Herz getrennt und von der anhaftenden Adventitia befreit. Anschließend wurden der Aortenbogen sowie

ein Teil der *Aorta descendens* entnommen. Nach Waschen in sterilem, eiskaltem PBS, erfolgte die sofortige Überführung in flüssigen Stickstoff.

2.2.4.4 Präparation des Herzens

Zur Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie wurde der rechte Ventrikel (RV) von dem linken Ventrikel plus Septum (LV+S) unter einer Vergrößerungslupe getrennt. Anschließend wurden die beiden Hälften 3 Wochen lang bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend gewogen. Aus den Werten der Trockenmassen wurde schließlich die Ratio $RV/(LV+S)$ berechnet.

2.2.5 Zellkultur

2.2.5.1 Isolation von glatten Gefäßmuskelzellen

Humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen wurden von Lonza (Basel, Schweiz) erworben. Murine pulmonalarterielle glatte Muskelzellen wurden aus präkapillären Gefäßen nach einem zuvor beschriebenen und leicht modifizierten Protokoll^{114, 115} isoliert: Zur Gewinnung der murinen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen wurden die Tiere intraperitoneal mit Ketamin (50 µg/g Körpergewicht) und Rompun 2 % (0,6 µg/g Körpergewicht) anästhesiert. Das Fell wurde von der Bauchmitte bis zum Hals entfernt. Speicheldrüse und Muskulatur wurde um die *Trachea* stumpf entfernt, eine Ligatur und ein Trachealtubus gelegt. Dabei wurde die *Trachea* nur angeschnitten und nicht vollständig durchtrennt. Nach Eröffnung des Bauchhöhle (*Cavitas abdominalis*) und des Bauchfells (*Peritoneum*), wurde der Herzbeutel vorsichtig gelöst und der Thymus entfernt. Mit einem Ethiconfaden wurde eine Ligatur um Aorta und Pulmonalarterie gelegt. Ein Katheter wurde mit gefüllter PBS-Spritze entlüftet und in einen magnetischen Konzentrador eingespannt sowie grob positioniert. Durch eine kleine Öffnung im rechten Ventrikel wurde der Katheter zur Pulmonalarterie vorgelegt. Eine zweite Öffnung wurde in den linken Ventrikel als Abflussmöglichkeit gesetzt. Nach Einbindung des Katheters wurde die Lunge mittels der aufgesteckten PBS-Spritze blutfrei gespült. Der Schlauch am Katheter wurde abgeklemmt und die Spritze luftblasenfrei durch eine weitere ersetzt, die ein Eisengemisch enthielt. Das Gemisch wurde zuvor aufgeschüttelt um eine gleichmäßige Verteilung der

schnell sedimentierenden Eisenpartikel zu gewährleisten. Die Eisenmischung wurde vorsichtig instilliert, der Katheter wurde anschließend entfernt und der Faden zugezogen. Nachfolgend wurde eine Agaroselösung vorsichtig in die Trachea bis zur vollständigen Aufblähung der Lunge instilliert. Die Lunge wurde explantiert und für 10 bis 15 Minuten in einem Gefäß mit eiskaltem PBS gelagert. Anschließend wurde die Lunge von Herz, Aorta und *Oesophagus* getrennt und in ein 50ml-*Bluecap* überführt. Nach Zugabe von PBS wurde die Lunge nach der 3-Scherenmethode zerkleinert. Das Homogenat wurde mit PBS aufgefüllt und im magnetischen Konzentratoren gewaschen. Ungebundenes Gewebe und restliches PBS wurde abgesaugt. Danach wurde ein Kollagenaseverdau für 1 Stunde im Inkubator durchgeführt. Anschließend wurde das angebaute Gewebe durch mechanische Scherung mittels einer Spritze und 18G-Kanüle entfernt. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt und nachfolgend mit einer 20G-Kanüle wiederholt. Anschließend wurde zur Beendigung des Kollagenaseverdaus dreimal gewaschen (M199, 1 % P/S und 10 % FCS). Primäre Zellen wurden für 3 bis 5 Tage ohne Passagieren kultiviert. Für Hypoxie-Versuche wurden die Zellen über den angegebenen Zeitraum in einem Brutschrank normobarisch bei einer Sauerstoffkonzentration von 1 % O₂ inkubiert. Glatte Muskelzellen wurden durch immunhistochemische Färbungen mit glattem muskelzellspezifischen α -Aktin (SMA) und Myosin-Antikörpern sowie an Hand ihrer Morphologie identifiziert. Die Anwesenheit endothelialer Zellen wurde durch Färbung mit einem Antikörper gegen von-Willebrand-Faktor (vWF) ausgeschlossen.

2.2.5.2 Transfektion primärer Zellen

Für RNA-Interferenz-Experimente wurden humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen mit einer AMD-1-siRNA (5'-gaa uuu cau gaa gcc uuc u-3') unter Verwendung von *XtremeGENE* siRNA Transfektionsreagenz transfiziert. Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und für 30 Minuten mit 900 μ l Basalmedium beschichtet. 100 μ l Opti-MEM-Medium wurden mit 7,5 μ l *XtremeGene* fünf Minuten prä-inkubiert. Danach folgte die Zugabe der siRNA (100 nM). Nach 20 minütiger Inkubation wurde die Transfektionslösung auf die Platten gegeben. Nach sechs Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch Vollmedium (5 % FCS) ersetzt. Als Negativkontrolle wurde eine willkürliche, nicht zielgerichtete siRNA benutzt.

2.2.5.3 Bestimmung der Zellzahl

Humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen wurden auf 6-Well-Kulturschalen ausgesät und kurz vor der Konfluenz mit siRNA gegen AMD-1 oder einer nicht zielgerichteten Kontroll-siRNA transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung von der Schale gelöst und mit 900 µl Vollmedium abgestoppt. Die Zellzahl wurde anschließend in einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

2.2.5.4 Stimulation primärer Zellen

Für Inhibitor-Experimente wurden die Zellen über Nacht in Basismedium (ohne Zusatzstoffe) kultiviert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen entweder mit dem Erk1/2-Inhibitor U0126 (10 µM) oder dem PLC-Inhibitor U73122 (3 µM) für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch Basismedium ersetzt.

Für Stimulationsversuche wurden die Zellen anschließend mit murinem EGF (50 ng/ml), humanem EGF (50 ng/ml), humanem TGF-β1 (2 ng/ml) oder humanem PDGF-BB (5 ng/ml) für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und RNA oder Proteine wurden gewonnen.

2.2.6 Molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 Lasermikrodissektion

Um die Genexpression spezifisch in intrapulmonalen Gefäßen zu untersuchen, wurden diese mittels Laser-Mikrodissektion isoliert. Zunächst wurden am Kryostat 10 µm dicke Schnitte aus in TissueTek[®] eingebetteten Lungen hergestellt. Diese wurden auf Membran-Slides übertragen und gefärbt. Mausschnitte wurden nach Inkubation in Hämalaun für 45 Sekunden je zweimal in destilliertem Wasser sowie in 70, 90 und 99,6 %igem Ethanol eingetaucht. Schnitte aus humanem Material wurden 10 Sekunden mit Hämalaun gefärbt und anschließend in destilliertes Wasser sowie 20 Sekunden in Eosin überführt. Nach aufsteigender Alkoholreihe wurden pulmonalarterielle Gefäße isoliert. Das Material wurde im Gerät in 300 µl RNA-Lyse-Puffer gesammelt und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff überführt.

2.2.6.2 RNA Isolation

Totale mRNA wurde von gefrorenem Maus- oder Humanlungengewebe sowie laser-mikrodissektierten Gefäßen mit Hilfe des *RNeasy Mini-* oder *Mikro-Kits* nach Herstellerangaben extrahiert. Die isolierte RNA aus mikrodissektierten Gefäße wurde anschließend mit dem *WT-Ovation Pico RNA Amplification System* nach Herstellerangaben vervielfältigt und in cDNA umgeschrieben. Die Aufreinigung erfolgte unter Verwendung des *Qiaquick PCR Purification Kits*.

2.2.6.3 cDNA-Microarrays

RNA von 80 Tieren (20 Kontrollen und 12 Tieren pro Zeitpunkt) wurden in insgesamt 40 Dual-Farb-Hybridisierungen analysiert, bei denen jeder Zeitpunkt direkt mit der Kontrollgruppe und den benachbarten Gruppen verglichen wurde. Tabelle 9 zeigt die Kombinationen der Hybridisierungen im Detail.

Tabelle 9: Hybridisierungen im cDNA-Microarray-Experiment

Cy3	0	1	0	3	0	7	0	14	0	21	1	3	3	7	7	14	14	21	1	21
Cy5	1	0	3	0	7	0	14	0	21	0	3	1	7	3	14	7	21	14	21	1

Die Zahlen bezeichnen die Zeitpunkte (in Tagen). Null indiziert die Kontrollen. Jede Kombination wurde zweimal hybridisiert.

Die RNA wurde unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt. Die RNA-Qualität wurde mit der Kapillarelektrophorese durch einen Bioanalyzer 2100 überprüft.

Aufgereinigte totale RNA wurde amplifiziert und mit dem *dual-color QuickAmp Kit* nach Herstellerprotokoll markiert. Pro Reaktion wurde 1 µg der totalen RNA verwendet. Cy3- und Cy5-markierte Antisense-RNA wurde über Nacht auf 4x44K 60mer Oligonukleotid gespottete cDNA-Microarray-Objektträger hybridisiert. Die Hybridisierung sowie das anschließende Waschen und Trocknen der Objektträger wurde nach Angaben des *Agilent* Hybridisierungsprotokolls ausgeführt. Die getrockneten cDNA-Microarrays wurden mit dem *GenePix 4100A Scanner* mit einer Auflösung von 5 µm gelesen. Die *Gain* Einstellungen des *Photomultipliers* wurden so angepasst, dass die gesamte dynamische Breite des Instrumentes genutzt werden konnte und vergleichbare Fluoreszenzwerte für

beide Kanäle erreicht wurden. Bilder der Cy3- und Cy5-Signale wurden als TIFF-Dateien gespeichert und mit Hilfe des *GenePix Pro 5.0* Programms ausgewertet.

2.2.6.4 cDNA Synthese

Reverse Transkription wurde von gleichen Mengen an RNA gemäß des *iScript cDNA Synthesis Kits* durchgeführt. Pro Reaktion wurde folgender Mix verwendet:

4 µl	5x cDNA Synthese Kit Puffer
1 µl	iScript Enzym Mixtur
x ng	cDNA
add 20 µl	Nuklease-freies Wasser

Die cDNA-Synthese wurde im *Thermalcycler* unter Verwendung des folgenden Thermalprofils durchgeführt:

25 °C	5 Min
42 °C	30 Min
85 °C	5 Min
4 °C	∞

2.2.6.5 quantitative Polymerasekettenreaktion (q-PCR)

Zur Ermittlung der Genexpression unter verschiedenen Versuchsbedingungen wurden quantitative Polymerasekettenreaktionen (q-PCRs) durchgeführt. Die Analyse erfolgte in 96-*Well*-Reaktionsgefäßen und pro *Well* wurde folgende Ansätze pipettiert:

12,5 µl	<i>iTaq Sybr Green Supermix plus ROX</i>
9,5 µl	dH ₂ O
0,5 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
0,5 µl	Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)
2,0 µl	cDNA

Die Intron-überspannenden Primer wurden mit Hilfe der Sequenzinformationen der NCBI Datenbank konstruiert.

Die q-PCR erfolgte in einer Mx3000P unter folgenden Bedingungen:

95 °C	10 Min		Denaturierung
95 °C	10 s	← 40 x	Denaturierung
59 °C	10 s		<i>Annealing</i> der Primer
72 °C	10 s		Elongation
95 °C	1 Min		Denaturierung
55-95 °C	3 Min		Dissoziationskurve

Die Ct-Werte wurden auf die endogene Kontrolle B2M normalisiert und die Ergebnisse mittels nachfolgender Gleichung analysiert:

$$\Delta Ct = Ct_{(B2M)} - Ct_{(Zielgen)}$$

2.2.6.6 Proteinisolierung

Zellen wurden durch Zusammenkratzen in 150 µl RIPA-Puffer gewonnen. Lungenhomogenat wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend in 150 µl RIPA-Puffer aufgenommen. Pro Milliliter RIPA-Puffer wurden 40 µl *Complete*, 5 µl Vanadat (200 mM) und 1 µl PMSF (100 mM) frisch hinzugefügt. Nachdem die Proben für 10 Minuten auf Eis inkubiert wurden, wurden sie für 10 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Der die Proteine enthaltende Überstand wurde in ein Eppendorfgefäß überführt.

2.2.6.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des *DC Protein Assay Kits* bestimmt. Die Werte wurden jeweils aus Doppelproben errechnet. Dazu wurde aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S das Reagenz A' hergestellt. 25 µl A' wurden pro *Well* auf eine 96-*Well* Platte gegeben. 5 µl Probe wurde in das entsprechende *Well* appliziert und 200 µl Reagenz B hinzugefügt. Zur Hintergrundberechnung wurde ein Leerwert herangezogen. Hierbei

wurde RIPA-Puffer statt Probe verwendet. Zur Konzentrationsberechnung wurde eine Standard-Reihe von 0,2 mg/ml bis 1,6 mg/ml einer BSA-Lösung hergestellt. Nach kurzer Inkubation auf dem Schüttler ohne Lichtexposition wurde die Absorption bei 750 nm im *VERSAmx lunable microplate reader* ausgelesen.

2.2.6.8 Western Blot Analyse

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden Western Blots durchgeführt. Proben gleicher Konzentration wurden mit 4x *NuPage LDS*-Ladepuffer sowie 2,6 µl β-Mercaptoethanol pro 0,1 ml versetzt. Anschließend wurden die Proben in einem Heizblock für 10 Minuten auf 99 °C erhitzt und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden 5 µl des *Dual Color Standards* hinzugefügt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer Gelelektrophorese-Kammer bei 100 V, 150 mA und 150 W für 90 Minuten in Laufpuffer. Schließlich wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran mittels des *Semi-Dry-Blot*-Verfahrens (100 V, 115 mA, 150 W, 75 Minuten) übertragen. Die Membran wurde anschließend eine Stunde in *Blocking*-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Applikation der Primärantikörper erfolgte in *Blocking*-Puffer über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler. Als Primärantikörper wurden Egr1 (1:1,000), phospho-PLC-γ1 Tyr(783) (1:1,000), PLC-γ1 (1:1,000), phospho-Erk1/2 (1:1,000), Erk1/2 (1:2,000) sowie PCNA (1:1,000) aus Kaninchen verwendet. Als Ladekontrolle wurde der monoklonale β-Aktin Antikörper aus Maus benutzt (1:50,000). Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und nachfolgend für eine Stunde in Peroxidase-gekoppeltem Sekundärantikörper (1:5,000 in *Blocking*-Puffer) inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal für 10 Minuten in TBST-Puffer gewaschen. Zur Entwicklung wurde das *Peroxidase-Substrat ECL Plus Kit* nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Auflegen von Chemilumineszenz-Filmen ermittelt. Die Filme wurden in einer Entwicklungsmaschine entwickelt. Zur Quantifizierung wurde der Film mit dem *Bio-Imaging System* fotografiert und die Banden-Intensität mit der *Gene-Tools-Software* analysiert. Anschließend wurde jede Membran je zweimal für 5 Minuten in TBST-Puffer gewaschen und für eine Stunde in einer Lösung aus 90 ml dH₂O, 10 ml Glycin (1 M) und 1 ml HCl (37 %) inkubiert, um die Antikörper zu lösen. Nach zweimaligem Waschen der Membran in TBST-Puffer und 30minütigem inkubieren in *Blocking*-Puffer, konnte auf der

gleichen Membran ein neuer Primärantikörper verwendet und die Proteinexpression ermittelt werden.

2.2.6.9 Herstellung der Sonden für die *in situ* Hybridisierung

Zur Lokalisierung von Nukleinsäuren werden spezifische Sonden benötigt. Die dafür verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Sequenzinformationen der NCBI Datenbank konstruiert und von Metabion bezogen. Diese enthielten T7- bzw. T3-Promotor-Sequenzen, die zur Generierung der RNA-Sonden nötig sind. Zur Herstellung der Sonden wurden PCRs mittels der *peqGOLD Taq-DNA-Polymerase* durchgeführt. Hierzu wurde folgendes Protokoll verwendet:

5,0 µl	Puffer S
1,0 µl	dNTPs
2,0 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
2,0 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
2,0 µl	cDNA
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
37,5 µl	Nuklease-freies Wasser

Die PCR wurde in einem Thermocycler unter Verwendung des folgenden Thermalprofils durchgeführt:

95 °C	10 Min		Denaturierung
95 °C	10 s	← 34 x	Denaturierung
58 °C	20 s		<i>Annealing</i>
72 °C	1 Min		Elongation
72 °C	2 Min		Finale Elongation
4 °C	∞		

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit Hilfe des *PCR Purification Kits* aufgereinigt und die Größe des Produkts auf einem 1,5 %igem Agarosegel überprüft. Direkt vor der *in situ* Hybridisierung wurden die Sonden in RNA-Sonden umgeschrieben. Hierfür wurden

T7- bzw T3-RNA-Polymerasen unter nachfolgendem Protokoll verwendet:

4 µl	5-facher Transkriptionspuffer
1 µl	RNasin
1,5 µg	cDNA
2 µl	Nukleosid-Mix (mit oder ohne DIG-markiertem Cytosin)
2 µl	Polymerase
add 20 µl	Nuklease-freies Wasser

Die Reaktionen wurden in einem *Thermocycler* bei 37 °C für 2 Stunden durchgeführt. Die Verwendung der T7-RNA-Polymerase führte zur Bildung von Antisense, T3 zu Sense-Sonden. Anschließend wurden die Sonden mit dem *PCR Purification Kit* aufgereinigt.

2.2.6.10 Nicht-isotopische *in situ* Hybridisierung (NISH) kombiniert mit Immunfluoreszenz

Um die Lokalisierung von Nukleinsäuren nachzuweisen, wurde NISH mit gekoppelter Immunfluoreszenz angewendet. Am Kryostat wurden 10 µm dicke Schnitte aus in TissueTek® eingebetteten Maus-Lungen hergestellt und auf Objektträger übertragen. Alle Glasgeräte wurden 8 Stunden bei 90 °C behandelt. Alle Arbeitsflächen und Kontaktmaterialien wurden zuvor mit RNaseZap® gereinigt. Die Schnitte wurden für 15 Minuten bei 65 °C gelagert und anschließend 1 Minute mit DEPC-dH₂O behandelt. Nach 30minütiger Inkubation im 70 °C warmen Wasserbad und kurzem Eintauchen in DEPC-dH₂O, erfolgte ein Proteinase K Verdau (5 ng/ml) für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für 30 Sekunden mit 0,2 % Glycin in PBS behandelt. Nach Abspülen in PBS erfolgte die Fixierung der Schnitte in kaltem, 4 %igem PFA für 25 Minuten. Danach wurden die Schnitte 5 Minuten in PBS gewaschen und für 10 Minuten in 0,1 M acetyliertem Triethanolamin (0,5 ml Acetanhydrid pro 200 ml Lösung) auf einem Schüttler inkubiert. Nach dreiminütigem Waschen in PBS erfolgte die Dehydrierung in aufsteigenden Ethanolkonzentrationen (je 2 Minuten in 70, 80 und 95 %igem Ethanol). Die dreistündige Prähybridisierung erfolgte bei 55 °C in einer Kammer im Ofen, die mit Filterpapier und Befeuchtungslösung ausgekleidet war. Dazu wurden die Schnitte mit einer 1:1-(v/v)-Lösung aus Formamid und 2-facher Prähybrisierungslösung benetzt.

Anschließend wurde die Lösung durch eine 1:1-(v/v)-Mischung aus Formamid und 2-fachem Hybridisierungspuffer ersetzt. Diese Mischung enthielt 5 ng/ μ l der Sense-Probe oder 50 ng/ μ l der unmarkierten Antisense-Probe (*Cold competitor*) und wurde 10 Minuten bei 70 °C prä-inkubiert. Nach zwei Stunden wurde die markierte Antisense-Probe bzw. die Positivkontrolle nachgetragen. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in 2-facher SSC-Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur gewaschen, gefolgt von je einer Stunde in 0,1-facher SSC-Lösung bei 60 °C und einer weiteren in vorgewärmter 0,1-facher SSC-Lösung. Danach wurden die Objektträger 30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und 30 Minuten in *Blocking*-Puffer inkubiert. Anschließend wurde eine 1 %ige H₂O₂-Lösung für 5 Minuten aufgetragen, um die endogene Peroxidaseaktivität zu quenchen. Schließlich erfolgte die Applikation der α -DIG-POD-Fab Fragmente (1:40 in *Blocking*-Puffer) für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Waschen in TBT-Puffer für 15 Minuten wurden die Schnitte mit dem Fluoreszenzsubstrat *Alexa Fluor*[®] 555 *Tyramid* 2 Stunden zur Visualisierung der Sonden unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für je 20 Minuten mit PBST-Puffer wurden die Schnitte für 1 Stunde mit FITC-markiertem monoklonalen α -SMA Antikörper aus der Maus (1:300) benetzt um pulmonale Gefäße anzufärben. Anschließend wurden die Schnitte dreimal in PBST gewaschen und mit *Daco Mounting Medium* bedeckt. Schließlich wurden die Proben mit einem Deckglas versehen. Nach Trocknung im Dunklen wurden die Färbungen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

NISH auf humanem Lungengewebe wurde auf 3 μ m dünnen Paraffin-Schnitten angefertigt. Zum Entparaffinisieren wurden diese zweimal jeweils 10 Minuten in Xylol gelagert und anschließend rehydriert (je 5 Minuten in 100 % Ethanol, 80 % Ethanol, 70 % Ethanol und DEPC-dH₂O). Nach 10minütigem Verdau mit Proteinase K (7,5 μ g/ml in DEPC-PBST) und Waschen in DEPC-PBST für 5 Minuten, wurden die Schnitte mit einer Lösung aus 4 % PFA und 0,2 % Glutaraldehyd 25 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen in DEPC-PBST wurden die Schnitte auf einem Schüttler für 10 Minuten mit acetyliertem 0,1 M Triethanolamin behandelt. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend dem Protokoll der Mausschnitte. Zusätzlich wurde noch eine Poly-T-Sonde als Positivkontrolle eingesetzt.

2.2.6.11 Immunhistochemische Färbung von PCNA

Zur Lokalisation des Proliferationsmarkers PCNA (*Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*) in der Mauslunge wurden immunhistochemische Färbungen auf 3 µm dicken Paraffinschnitten ausgeführt. Hierfür wurden die Schnitte mit dem *AP-fast red Kit* gemäß der Herstellerangaben behandelt. PCNA wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Anschließend wurden die Schnitte digital mit einem *Mirax Scanner* fotografiert und mit der *Mirax Viewer Software* ausgewertet.

2.2.6.12 Immunhistochemische Doppelfärbung von SMA und vWF

Zur Bestimmung des Muskularisierungsgrades der Lungengefäße wurden immunhistochemische Doppelfärbungen für SMA (*α-smooth muscle actin* – glattmuskuläres alpha-Aktin) und vWF (von-Willebrand-Faktor) durchgeführt. SMA färbt hierbei die Muskelschicht, vWF das Endothel an. 3 µm dicke Paraffinschnitte wurden 1 Stunde bei 58 °C gelagert, bevor sie dreimal 10 Minuten in Xylol eingetaucht wurden. Anschließend wurden die Schnitte je 5 Minuten in Ethanol absteigender Konzentration (zweimal 99,6 %, 96 %, 70 %) inkubiert. Nach 15minütiger Behandlung in einer Lösung aus 3 % H₂O₂ in Methanol erfolgte je zweimaliges Waschen in dH₂O und PBS. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten mit Trypsin bei 37 °C benetzt und dreimal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Objektträger in 10 %igem BSA inkubiert sowie dreimal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Zur Färbung von SMA wurde das *Mouse-on-Mouse HRP-Polymer Kit* nach Herstellerangaben verwendet. SMA wurde in 1 %igem BSA in einer Verdünnung von 1:900 verwendet. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS für je 5 Minuten gewaschen und die Farbreaktion wurde unter Verwendung des *VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kits* nach Herstellerangaben durchgeführt. Danach wurden die Schnitte einmal in Leitungswasser sowie zweimal in PBS gewaschen. Es folgte eine 20minütige Inkubation in 10 %igem BSA und drei 5minütige Waschschrte in PBS. Zur Färbung von vWF wurde das *ImmPRESS Anti-Rabbit Ig (peroxidase) Polymer Detection Kit* nach Herstellerangaben verwendet. vWF wurde in 10 %igem BSA in einer Verdünnung von 1:1200 verwendet. Nach viermaligem Waschen in PBS für je 5 Minuten wurde die Farbreaktion mit Hilfe des *DAB Peroxidase Substrate Kits* nach Herstellerangaben ausgeführt. Schließlich erfolgte nach 5minütiger Inkubation in

Leitungswasser die Kernfärbung mit Methylgrün für 3 Minuten auf der Heizplatte. Die Schnitte wurden in H₂O gewaschen und anschließend je zweimal für 2 Minuten in 96 %igem Ethanol sowie zweimal für 5 Minuten in Isopropylalkohol inkubiert. Nach dreimaliger Behandlung in Xylol für je 5 Minuten wurden die Präparate schließlich mit Pertex eingebettet und mit einem Deckglas versehen.

2.2.6.13 Bestimmung des Muskularisierungsgrades

Um Gefäßveränderungen in muskularisierten Pulmonalarterien zu quantifizieren, wurden die Färbungen an Hand des computergestützten morphometrischen Programms *QWin* ausgewertet. Die Analyse erfolgte in verblindeter Form. Die Gefäße wurden in folgenden Größenkategorien unterschieden: kleine Gefäße hatten einen Durchmesser von 20-70 µm, mittlere von 71-150 µm und große Gefäße maßen 151-1000 µm im Durchmesser. Pro Tier wurden von je 100 Gefäßen (85 kleinen, 10 mittleren und 5 großen) der Muskularisierungsgrad bestimmt. Als Grenze für nicht-muskularisierte Gefäße galt ein Anteil von $\leq 5\%$ an glattmuskulärem alpha-Aktin positiven Bereichen in der Gefäßmedia, partial-muskularisiert wurden mit einem Bereich von >5 bis $\leq 75\%$ definiert und $> 75\%$ wurde als voll-muskularisiert angesehen. Der Muskularisierungsgrad wurde schließlich als Prozentsatz aller ausgezählten Gefäße berechnet. Auf Grund technischer Probleme, wie z.B. dem Riss der Pulmonalarterie während der Fixierung, schwankt die Zahl der ausgezählten Lungen pro Gruppe.

2.2.6.14 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Um festzustellen, ob der Transkriptionsfaktor Egr1 an den Promotor von AMD-1 bindet, wurde eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) durchgeführt. Dafür wurden humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen auf 10-cm-Kulturschalen bis fast zur Konflueszenz kultiviert und über Nacht mit Basismedium ohne Zusatzstoffe inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 50 ng/ml humanem EGF für 1,5 Stunden stimuliert. Der ChIP Assay wurde mit dem *Chromatin-Immunopräzipitations-Assay Kit* nach Herstellerangaben ausgeführt. Die DNA wurde anschließend per Phenol-Chloroform-Fällung isoliert.

Hierfür wurde ein zum Probenvolumen gleiches Volumen an Phenol-Chloroform-

Isoamylalkohol zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben für 5 Minuten bei 14.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und bei 14.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut abgenommen und mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat pH 4,8 versetzt. Nach gründlichem Mischen wurden 2 Volumen an eiskaltem, 100 %igem Ethanol zugegeben und erneut gemischt. Schließlich wurden 1,5 µl Glykogen beigefügt und die Proben bei -80 °C über Nacht gefällt. Am nächsten Tag wurden die Proben für 16 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem, 70 %igem Ethanol gewaschen und anschließend 10 Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 15 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Zur semi-quantitativen Analyse des ChIP-Assays wurde eine PCR auf den so gewonnenen Proben unter Verwendung des *Long PCR Enzyme Mix* durchgeführt. Folgendes Reaktionsgemisch wurde pro Probe pipetiert:

2,0 µl	10X <i>Long PCR</i> Puffer mit 15 mM MgCl ₂
0,4 µl	dNTPs
1,2 µl	Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)
1,2 µl	Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)
13,1 µl	Nuklease-freies Wasser
2,0 µl	DNA
0,1 µl	<i>Taq</i> DNA Polymerase

Die Reaktion erfolgte im Thermalcycler unter folgenden Reaktionsbedingungen:

95 °C	5 Min		Denaturierung
94 °C	30 s	← 34x	Denaturierung
59 °C	2 Min		<i>Annealing</i>
68 °C	3 Min		Elongation
68 °C	10 Min		Finale Elongation
4 °C	∞		

2.2.6.15 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

EMSA-Experimente wurden mit Nuklear-Extrakten ausgeführt, die mit dem *NE-PER*[®] *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit* aus humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen gewonnen wurden. Die Zellen wurden dafür auf 10-cm-Kulturschalen gezogen und mit 50 ng/ml humanem EGF für 1,5 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS mit 2 mM Na₃VO₄ (pH 10) und 20 µl *Complete* mit einem Zellschaber abgelöst.

Zur Herstellung von Oligonukleotid-Sonden, die die Egr1-Konsensus-Sequenz im humanen AMD-1-Promotor enthalten, wurden Primer konstruiert und von *Metabion International AG* bezogen. Doppelsträngige Sonden wurden durch *Annealing* der Primer für 5 Minuten bei 95 °C hergestellt. Neben der mit Biotin markierten Sonde, wurde ebenfalls eine nicht markierte Sonde hergestellt, die als Negativkontrolle diente. EMSA-Analysen wurden mit dem *LightShift*[®] *Chemiluminescent EMSA Kit* ausgeführt. Hierfür wurden 20 µg der Nuklear-Extrakte mit einem EMSA-Puffer-Mastermix (1x *Binding-Puffer*, 50 ng/µl Poly(dI-dC), 2,5 % Glycerol, 0,05 % NP-40, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten die Zugabe von 4 pmol nichtmarkierter Sonde (*Cold Competitor*) zu den Negativkontrollen und eine weitere Inkubation für 20 Minuten. Anschließend wurden 20 fmol der Biotin-markierten Sonde zu allen Proben gegeben. Nach 20 Minuten erfolgten die Zugabe des Ladepuffers und die Auftrennung der Proben in einem 5 %igem TBE-Polyacrylamidgel. Schließlich wurden die DNA/Proteinkomplexe mittels Elektrotransfer (100 V, 60 Min) auf eine Nylon-Membran übertragen. Der *Cross-Link* erfolgte durch 10minütige Exposition der Membran bei 254 nm. Die Detektion der EMSA-Experimente erfolgte durch das *LightShift*[®] *Chemiluminescent EMSA Kit* nach Herstellerangaben.

2.2.6.16 MTS Assay

Der MTS Proliferations-Assay wurde mit dem *96*[®] *Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit* ausgeführt. Hierfür wurden humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen auf 6-Well-Platten mit einer unspezifischen, nicht zielgerichteten Kontroll-siRNA bzw. siAMD-1 wie unter 2.2.5.2 beschrieben transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen auf je vier *Wells* auf einer 96-Well-Platten gesplittet und am Abend auf 0,5 % FCS gesetzt. Nicht transfizierte Zellen für die Positivkontrolle

wurden mit Vollmedium, Zellen für die Negativkontrolle mit Basalmedium versorgt. Am nächsten Tag erfolgte der MTS Assay gemäß Herstellerprotokoll sowie die Auslesung bei 490 nm unter Verwendung des VERSAmax *lunable microplate reader*.

2.2.6.17 Thymidin-Inkorporations-Assay

Der Thymidin-Inkorporations-Assay wurde auf 48-*Well*-Platten ausgeführt wie zuvor beschrieben¹¹⁶. Die Bestimmung erfolgte in vierfachen Ansätzen. Die murinen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen wurden über Nacht auf Basalmedium mit 2,5 % FCS gesetzt und am nächsten Morgen für vier Stunden mit 50 ng/ml murinem EGF stimuliert. Nach vierstündiger Inkubation wurde das Kulturmedium durch reguläres Medium ersetzt, welches zusätzlich [³H]Thymidin enthielt. Nach weiteren vier Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂, wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und mit 100 µl NaOH (0,5 M) abgestoppt. Am nächsten Tag wurden die Platten für 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung resuspendiert und in ein mit 2 ml *Rotiszint*[®] *eco plus* gefülltes *Vial* überführt. Die Thymidin-Inkorporation wurde mittels Flüssigkeits-Szintillations-Spektroskopie detektiert.

2.2.6.18 Apoptose Assay

Apoptose wurde mit Hilfe des *CaspACE*[™] *Assay System, Colorimetric Kits* ausgewertet. Humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen wurden 80 % konfluent auf 6-*Well*-Platten gezogen und wie unter 2.2.5.2 beschrieben transfiziert. Als Positivkontrolle wurden Zellen für 4 Stunden mit 1 µM Staurosporin inkubiert. 72 Stunden nach siRNA-Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl einer einfachen Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mit 900 µl Vollmedium abgestoppt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und 4 °C wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 60 µl Lyse-Puffer gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurden 20 µl des Überstandes in ein *Well* einer 96-*Well*-Platte appliziert. Zuvor wurden 32 µl *Caspase Assay Puffer*, 2 µl DMSO, 100 mM DTT sowie dH₂O zu einem totalen Volumen von 78 µl vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl DEVD-pNA Substrat. Die Bestimmung erfolgte an Doppelproben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht und unter Lichtausschluss erfolgte die Messung bei 405 nm.

2.2.6.19 Promotoranalyse

Das AMD-1 Gen wurde 5000 Basenpaare über- und unterhalb der kodierenden Sequenz nach HRE (*hypoxic response elements*) Bindestellen abgesucht. Als Sequenz der Bindestelle wurde „cacgtggt“ für den murinen und „tacgtggg“ den humanen Promotor verwendet. Der gleiche Bereich wurde humanen AMD-1 Promotor auf Egr1-Bindestellen mit der Sequenz „cgtccccgc“ untersucht. Die AMD-1-Sequenzen wurde von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> übernommen.

2.2.7 Statistische Auswertung

2.2.7.1 Allgemeine statistische Auswertung

Sofern nicht anders erwähnt, sind die Daten als *Boxplots* dargestellt. Die Boxen repräsentieren die beiden mittleren Quartile, der schwarze Balken den Median und die *Whiskers* bezeichnen den größten und kleinsten Wert.

Die Daten zur Muskularisierung sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte an, die Fehlerbalken stellen den SEM (*standard error of the mean* - Standardfehler) dar. Bei Vergleich mit einer indizierten Gruppe wurde der Student's t-Test angewandt. Wurden mehrere Gruppen gegenübergestellt, so wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Newman-Keul's post-hoc Test angefertigt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von *GraphPad Prism Version 5.01*.

2.2.7.2 Statistische Auswertung von cDNA-Microarrays

Die statistische Auswertung der cDNA-Microarrays erfolgte durch Dr. Jochen Wilhelm. Die gespeicherte Daten wurden mit der *R Software*¹¹⁷ sowie *the limma package*¹¹⁸ von *BioConductor*¹¹⁹ evaluiert. Die Ergebnisse aus technischen Replikaten wurden gemittelt. Aus den Werten von wiederholten Spots wurden ebenfalls vor der weiteren Analyse die Mittelwerte gebildet. Die M/A-Daten wurden LOESS normalisiert¹²⁰ bevor sie mit der "lmFit" Funktion ebenfalls gemittelt wurden. Die Gene wurden an Hand ihrer differentiellen Expression mittels der moderaten t-Statik¹¹⁸ geordnet. Kandidaten-Listen

wurden durch Festsetzung der *False-Discovery-Rate* auf 5 % erstellt. *Geneset enrichment* Analysen wurden durch die “*geneSetTest*” Funktion zusammen mit den Informationen aus der KEGG Datenbank angefertigt, die auf der *Bioconductor database package* *mgug4122a.db* version 2.2.5 zu finden sind. Signifikant regulierte Signaltransduktionswege wurden auf der Basis einer 5 % *False-Discovery-Rate* ausgewählt.

3 Ergebnisse

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die bis heute nicht heilbar ist⁹¹. Es sind verschiedene Tiermodelle entwickelt worden, um die Entstehung der Erkrankung zu untersuchen. Als einziges dieser Modelle ist die Hypoxie-induzierte PH durch Wegnahme des krankmachenden Stimulus reversibel. In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass Mäuse nach 21 Tagen in Hypoxie (10 % O₂) eine manifeste PH aufweisen, was sich durch erhöhte Werte im rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP), in der Rechtsherzhypertrophie sowie einer gesteigerten Muskularisierung der kleinen pulmonalen Gefäße offenbart¹²¹. In der Arbeit von C. Klöpping wurde ebenfalls gefunden, dass diese Anstiege innerhalb kürzester Zeit reversibel waren: Der RVSP unterschied sich nach 14 Tagen Reexposition nicht mehr von der normoxischen Kontrollgruppe. Die Herzratio und der Muskularisierungsgrad normalisierten sich bereits nach 7 Tagen¹²¹.

Das Modell der Hypoxie-induzierten PH bietet daher nicht nur die Möglichkeit die Entstehung und Manifestation der PH sondern auch den Gesundungsprozess zu untersuchen.

Basierend auf den gesichteten Daten der Arbeit C. Klöpping¹²¹ sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine genomweite Untersuchung Aufschluss über Schlüsselgene und Signaltransduktionswege sowie deren Funktion in den reversiblen Gefäßumbauprozessen der Hypoxie-induzierten PH in der Maus geben. Somit könnten neue Zielgene und ein möglicher Angriffspunkt in der Therapie und der Heilung der PH gefunden werden.

3.1 Genomweite Analyse der mRNA-Expression während der Reversion der Hypoxie-bedingten Gefäßumbauprozesse

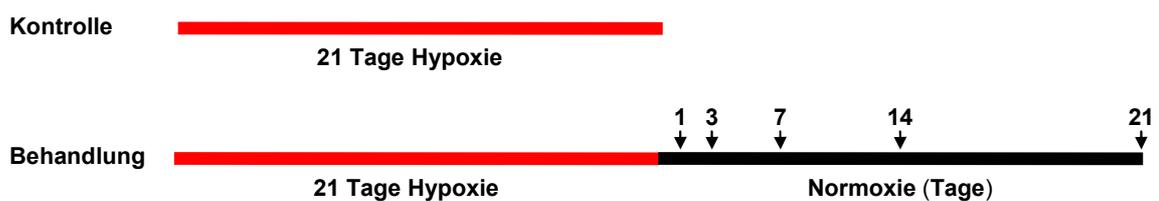
Um Veränderungen in der Genexpression während der reversiblen Gefäßumbauprozesse und damit mögliche, neue Zielgene in der PH-Therapie aufzudecken, wurden genomweite cDNA-*Microarray*-Analysen durchgeführt. Der experimentelle Studienaufbau ist in Abbildung 5A dargestellt. Zunächst wurden Mäuse für 21 Tage hypoxisch exponiert (10 % O₂), was zu einer vollausgebildeten PH führte¹²¹⁻¹²³. Anschließend wurden die Tiere ihren Gruppen entsprechend unterschiedlich lange normoxisch reexponiert, was in kürzester Zeit zu einer Reversion der Symptome führte¹²¹.

In diesen Untersuchungen zeigten sich Veränderungen in insgesamt 62 Signaltransduktionswegen (Anhang I). Einige stark regulierte Signaltransduktionswege sind exemplarisch in Abbildung 5B abgebildet. Als solche sind beispielsweise Apoptose und Zellzyklus zu nennen.

Darüber hinaus zeigten sich auch Veränderungen in der Expression von einzelnen Genen. Insgesamt waren 48 Gene in mindestens zwei untersuchten Zeitpunkten um mehr als das 2-fache zur hypoxischen Kontrollgruppe differentiell exprimiert (Anhang II). In Abbildung 5C sind einige regulierte Gene exemplarisch zusammengefasst. In grün sind Gene dargestellt, die zu dem bestimmten Zeitpunkt vermehrt exprimiert waren, rot dagegen kennzeichnet eine verminderte Expression. So ist z.B. die Transkription des natriuretischen Peptidrezeptors 3 (Npr3) zu allen Zeitpunkten stark erhöht. Der Chemokin-Rezeptor 2 (Cr2) ist dagegen am ersten Tag der Reoxygenierung vermindert, am dritten Tag nicht differenziert und in der Folge zur hypoxischen Kontrollgruppe stark erhöht exprimiert.

Als eines der am stärksten runterregulierten Gene in allen Zeitpunkten dieser Studie zeigte sich die S-Adenosylmethionindecaboxylase 1 (AMD-1). AMD-1 ist eines der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der Polyaminbiosynthese⁸⁹.

A



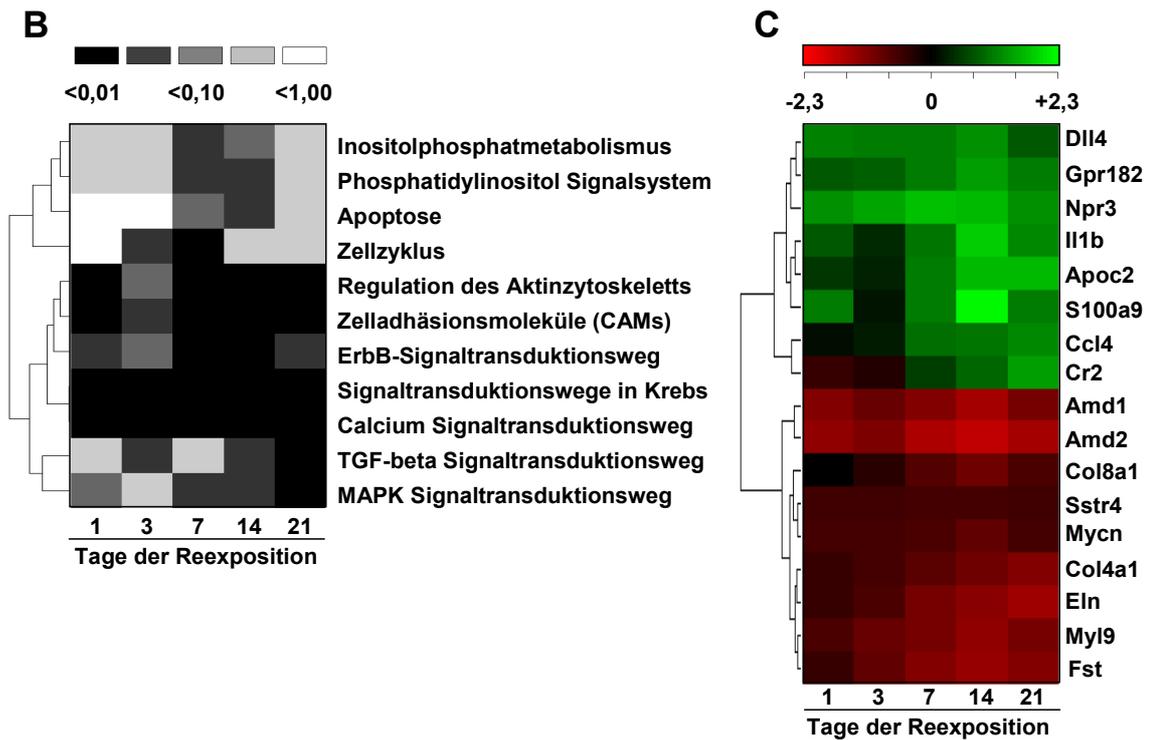


Abbildung 5: Veränderung der Genexpression durch normoxische Reexposition nach chronischer Hypoxie in der Mauslunge

A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. C57Bl/6J Mäuse wurden chronischer Hypoxie ausgesetzt (21 Tage, 10 % O₂). Die Behandlungsgruppen wurden für die indizierten Zeitspannen normoxisch reexponiert. B) Selektierte und im Verlauf der reversiblen Gefäßumbauprozesse stark regulierte Signaltransduktionswege. Die Graustufen geben die p-Werte von $<0,01$ (schwarz) bis $<1,00$ (weiß) wieder. C) Ausgewählte und im Verlauf der reversiblen Gefäßumbauprozesse regulierte Gene, die im Vergleich zur hypoxischen Kontrollgruppe in mindestens 2 Zeitpunkten um mindestens den Faktor 1,5 differentiell exprimiert sind. Die Daten in B und C wurden mittels cDNA-Microarray-Analyse von n = 20 Tieren in der Kontrollgruppe und n = 12 Tieren in den Behandlungsgruppen gewonnen.

AMD-1 war bereits am ersten Tag nach der Rückführung der Tiere in Normoxie stark und signifikant erniedrigt (Abbildung 6A). Die zwei unterschiedlichen Signale in der AMD-1-Expression kommen dadurch zustande, dass auf den verwendeten cDNA-Microarray-Chips zwei Sonden für die Detektion von AMD-1 aufgetragen sind. Die verminderte Expression blieb über den gesamten Zeitverlauf der Studie bestehen (Abbildung 5C).

Diese Ergebnisse wurden durch quantitative (q)-PCR aus randomisierten Proben bestätigt. Während die mRNA-Expression von AMD-1 im zeitlichen Verlauf der reversiblen Gefäßumbauprozesse erniedrigt waren (Abbildung 6B), zeigte sich eine erhöhte Expression während hypoxischer Exposition (Abbildung 6C).

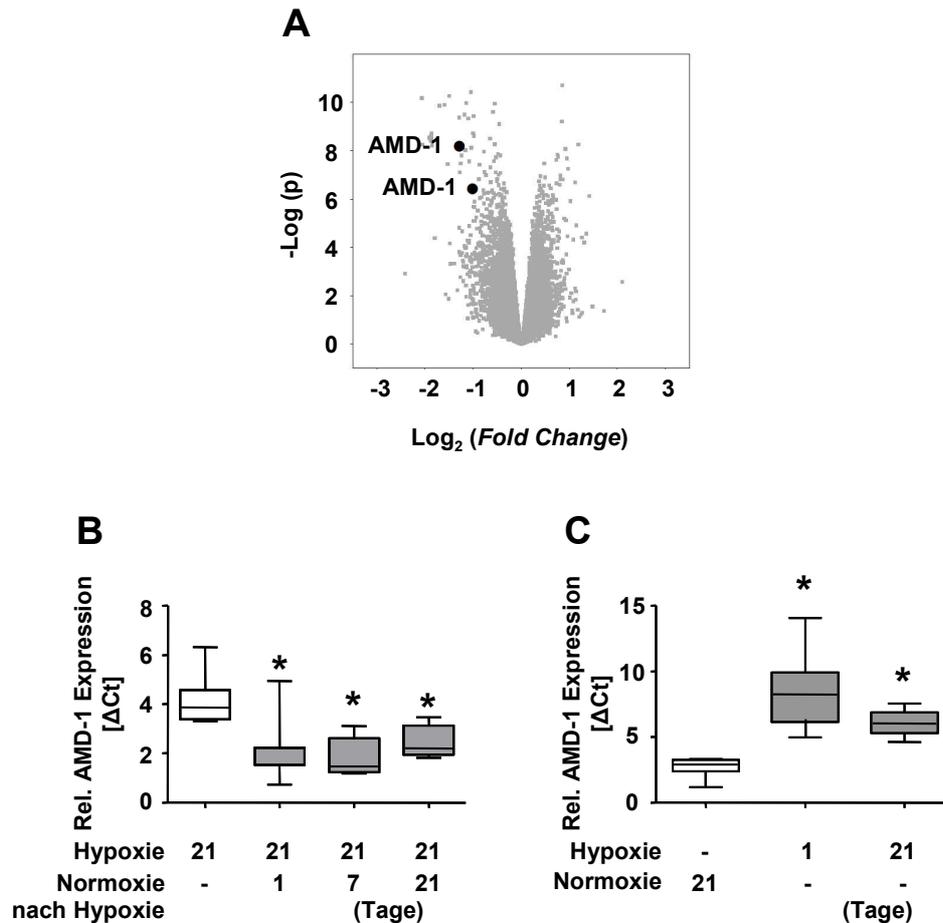


Abbildung 6: AMD-1-mRNA-Expression nach chronischer Hypoxie sowie unter anschließender Reoxygenierung

A) Veränderungen in der mRNA-Expression von AMD-1 nach 24 Stunden Reoxygenierung nach vorangegangener dreiwöchiger chronisch hypoxischer Exposition. Die Daten wurden an Hand von cDNA-*Microarrays* aus 20 Kontroll(21 Tage Hypoxie)- und 12 behandelten Tieren gewonnen. B) Veränderungen in der AMD-1-mRNA-Expression im Zeitverlauf des reversiblen Gefäßumbaus wurden mittels q-PCR im Vergleich zur chronisch-hypoxischen Kontrollgruppe generiert. $n = 6 - 8$ Tieren pro Gruppe. Die Werte wurden auf die interne Kontrolle B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede verglichen zur hypoxischen Kontrolle. C) AMD-1-mRNA-Expression im Zeitverlauf der hypoxischen Exposition. $n = 5 - 6$ Tiere pro Gruppe. Die Werte wurden auf die interne Kontrolle B2M bezogen normalisiert. *Signifikante Unterschiede verglichen zur hypoxischen Kontrolle.

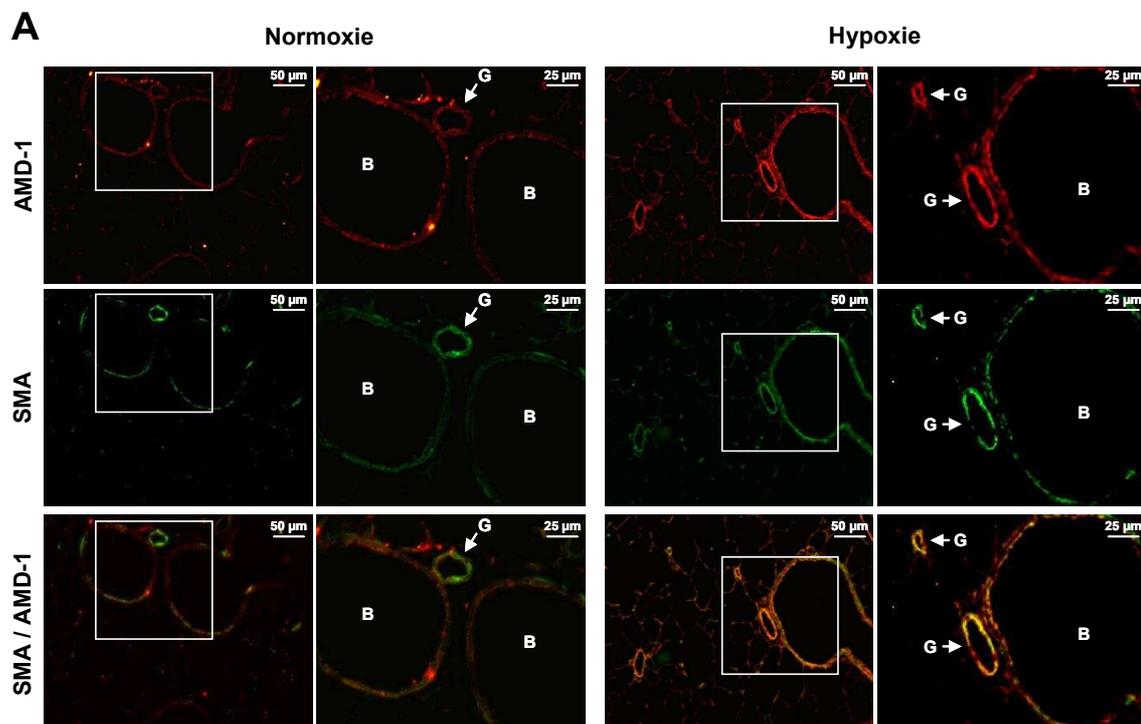
3.2 Lokalisation von AMD-1 in der Mauslunge

Um die Rolle von AMD-1 im Gefäßumbau und der PH genauer zu untersuchen, sollte zunächst geklärt werden, ob AMD-1 überhaupt in pulmonalen Gefäßen exprimiert wird. Zur Lokalisation von AMD-1 in der Mauslunge wurde eine nicht-isotopische *in situ*

Hybridisierung (NISH) mit kombinierter Immunfluoreszenz angewandt. Hierbei bindet eine zur Zielsequenz komplementäre Sonde (Antisense-Sonde) an den gewünschten Teil der mRNA. Da diese Sonde zuvor mit Digoxigenin markiert wurde, kann durch die Applikation eines gegen Digoxigenin gerichteten und fluorimetrisch markierten Antikörpers die Lokalisation des zu untersuchenden Gens ermittelt werden.

Durch Anfärbung der AMD-1-Ribonukleinsäure in rot konnte auch visuell eine verstärkte AMD-1-Expression in der Mauslunge nach chronisch hypoxischer Exposition gegenüber normoxischen Kontrollen beobachtet werden (Abbildung 7A). Die gleichzeitige Färbung des glattmuskulären alpha-Aktins (SMA) in grün mittels konventioneller Immunfluoreszenz, ließ eine Lokalisation in der glatten Muskelschicht der Bronchien (B) sowie der pulmonalen Gefäße (G) erkennen (Abbildung 7A). Eine der Zielstruktur entsprechende Sense-Sonde sowie ein zwei Stunden zuvor applizierter 10-facher Überschuss an nicht markierter Antisense-Sonde dienten als Negativkontrollen (Abbildung 7B).

Eine q-PCR von mikrodisezierten pulmonalen Gefäßen bestätigte eine Hochregulation von AMD-1 unter chronisch hypoxischen Bedingungen in diesem Kompartiment (Abbildung 7C).



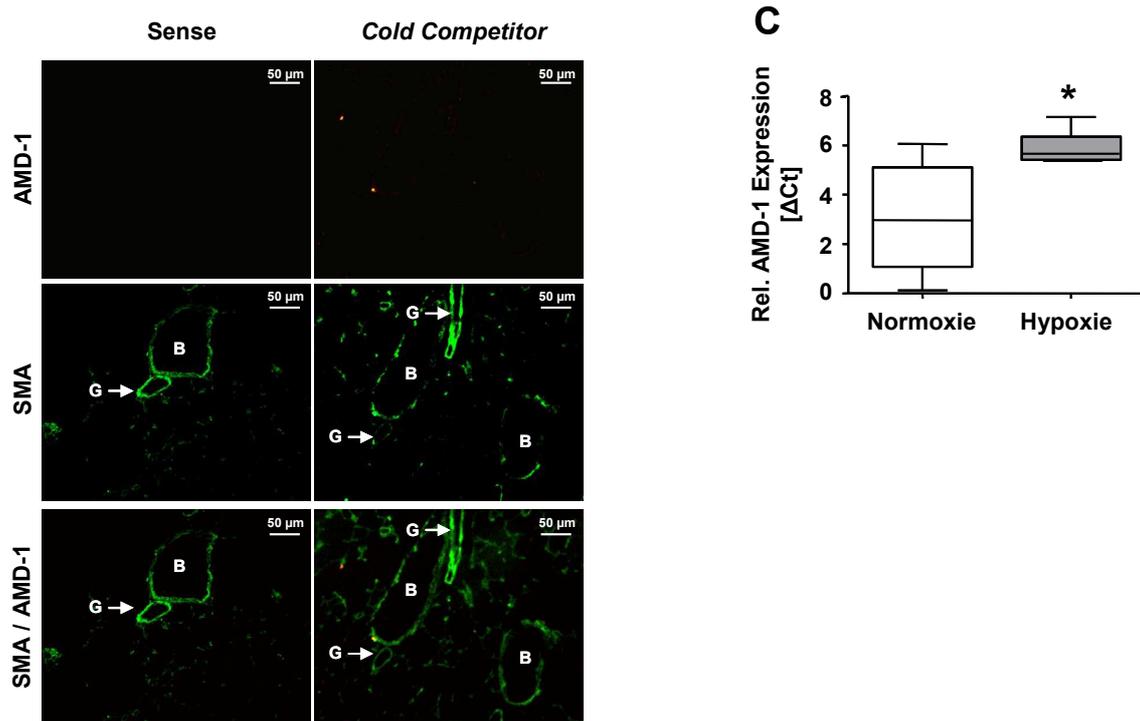


Abbildung 7: Lokalisation von AMD-1 in der Mauslunge

Die Lokalisation von AMD-1 in der Mauslunge wurde durch *in situ* Hybridisierung mit gekoppelter Immunfluoreszenz gegen glattmuskuläres alpha-Aktin (SMA) bestimmt. (B = Bronchus, G = Gefäß) A) Detektion von AMD-1 in der Mauslunge nach normoxischer oder chronisch hypoxischer (21 Tage, 10 % O₂) Exposition mit Hilfe einer zum AMD-1 Gen komplementären Sense-RNA-Sonde. B) Eine zur Zielsequenz identische Sense-Sonde sowie ein 10-facher Überschuss an nicht markierter Antisense-Sonde (*Cold Competitor*) dienen als Negativkontrollen auf Schnitten von hypoxischen Tieren. Ein repräsentatives Tier ist jeweils gezeigt. C) AMD-1-mRNA-Expression in pulmonalen Gefäßen. Die Analyse wurde durch q-PCR auf lasermikrodissektiertem Material von n = 6 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die Werte wurden auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede zur normoxischen Kontrollgruppe.

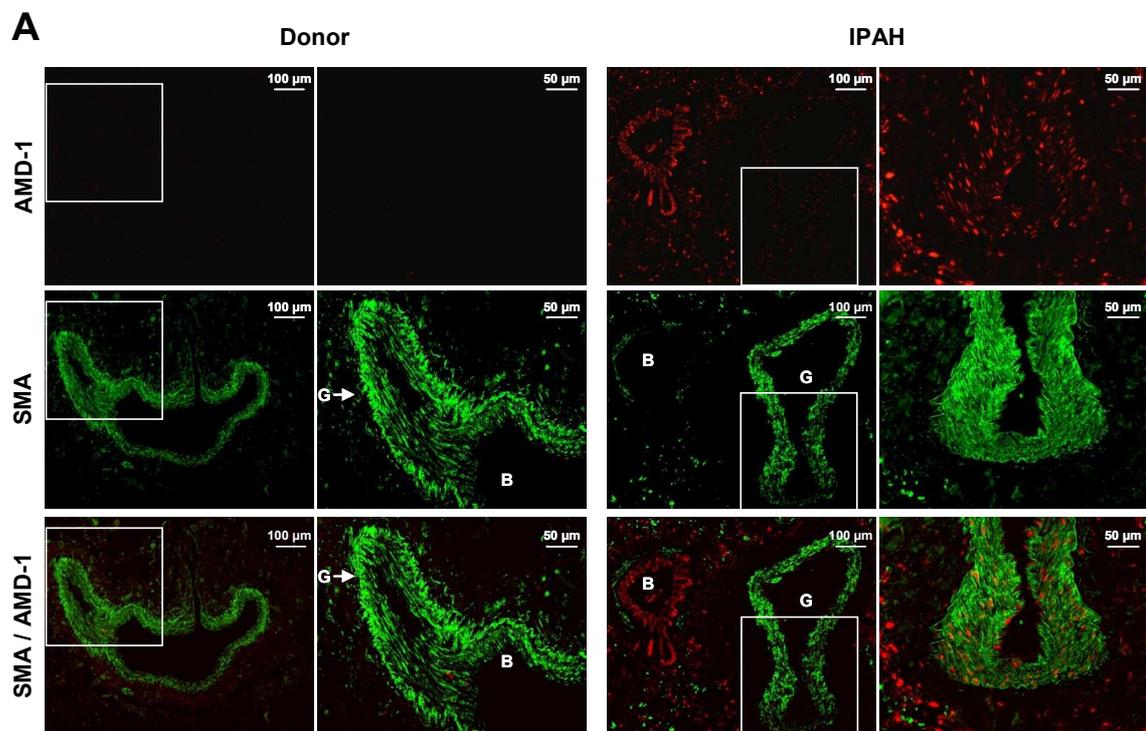
3.3 Lokalisation von AMD-1 in der humanen Lunge

Um zu bestimmen ob AMD-1 auch in der humanen PH eine veränderte Genexpression im Vergleich zu gesunden Donoren aufweist, wurde die Lokalisation und Regulation in menschlichem Gewebe untersucht.

Ebenso wie in den Experimenten in der Mauslunge, zeigte sich AMD-1 stärker exprimiert in Lungen von erkrankten Individuen im Vergleich zu gesunden Donoren. Dies wurde

ebenfalls mittels NISH ermittelt (Abbildung 8A, B). Als Negativkontrolle für die NISH dienten wie im Mausmodell eine der Zielstruktur entsprechende Sense-Sonde sowie ein zwei Stunden zuvor applizierter 10-facher Überschuss an nicht markierter Antisense-Sonde. Zusätzlich wurde noch eine Poly-T-Sonde als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 8B).

In einem nächsten Schritt wurde die AMD-1-Expression in mikrodisssektierten pulmonalen Gefäßen mittels q-PCR analysiert. Hier zeigte ebenfalls eine signifikante Erhöhung der AMD-1-Genexpression (Abbildung 8C).



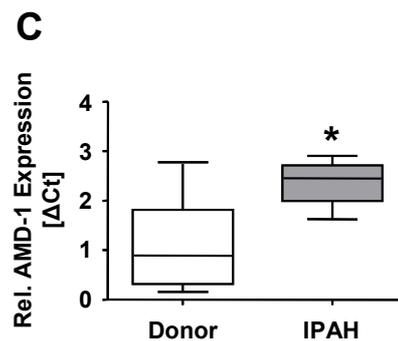
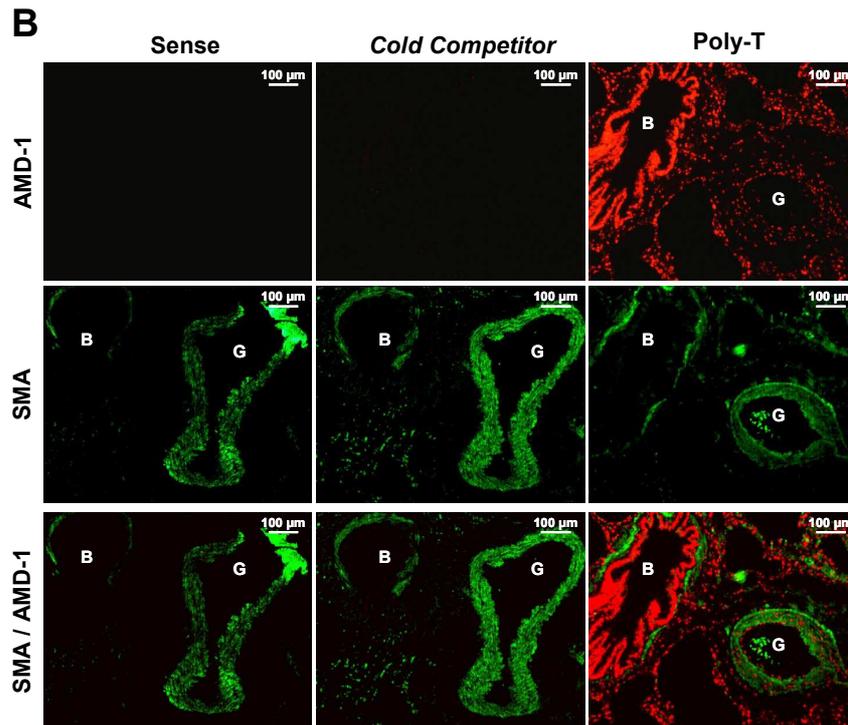


Abbildung 8: Lokalisation von AMD-1 in der humanen Lunge

Die Lokalisation von AMD-1 in der humanen Lunge wurde analog zur Mauslunge durch *in situ* Hybridisierung mit gekoppelter Immunfluoreszenz gegen SMA bestimmt. (B = Bronchus, G = Gefäß) A) Detektion von AMD-1 in der gesunden (Donor) und erkrankten (IPAH) Lunge an Hand einer Antisense-Sonde. Ein repräsentatives Individuum ist pro Gruppe gezeigt. B) Eine zur Zielsequenz identische Sense-Sonde sowie ein 10-facher Überschuss an nicht markierter Antisense-Sonde (*Cold Competitor*) dienten als Negativkontrollen auf Schnitten von IPAH-Lungen. Eine Poly-T-Sonde wurde als Positivkontrolle auf einem Schnitt einer Donor-Lunge verwendet. C) AMD-1-mRNA-Expression in pulmonalen Gefäßen. Die Analyse wurde durch q-PCR auf lasermikrodissektiertem Material von n = 5 Individuen pro Gruppe durchgeführt. Die Werte wurden auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede zur Donor-Kontrollgruppe.

3.4 AMD-1-Expression in systemischen Gefäßen

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Hypoxie-induzierte Erhöhung der AMD-1-Expression nur lokal in pulmonalen Gefäßen oder auch in systemischen Gefäßen auftritt.

Mittels q-PCR wurde die AMD-1 Expression in der Aorta (Abbildung 9A) und in der *Arteria carotis* (Abbildung 9B) von Mäusen ermittelt, die zuvor für 1, 7 oder 21 Tage hypoxisch exponiert wurden. Zu keinem untersuchten Zeitpunkt zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu der jeweiligen normoxischen Kontrolle.

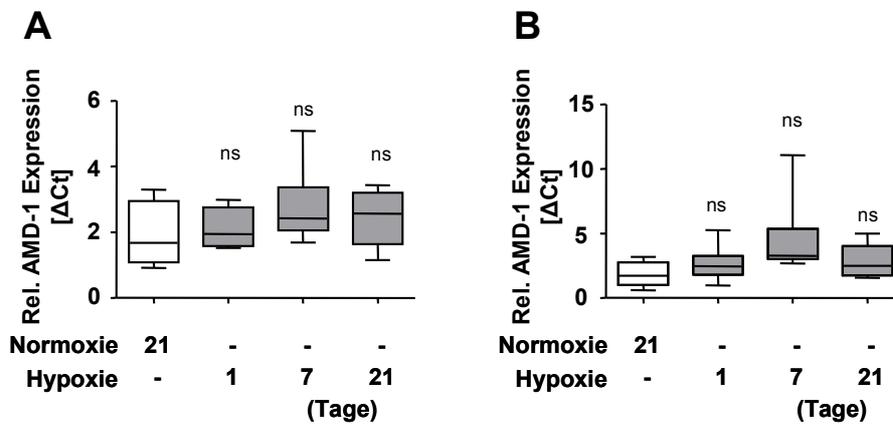


Abbildung 9: Die AMD-1-Expression in systemischen Gefäßen der Maus im Vergleich von Normoxie und Hypoxie

AMD-1-mRNA-Expression in der Maus- A) Aorta und B) *Arteria carotis* während hypoxischer Exposition für je 1, 7 und 21 Tagen wurden per q-PCR ermittelt. $n = 5 - 6$ Tieren pro Gruppe. Die Werte wurden auf B2M normalisiert.

3.5 Physiologische Untersuchungen von $AMD-1^{+/-}$ -Mäusen nach chronisch hypoxischer Exposition

Um die Funktion einzelner Gene zu untersuchen, können diese in einem Organismus gezielt manipuliert oder deaktiviert werden. Schaltet man ein Gen in einem Tier aus, spricht man von einem *Knockout*-Tier. Werden beide Kopien des betreffenden Gens deaktiviert, spricht man von einem homozygoten *Knockout*-Tier. Wird allerdings nur ein Allel ausgeschaltet, wird dieses Tier im Bezug auf das entsprechende Gen als heterozygot bezeichnet.

Da homozygote *AMD-1-Knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind¹²⁴, wurden in der vorliegenden Arbeit heterozygote *AMD-1-Knockout*-Mäuse (*AMD-1*^{+/-}-Mäuse) verwendet. Diese bilden nur eine Kopie des Gens. Die eigenen Untersuchungen zeigten, dass heterozygote *AMD-1-Knockout*-Mäuse eine geringere Expression der *AMD-1*-mRNA aufweisen (Abbildung 10).

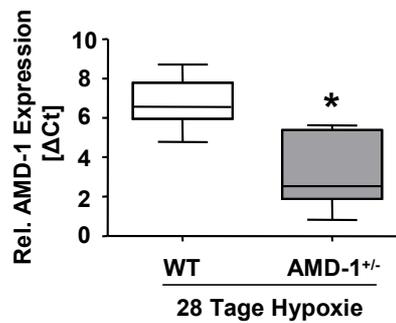


Abbildung 10: *AMD-1* mRNA-Expression in *AMD-1*^{+/-}- und Wildtyp-Mäusen

Die *AMD-1*-mRNA Expression von Wildtypen (WT) im Vergleich zu *AMD-1*^{+/-}-Tieren wurde durch q-PCR an je n = 8 Tieren bestimmt und auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Wildtypgruppe.

Um die Rolle von *AMD-1* in der Hypoxie-induzierten PH *in vivo* zu untersuchen, wurden *AMD-1*^{+/-}-*Knockout*-Mäuse chronischer Hypoxie (28 Tage, 10 % O₂) ausgesetzt.

Anschließende physiologische Untersuchungen zeigten keine Veränderungen zwischen normoxischen *Knockout*- und Wildtyp-Tieren (Abbildung 11A-C). Im Gegensatz dazu wiesen *AMD-1*^{+/-}-Mäuse unter hypoxischen Bedingungen niedrigere Werte im rechtsventrikulären systolischen Druck (*right ventricular systolic pressure* – RVSP) (Abbildung 11A) auf. Auch die unter chronischer Hypoxie auftretende Rechtsherzhypertrophie, die aus dem Quotienten der Trockenmasse des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels inklusive Septum (LV+S) errechnet wurde, war in *Knockout*-Tieren gegenüber den Wildtyp-Kontrollen stark vermindert (Abbildung 11B). Darüber hinaus resultierte der Verlust eines Allels in einem schwächeren jedoch signifikant erniedrigten Muskularisierung der pulmonalen Gefäße mit einem Durchmesser von 20 - 70 μm in chronischer Hypoxie. Dies ist aus dem höheren Prozentsatz der nicht muskularisierten Gefäße sowie aus der Verringerung des Anteils der vollmuskularisierten Gefäße gegenüber Wildtyp-Kontrollen ersichtlich (Abbildung 11C). In Abbildung 11D ist

für jede Gruppe ein repräsentatives Bild dargestellt.

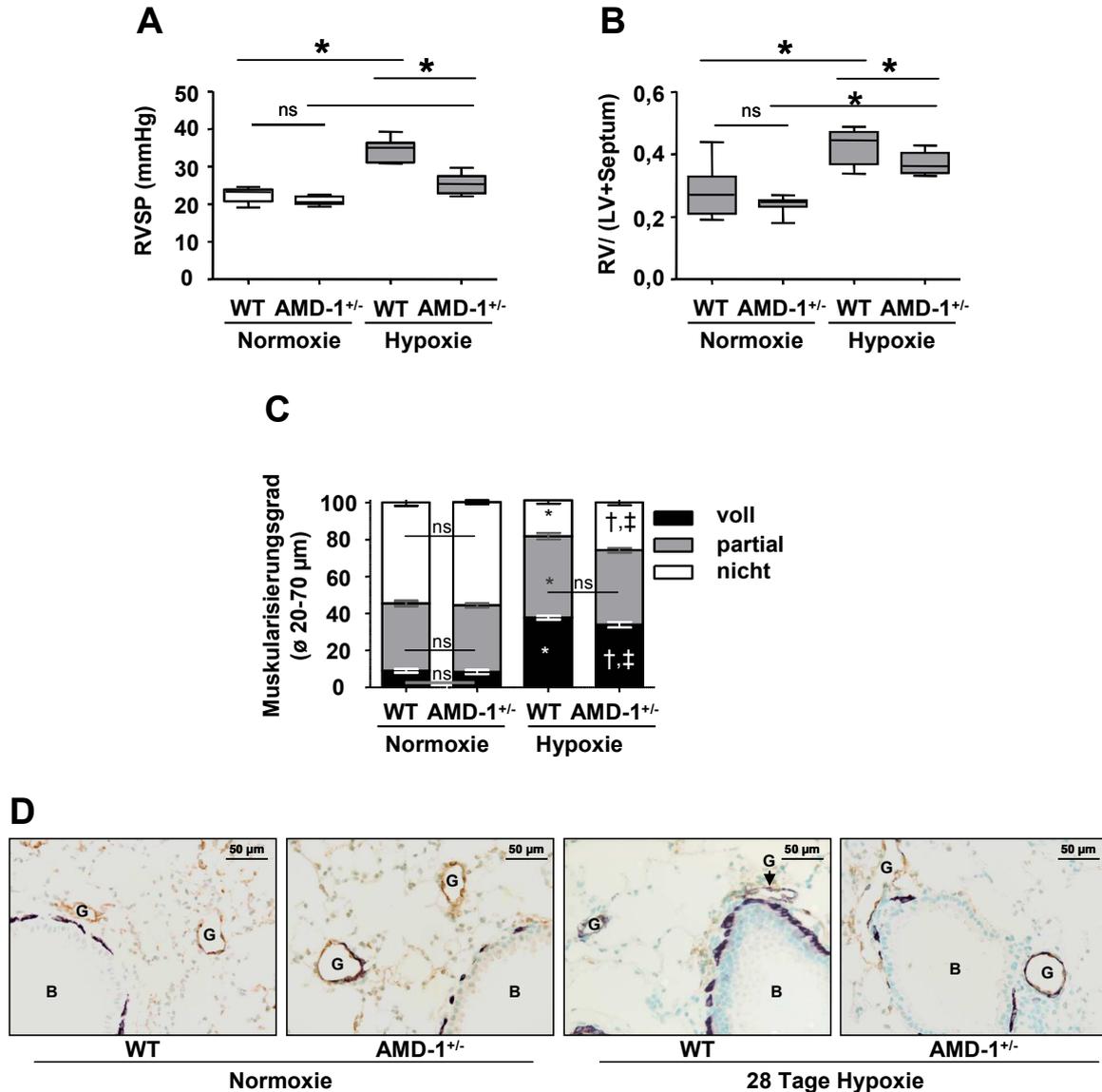


Abbildung 11: Entwicklung der pulmonalen Hypertonie in AMD-1^{+/-}- und Wildtyp-Mäusen unter chronischer Hypoxie

Hämodynamische Messungen an Wildtypen (WT) und AMD-1^{+/-}-Mäusen, die normoxisch bzw. chronisch hypoxisch (28 Tage, 10 % O₂) exponiert wurden. A) Der RVSP wurde durch einen Rechtsherzkatheter an n = 7 – 8 Tieren pro Gruppe bestimmt. B) Die Rechtsherzhypertrophie wurde als Ratio der Massen des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels inklusive Septum (LV+S), gewogen als Trockenmasse, ermittelt. Die Werte stammen aus n = 8 – 10 Tieren pro Gruppe. *Signifikante Unterschiede. C) Der Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße im Durchmesser von 20 – 70 µm wurde auf Lungenschnitten analysiert, die mit Antikörpern gegen glattmuskuläres alpha-Aktin (SMA, violett) und von-Willebrand-Faktor (vWF, braun) gefärbt waren. Die Werte sind als Prozent aller gezählten Gefäße dargestellt und in die Gruppen voll-, partial- und nichtmuskularisiert unterteilt. Die Werte stammen aus n = 7 – 8 Tieren pro Gruppe.

*Signifikante Unterschiede im Vergleich zu normoxischen Wildtypen, †signifikante Unterschiede zu normoxischen AMD-1^{+/-}-Mäusen, ‡ signifikante Unterschiede zu hypoxischen Wildtypen. (ø externer Gefäßdurchmesser). D) Repräsentative Bilder des Muskularisierungsgrads aus je einem Tier pro Gruppe. (B = Bronchus, G = Gefäß).

3.6 Expression von ODC-1 in der pulmonalen Zirkulation

Neben AMD-1 ist die Ornithindecaboxylase-1 (ODC-1) das zweite geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Polyaminsynthese⁸⁹. ODC-1 trat in den cDNA-Microarray-Analysen nicht als signifikant verändert auf (Abbildung 5C und Anhang II). Die ODC-1-mRNA-Expression wurde zusätzlich mittels q-PCR untersucht und zeigte weder durch chronische Hypoxie (21 Tage, 10 % O₂, Abbildung 12A) noch durch nachfolgende normoxische Reexposition (Abbildung 12B) eine Veränderung gegenüber den jeweiligen Kontrollen.

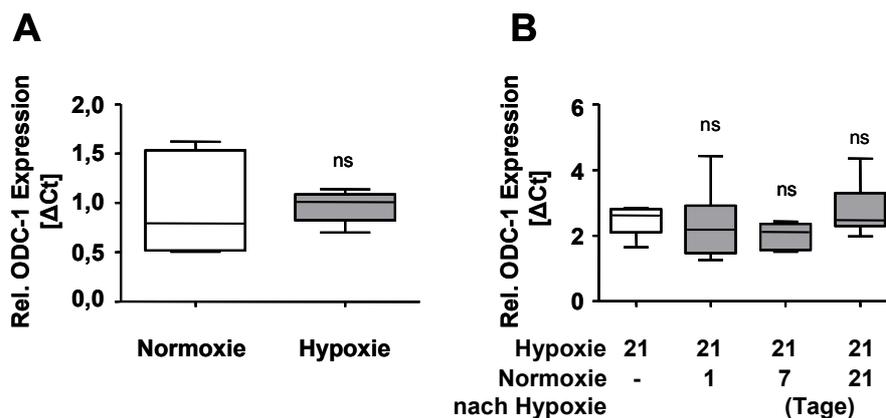


Abbildung 12: ODC-1-mRNA-Expression nach chronischer Hypoxie sowie unter anschließender Reoxygenierung

A) Die ODC-1^{+/-}-mRNA-Expression von Wildtyp-Mäusen in chronischer Hypoxie (21 Tage, 10 % O₂) wurde durch q-PCR von je n = 5 Tieren bestimmt und auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede zu den normoxischen Kontrollen. B) Die ODC-1^{+/-}-mRNA-Expression von Wildtyp-Mäusen während der Reoxygenierung (1-21 Tage, 10 % O₂) wurde durch q-PCR an je n = 6 Tieren bestimmt und auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede zu den hypoxischen Kontrollen.

Auch isolierte pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (PASMCs) reagierten auf verminderte O₂-Zufuhr (24 Stunden, 1 % O₂) nicht mit einem Anstieg der ODC-1-Expression. Humane PASMCs (Abbildung 13A) zeigten keine Veränderung der ODC-1-

mRNA, während murine PAMSCs sogar einen signifikanten Abfall der ODC-1-Expression aufwiesen (Abbildung 13B).

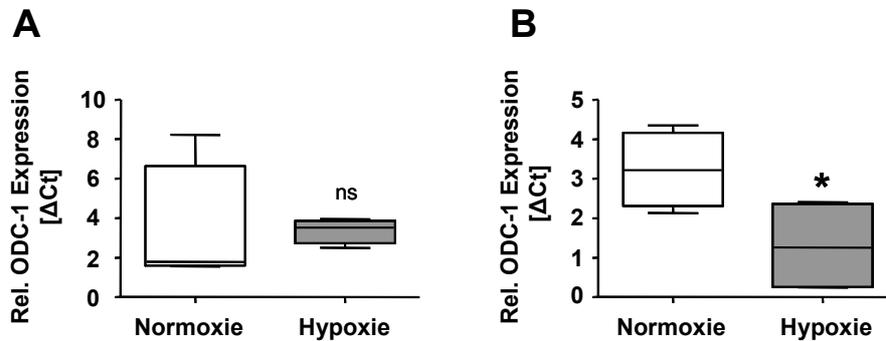


Abbildung 13: ODC-1-Expression in isolierten glatten Muskelzellen nach hypoxischer Exposition

ODC-1-mRNA-Expression nach hypoxischer Exposition (24 Stunden, 1 % O₂) in A) humanen und B) murinen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Die Werte wurden jeweils aus n = 4 individuellen Experimenten gewonnen und auf β-Aktin normalisiert. *Signifikante Unterschiede zu den normoxischen Kontrollen.

3.7 Physiologische Untersuchungen von ODC-1^{+/-}-Mäusen in chronischer Hypoxie

Obwohl sich keine Veränderungen im ODC-1-Expressionsmuster unter chronisch hypoxischer Exposition im Mausmodell zeigten, wurden auch ODC-1^{+/-} *Knockout*-Mäuse auf einen potentiell präventiven Phenotyp in der Hypoxie-induzierten PH hin untersucht. Mittels q-PCR konnte bestätigt werden, dass diese Tiere das ODC-1-Gen weniger stark als die Wildtypen exprimierten (Abbildung 14).

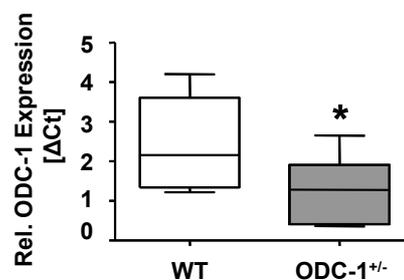
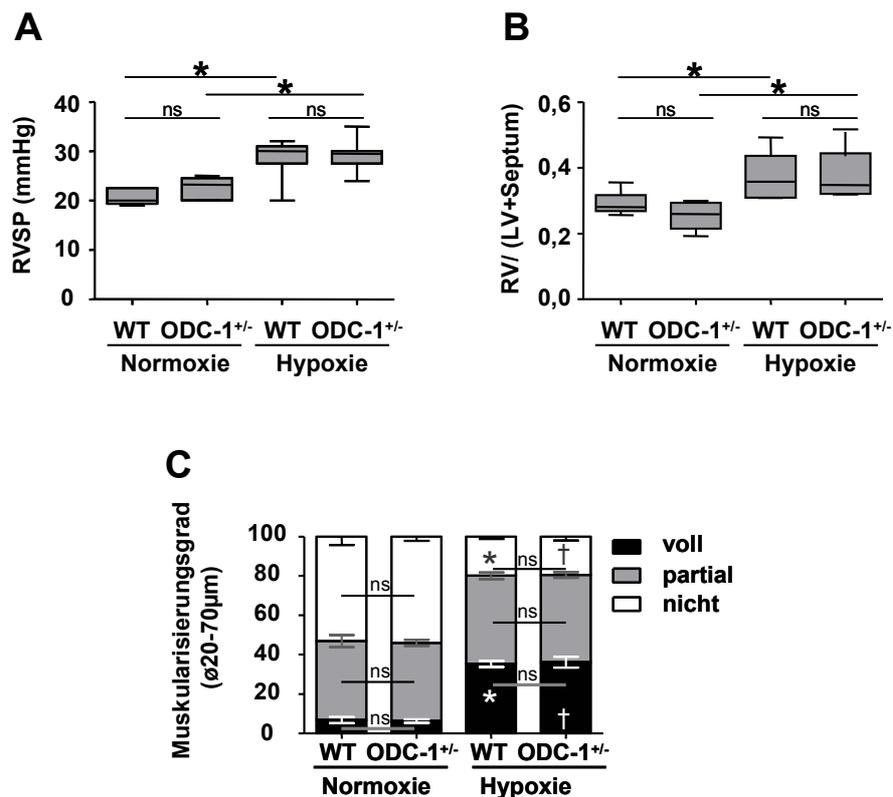


Abbildung 14: ODC-1-mRNA-Expression in ODC-1^{+/-}- und Wildtyp-Mäusen

Die ODC-1^{+/-}-mRNA-Expression in Wildtypen (WT) und ODC-1^{+/-}-Tieren wurde durch q-PCR an je

n = 8 Tieren bestimmt und auf B2M normalisiert. *Signifikanter Unterschied im Vergleich mit Wildtypen.

Unter normoxischen Bedingungen wiesen ODC-1^{+/-}- genau wie AMD-1^{+/-}-Mäuse in den gemessenen physiologischen Parametern keine Veränderungen im Vergleich zu den Wildtypen auf (Abbildung 15A-C). Weiterhin resultierte der partielle *Knockout* im ODC-1-Gen aber auch in keinen Unterschieden unter chronisch hypoxischen Bedingungen im Vergleich zu Wildtypen: Sowohl im RVSP (Abbildung 15A) als auch in der Rechtsherzhypertrophie (Abbildung 15B), ließen sich nach chronisch hypoxischer Exposition keine Unterschiede zwischen *Knockout*-Tieren und Wildtyp-Mäusen feststellen. Des Weiteren zeigte sich kein veränderter Phänotyp im Muskularisierungsgrad der pulmonalen Gefäße (externer Durchmesser 20 - 70 µm) in chronisch hypoxischen Tieren. Weder der Prozentsatz der voll- noch der partial- oder nichtmuskularisierten Gefäße unterschied sich in den beiden hypoxischen Gruppen voneinander (Abbildung 15C). Repräsentative Bilder zum Muskularisierungsgrad sind in Abbildung 15D dargestellt.



D

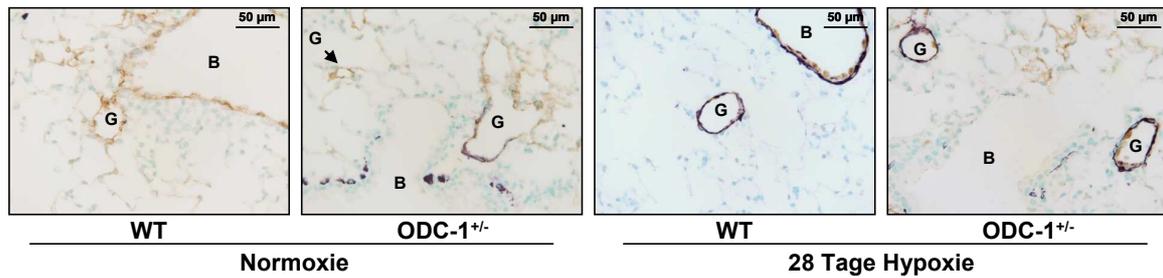


Abbildung 15: Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH in ODC-1^{+/-} im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen

Hämodynamische Messungen an Wildtypen (WT) und ODC-1^{+/-}-Mäusen, die normoxisch bzw. chronisch hypoxisch (28 Tage, 10 % O₂) exponiert waren. A) Der RVSP wurde durch einen Rechtsherzkatheter an n = 6 – 8 Tieren bestimmt. *Signifikante Unterschiede zu den gekennzeichneten Gruppen. B) Die Rechtsherzhypertrophie wurde als Ratio aus RV und LV+S, gewogen als Trockenmasse, ermittelt. Die Werte wurden aus n = 6 – 8 Tieren ermittelt. *Signifikante Unterschiede zu den gekennzeichneten Gruppen. C) Der Muskularisierungsgrad der Pulmonalgefäße im Durchmesser von 20 – 70 µm wurde an Lungenschnitten analysiert, die mit Antikörpern gegen SMA und vWF gefärbt waren. Die Werte sind als Prozent aller gezählten Gefäße dargestellt und in die Gruppen voll-, partial- und nichtmuskularisiert unterteilt. Die Werte wurden aus n = 6 – 8 Tieren bestimmt. *Signifikante Unterschiede zu normoxischen Wildtypen, †signifikante Unterschiede zu normoxischen ODC-1^{+/-}-Mäusen. (ø externer Durchmesser). D) Repräsentative Bilder des Muskularisierungsgrads aus einem Tier pro Gruppe. (B = Bronchus, G = Gefäß).

3.8 Einfluss der normoxischen Reexposition auf die Hypoxie-induzierte Proliferation

Da Proliferation in den Hypoxie-induzierten Gefäßumbauprozessen eine wichtige Rolle spielt⁵¹, wurde nachfolgend der Einfluss der Reoxygenierung auf die Proliferation in der pulmonalen Gefäßstruktur untersucht.

Bereits in der cDNA-Microarray-Analyse trat die Gruppe „Zellzyklus“ als stark regulierter Signaltransduktionsweg auf (Abbildung 5B). Auch q-PCR-Analysen von laser-mikrodissektierten Gefäßen von Wildtyp-Mäusen zeigten eine gesteigerte Expression des Proliferationsmarkers Ki67 während chronisch hypoxischer Exposition (Abbildung 16A). Durch anschließende Reoxygenierung wurde diese Expression in den pulmonalen Gefäßen wieder erniedrigt (Abbildung 16A). Auf Proteinebene konnte das gleiche Verlaufsmuster

für den Proliferationsmarker *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) nachgewiesen werden (Abbildung 16B). Eine immunhistochemische Färbung zeigte vermehrt PCNA positive Zellkerne in der pulmonalen Gefäßstruktur von chronisch hypoxischen Mäusen im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe. Nach 14tägiger Reoxygenierung nahm die Anzahl PCNA positiver Zellkerne deutlich ab (Abbildung 16C).

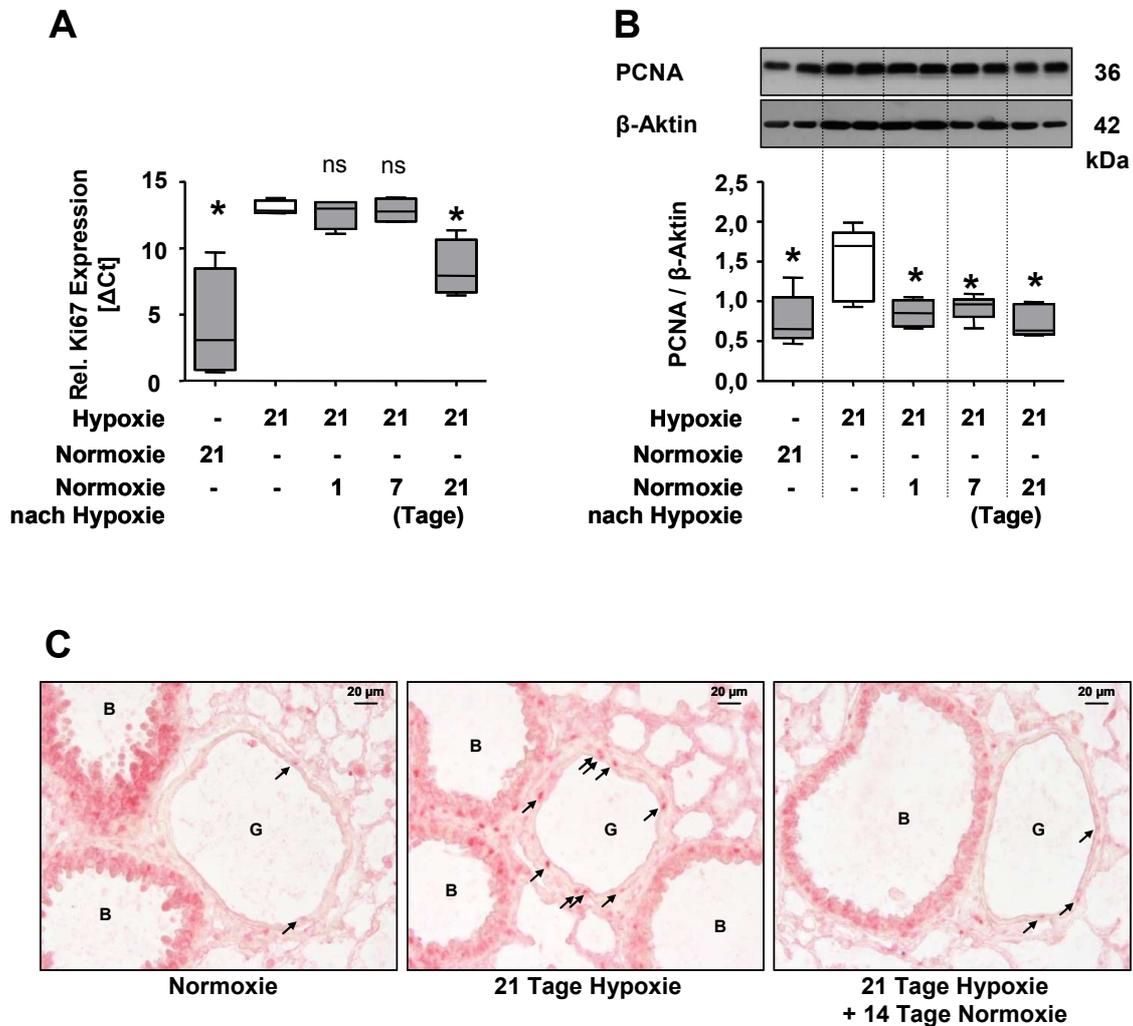


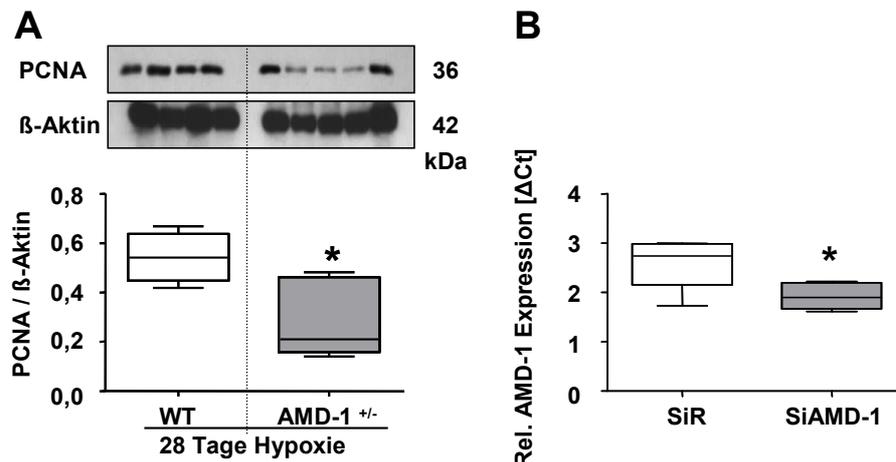
Abbildung 16: Vaskuläre Umbauprozesse und reversible Gefäßumbauprozesse sind durch Veränderungen in der Proliferation charakterisiert

A) Die relative Ki67-mRNA-Expression wurde mittels q-PCR von murinen lasermikrodissektierten pulmonalen Gefäßen während des Zeitverlaufs des reversiblen Gefäßumbaus bestimmt. Die Werte wurden an $n = 4$ Tieren pro Gruppe bestimmt und auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede verglichen zur hypoxischen Kontrollgruppe. B) Western Blot Analyse von Mauslungenhomogenat für das Protein PCNA während des Zeitverlaufs der normoxischen Reexposition. Gezeigt sind repräsentative Auftragungen von $n = 5 - 6$ Tieren pro Gruppe. β -Aktin diente zur Normalisierung. C) Immunhistochemische Färbung gegen PCNA in Mauslungen, die entweder normoxisch, chronisch hypoxisch oder nach dreiwöchiger Hypoxie wieder für zwei Wochen normoxisch reexponiert wurden. Ein repräsentatives Tier pro Gruppe ist dargestellt. Die Pfeile kennzeichnen PCNA-positive Zellkerne. (B = Bronchus, G = Gefäß).

3.9 Auswirkung von verminderter AMD-1-Expression auf das Gleichgewicht von Proliferation und Apoptose

Da sowohl die Gefäßumbauprozesse als auch deren Revertierung mit Veränderungen in der Proliferation einhergehen (Abbildung 16A-C), wurde der Einfluss einer geminderten AMD-1-Expression auf die Proliferation untersucht (Abbildung 17A). Eine Western Blot Analyse des Lungenhomogenats von AMD-1^{+/-}-Mäusen zeigte eine verminderte Expression des Proliferationsmarkers PCNA verglichen zu Wildtypen (Abbildung 17A). Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von AMD-1 durch die Verwendung einer spezifischen siRNA vermindert (Abbildung 17B), was zu einer geringeren Expression von Ki67 (Abbildung 17C) führte. Des Weiteren zeigte sich eine erniedrigte Proliferation in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen im MTS Assay (Abbildung 17D), sowie durch Auszählung der totalen Zellzahl jeweils 72 Stunden nach siRNA-Transfektion (Abbildung 17E).

Gleichzeitig mit der erniedrigten Proliferation ging eine verminderte Expression mit einer erhöhten Apoptose-Rate in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen einher (Abbildung 17F). Staurosporin diente hierbei als Positivkontrolle.



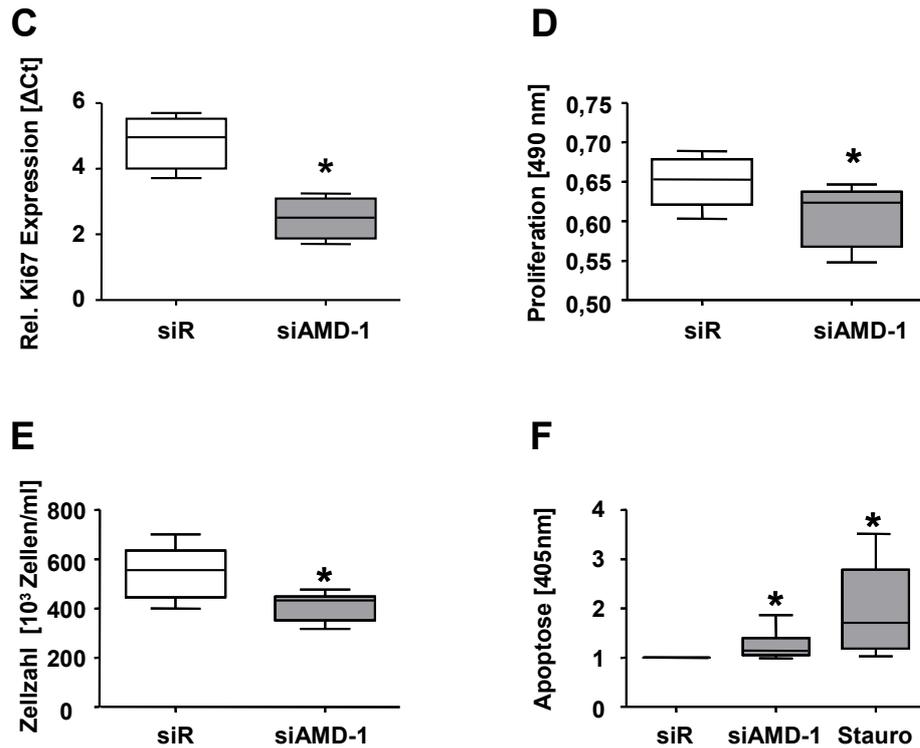


Abbildung 17: Verminderung der AMD-1-Expression erniedrigt die Proliferation

A) Western Blot Analyse von Mauslungenhomogenat für PCNA von Wildtypen (WT) und AMD-1^{+/-}-Mäusen nach chronisch hypoxischer Exposition (28 Tage, 10 % O₂). n = 4 - 5 Tieren pro Gruppe. Die Daten wurden auf β-Aktin normalisiert. B) Die relative AMD-1-mRNA-Expression wurde durch q-PCR in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach *Knockdown* von AMD-1 quantifiziert. n = 5 individuelle Versuche. Die Werte wurden auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede im Vergleich zum unspezifischen *Knockdown* (siR). C) Relative Ki67-mRNA-Expression quantifiziert durch q-PCR in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach *Knockdown* von AMD-1. n = 4 individuelle Versuche. Die Werte wurden auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede im Vergleich zu siR. D) Proliferation in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach *Knockdown* von AMD-1 wurde mit dem MTS Assay durchgeführt. n = 4 individuellen Experimente. *Signifikante Unterschiede im Vergleich zu siR. E) Proliferation in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach *Knockdown* von AMD-1 mittels Bestimmung der Zellzahl. n = 6 individuelle Experimente. *Signifikante Unterschiede im Vergleich zu siR. F) Apoptose-Rate nach *Knockdown* von AMD-1 mittels *CaspACE*-Assay. n = 8 Experimente. Staurosporin (Stauro) diente als Positivkontrolle. *Signifikante Unterschiede verglichen zu siR.

3.10 Einfluss von HIF auf die Hypoxie-induzierte Hochregulation von AMD-1

Hypoxie kann durch verschiedene Faktoren zur veränderten Expression von Genen führen.

So kann Hypoxie den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 (HIF-1) aktivieren⁵⁰. In Normoxie wird HIF-1 hydroxyliert, durch das Hippel-Lindau-Tumor-Suppressor-Protein gebunden und somit zum proteosomalen Abbau markiert. Unter hypoxischen Bedingungen ist die Hydroxylierung gehemmt, was zu einer Stabilisierung des Proteins und nachfolgend zur Transkription HIF-regulierter Gene führt⁶⁶.

In einer bioinformatischen Suche nach Bindestellen von HIF-1, den sogenannten *hypoxic response elements* (HRE), wurde der murine Promotor nach der Sequenz „cacgtgg“ und der humanen Promotor nach „tacgtggg“ abgesucht. Es wurde je eine solche Erkennungssequenz im murinen (Abbildung 18A) und humanen (Abbildung 18B) AMD-1-Promotor gefunden.

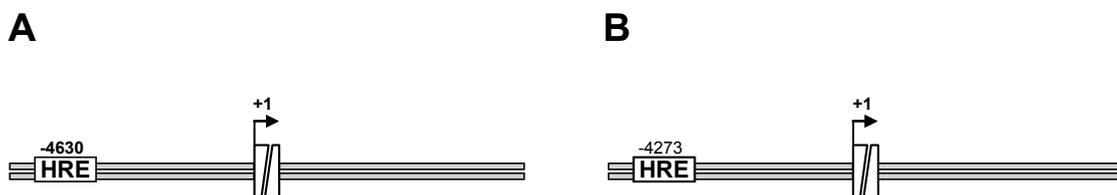


Abbildung 18: Untersuchung des AMD-1-Promotors auf HRE-Bindestellen

Der AMD-1-Promotor wurde auf *hypoxic response elements* (HRE) untersucht. Im A) murinen Promotor wurde die Sequenz „cacgtgg“ und B) im humanen Promotor „tacgtggg“ verwendet. Die Bindestellen werden durch die HRE-Boxen gekennzeichnet.

Um zu untersuchen ob Hypoxie durch einen direkten Effekt (z.B. über HIF-1) auf glatte Muskelzellen die AMD-1-Expression hochregulieren kann, wurden isolierte murine sowie humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen für 24 Stunden hypoxisch (1 % O₂) exponiert. Hierbei zeigten sich keine Effekte in der AMD-1-Expression zu den entsprechenden normoxischen Kontrollen, weder in murinen (Abbildung 19A) noch in humanen Zellen (Abbildung 19B).

Ebenso führte der *Knockdown* von Hif-1 α in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zu keiner veränderten AMD-1-Expression (Abbildung 19C).

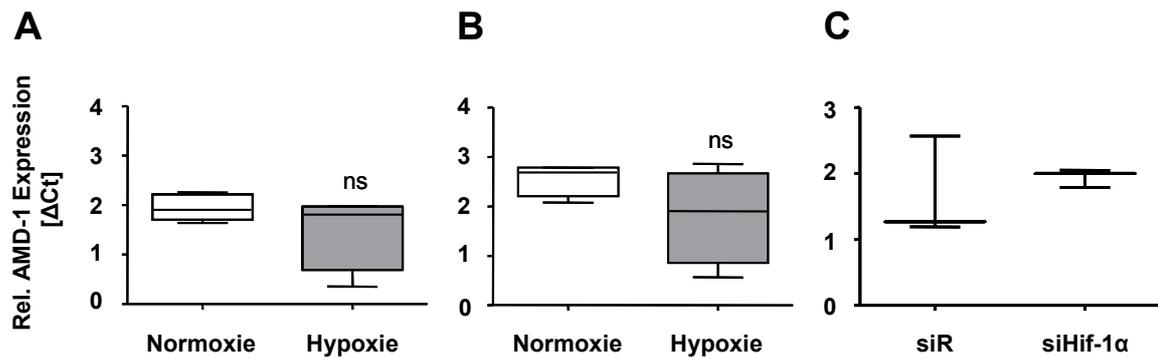


Abbildung 19: Abhängigkeit der AMD-1-Hochregulation von HIF

A) Die relative AMD-1-mRNA-Expression wurde durch q-PCR in A) murinen und B) humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen quantifiziert, die jeweils für 24 Stunden hypoxisch (1 % O₂) oder normoxisch inkubiert wurden. Die Werte ergeben sich aus je n = 4 individuellen Experimenten und wurden auf die B2M-Expression normalisiert. *Signifikante Unterschiede verglichen zur normoxischen Kontrollgruppe. C) Relative mRNA Expression nach *Knockdown* von HIF-1α verglichen zur siR-Gruppe. Die Werte wurden aus n = 3 individuellen Experimenten gewonnen und auf B2M normalisiert. *Signifikante Unterschiede verglichen zu siR.

3.11 Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die AMD-1-mRNA-Expression

Neben der Aktivierung von HIF führt Hypoxie auch zur Induktion von verschiedenen Wachstumsfaktoren, die ihrerseits die Transkription einer Vielzahl von Genen induzieren oder inhibieren können⁵¹.

Um die Mechanismen aufzudecken, die der gesteigerten Expression von AMD-1 unter hypoxischer Exposition zu Grunde liegen, wurden humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren bis zu 24 Stunden stimuliert.

Nach PDGF-BB-Stimulation ergab sich über die untersuchte Zeitspanne keine veränderte AMD-1-mRNA-Expression (Abbildung 20A). Die Applikation von TGF-β1 führte zu einer konstanten, aber nicht zeitabhängigen Hochregulation über den untersuchten Zeitraum (Abbildung 20B). Der stärkste und zeitabhängige Anstieg war nach Zugabe von EGF mit einem Maximum nach 6 Stunden zu verzeichnen (Abbildung 20C).

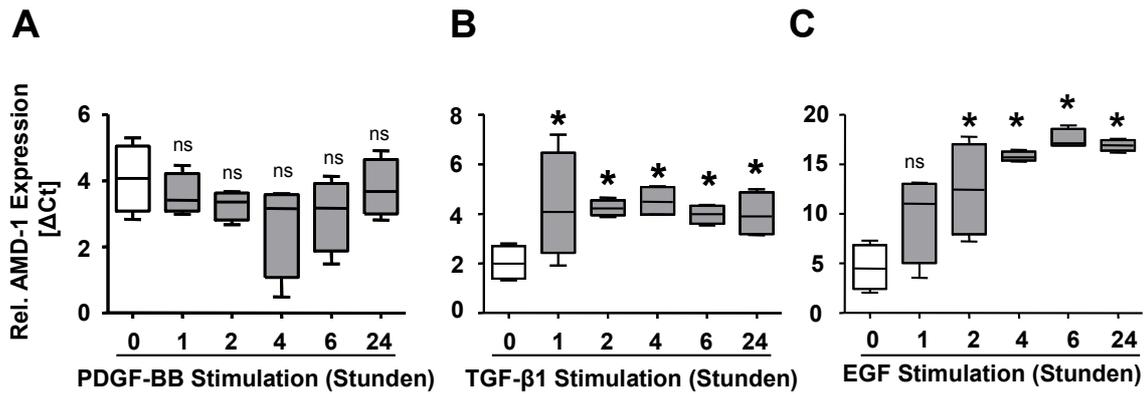


Abbildung 20: AMD-1-mRNA-Expression nach Inkubation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB, TGF- β 1 oder EGF

Relative AMD-1-mRNA-Expression in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach Stimulation mit A) PDGF-BB (5 ng / ml), B) TGF- β 1 (2 ng / ml) und C) EGF (50 ng / ml) für die angegebenen Zeitpunkte wurde die relative AMD-1-Expression per q-PCR analysiert und mit nicht stimulierten Kontrollen verglichen. Die Werte wurden aus je n=4 individuellen Experimenten gewonnen und auf die B2M-Expression normalisiert. *Signifikante Unterschiede verglichen zu nicht stimulierten Zellen.

3.12 Regulation der AMD-1-Expression durch EGF-Stimulation

Weiterführend wurde untersucht, durch welchen Transkriptionsfaktor das Signal von EGF zur vermehrten Transkription von AMD-1 vermittelt wird. Es ist bekannt, dass EGF verschiedene Transkriptionsfaktoren induzieren kann, darunter auch das *Early Growth Response Protein 1* (Egr1)¹²⁵⁻¹²⁷. Unter Verwendung eines automatisierten computergestützten Programms, wurde die Promotorregion des humanen AMD-1-Gens nach möglichen Egr1-Konsensus-Sequenzen überprüft. Hierbei wurde eine mögliche Bindestelle mit der Sequenz „cgctcccgc“ in der Position - 386 vor dem Transkriptionsstart detektiert (Abbildung 21).



Abbildung 21: Untersuchung des humanen AMD-1-Promotors auf Egr1-Bindestellen

Bioinformatische Analyse des humanen AMD-1 Promotors auf Egr1-Bindestellen mit der Sequenz cgctcccgc. Die potentielle Bindestelle wird durch die Egr1-Box gekennzeichnet.

Um zu untersuchen, ob EGF die Transkription sowie Translation von Egr1 induziert, wurde die Egr1-Expression nach Gabe von EGF in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen untersucht. Auf mRNA- (Abbildung 22A) und Proteinebene (Abbildung 22B) zeigte sich eine erhöhte Egr1-Expression nach EGF-Applikation. Das Maximum der Expression lag bei einer Stunde nach Stimulation (Abbildung 22A,B).

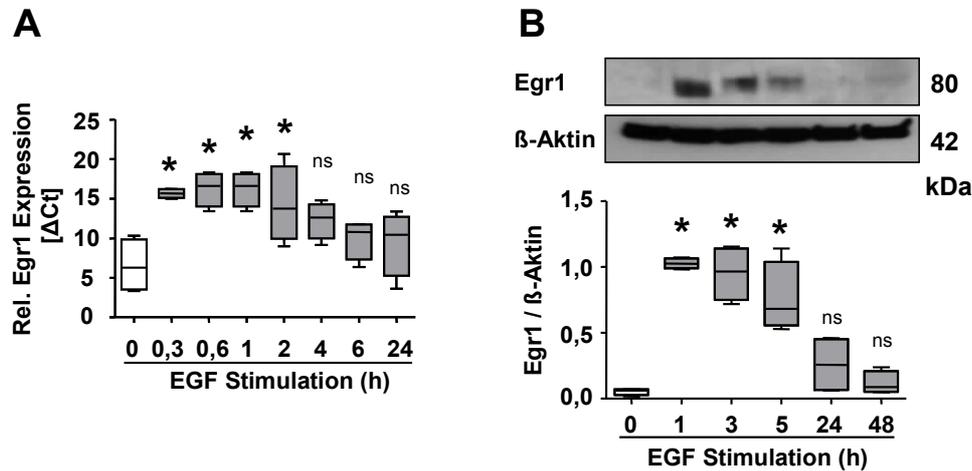


Abbildung 22: Auswirkung von EGF auf die Expression von Egr1

A) Die relative Egr1-Expression auf mRNA-Ebene wurde mittels q-PCR nach Stimulation von humanen pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen mit EGF (50 ng/ml) bestimmt und auf die B2M-Expression bezogen. Die Werte wurden aus n = 4 individuellen Experimenten gewonnen. *Signifikante Unterschiede verglichen zu nicht stimulierten Zellen. B) Egr1-Expression auf Proteinebene nach EGF-Stimulation (50 ng/ml). Die Proteinexpression wurde durch Western Blot Analyse bestimmt und auf β-Aktin normalisiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt ein repräsentatives von n = 4 individuellen Experimenten. *Signifikante Unterschiede verglichen zu nicht stimulierten Zellen.

Zur Detektion einer möglichen Interaktion von Egr1 mit dem AMD-1-Promotor wurde ein *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) auf Nuklearextrakten von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen durchgeführt. Durch einen EMSA können Interaktionen zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen wie z.B. zwischen Transkriptionsfaktoren und deren Bindestellen in bestimmten Promotoren aufgedeckt werden. Hierfür werden Nuklearextrakte mit einer Sonde inkubiert, die die Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors im gewünschten Promotor enthält. Bindet der entsprechende Transkriptionsfaktor an seine Erkennungssequenz, so wird diese Interaktion durch eine Retention des entstandenen Komplexes in der anschließenden Gelelektrophorese deutlich.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Bindung von Egr1 an seine Konsensussequenz im

AMD-1-Promotor aufgezeigt werden (Abbildung 23A, Reihe 2), die durch vorherige EGF-Stimulation der Zellen noch verstärkt wurde (Abbildung 23A, Reihe 4). Die Spezifität der Komplexe aus DNA und Protein wurde durch Verdrängungsreaktionen mit einem 100-fachen Überschuss einer unmarkierten Sonde (*Cold Competitor*) belegt (Abbildung 23A, Reihen 3 und 5).

Diese Interaktion konnte durch einen Chromatin-Immunopräzipitations(ChIP)-Assay bestätigt werden. Bei der ChIP handelt es sich ebenfalls um eine Nachweismethode für Interaktionen zwischen DNA und DNA-bindenden Proteinen. Hierbei werden zunächst die in der Zelle vorliegenden Bindungen zwischen Proteinen und Chromatin fixiert und anschließend mit Hilfe eines Antikörpers gegen das gewünschte Protein/den Transkriptionsfaktor präzipitiert. Nach Fragmentierung und Isolierung der so gewonnenen DNA wurde mittels PCR untersucht, ob auf diese Weise die entsprechende Sequenz des gewünschten Promotors amplifiziert werden konnte.

Durch Verwendung von Primern, die die Egr1-Bindestelle im AMD-1-Promotor flankieren, konnte ein PCR-Produkt sowohl in der nicht präzipitierten Kontrolle (*Input*) (Abbildung 23B, Reihe 2) als auch im immunopräzipitierten Chromatin nach EGF-Stimulation detektiert werden (Abbildung 23B, Reihe 4). Ein nicht-immunogener IgG-Antikörper diente als Negativkontrolle (Abbildung 23B, Reihe 5).

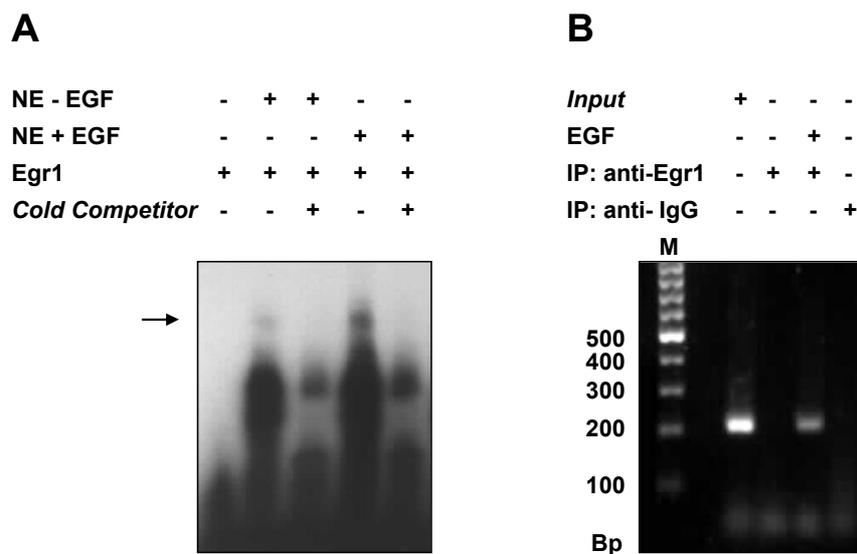


Abbildung 23: Untersuchung einer möglichen Interaktion von Egr1 mit dem AMD-1-Promotor nach EGF-Stimulation

A) Die Interaktion von AMD-1 und Egr1 nach EGF-Stimulation wurde durch *Electrophoretic Mobility Shift*

Assay (EMSA) gezeigt. Nuklearextrakte wurden aus humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen gewonnen, die mit EGF (50 ng/ml) stimuliert wurden. Die Nuklearextrakte wurden mit einer Sonde, die die Egr1-Konsensus-Sequenz im AMD-1-Promotor beinhaltet, inkubiert. Als Negativkontrollen dienten Nuklearextrakte, die mit unmarkierten Sonden (*Cold Competitor*) präinkubiert wurden. Ein repräsentatives aus $n = 6$ individuellen Experimenten ist gezeigt. B) Analyse der Interaktion mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Nuklearextrakte aus humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen wurden mit einem Egr1 oder einem nicht immunogenen Antikörper (IgG) nach Stimulation mit EGF (50 ng/ml) präzipitiert. Ein repräsentatives aus $n = 4$ individuellen Experimenten ist gezeigt. (M = Marker, Bp = Basenpaare).

3.13 Aufklärung der AMD-1 vorgeschalteten Signalkaskade

In der Literatur gibt es vielfältige Belege dafür, dass EGF Egr1-Spiegel über den Erk1/2-Signaltransduktionsweg erhöht^{126, 127}. Erk1/2 steht für *extracellular-signal-regulated kinases* und gehört zu den Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen, MAPK), die durch mehrere aufeinanderfolgende Kinasen charakterisiert sind. Die Aktivierung dieser Kinasen erfolgt durch Phosphorylierung. MAPK-Signaltransduktionswege können durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren aktiviert werden und regulieren eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen wie Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung¹²⁸.

Um zu überprüfen, ob Erk1/2 eine Rolle für erhöhte Egr1-Spiegel nach EGF-Gabe in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen spielt, wurde die Phosphorylierung von Erk1/2 in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen nach EGF-Applikation ermittelt.

EGF induzierte eine zeitabhängige, erhöhte Erk1/2-Phosphorylierung mit einem Maximum das bei 10 Minuten nach Stimulation lag (Abbildung 24A). Dieser Anstieg (Abbildung 24B, Reihe 2) konnte durch vorherige Applikation des Erk1/2-Inhibitors U0126 (Abbildung 24B, Reihe 3) unterbunden werden. Darüber hinaus verhinderte die Gabe von U0126 auch den EGF-abhängigen Anstieg in der Egr1-Proteinexpression (Abbildung 24C, Reihe 2 und 3).

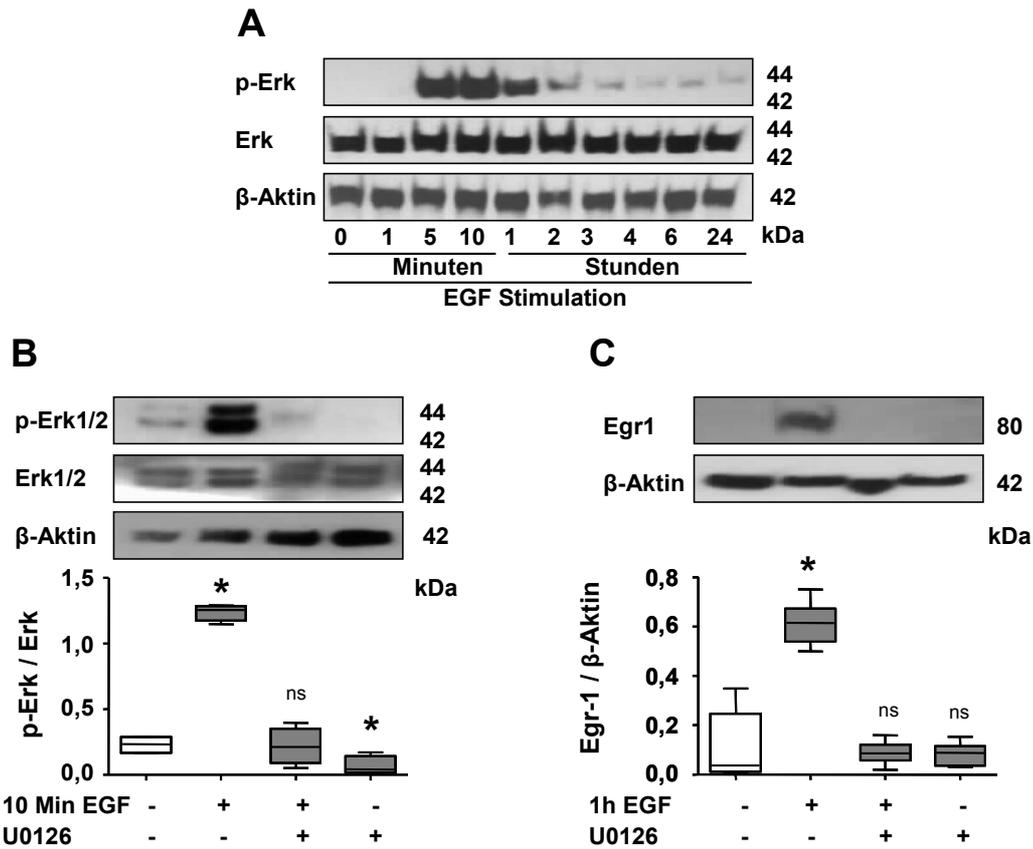


Abbildung 24: Die Auswirkung von EGF auf die Expression von Erk1/2 und Egr1

A) Erk1/2-Phosphorylierung nach EGF-Applikation (50 ng/ml) in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Die Analyse erfolgte im Zeitverlauf mittels Western Blot. β -Aktin diente als Ladekontrolle. B) Erk1/2-Phosphorylierung nach EGF-Applikation (10 Minuten, 50 ng/ml) in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen in Gegenwart des Erk1/2-Inhibitors U0126 (10 μ M). n = 4 individuelle Experimente. Die Daten wurden auf totales Erk1/2 normalisiert. C) Egr1-Proteinexpression nach EGF-Applikation (eine Stunde (1h), 50 ng/ml) in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen in Gegenwart des Erk1/2-Inhibitors U0126 (10 μ M). n = 6 individuelle Experimente. Die Daten wurden auf β -Aktin normalisiert. *Signifikante Unterschiede zu nicht stimulierten Zellen.

Eine q-PCR Analyse pulmonalarterieller glatter Muskelzellen von *Egr1*^{-/-}-*Knockout*-Mäusen ergab eine unveränderte AMD-1-Expression nach EGF-Gabe, während PSMCs von Wildtyp-Mäusen eine verstärkte Expression aufwiesen (Abbildung 25A). Gleichzeitig resultierte nur in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen von Wildtyp-Mäusen die Gabe von EGF in einer verstärkten Proliferation (Abbildung 25B).

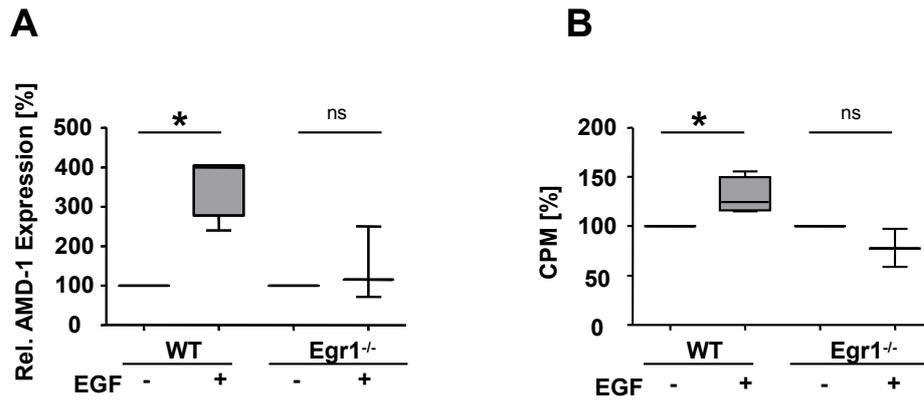


Abbildung 25: Der Einfluss von EGF auf die AMD-1-Expression und Proliferation in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen von $Egr1^{-/-}$ -Mäusen

A) AMD-1-mRNA-Expression in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen von Wildtyp(WT)- oder $Egr1^{-/-}$ -Mäusen nach vierstündiger EGF-Stimulation (50 ng/ml). Die Analyse erfolgte mittels q-PCR. $n = 3 - 4$ Tiere pro Gruppe. Die Werte wurden zur unstimulierten Kontrolle in Bezug gesetzt und auf B2M normalisiert. B) Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen von Wildtyp- oder $Egr1^{-/-}$ -Mäusen nach vierstündiger EGF-Stimulation (50 ng/ml). Die Analyse erfolgte mittels Thymidin-Inkorporationsassay. $n = 3 - 4$ Tieren pro Gruppe. *Signifikante Unterschiede verglichen mit nicht stimulierten Zellen.

3.14 Auswirkung einer verminderten AMD-1-Expression auf nachgeschaltete Signaltransduktionswege

Im Folgenden wurde untersucht, auf welche Weise eine erhöhte AMD-1-Expression an der Entstehung der PH beteiligt sein könnte. Rao *et al.* demonstrierten, dass Polyamine für die Expression der Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) erforderlich sind¹²⁹. PLC- γ 1 ist ein Schlüsselprotein des PI-Signalsystems und des Inositolphosphatmetabolismus. Diese beiden Signaltransduktionswege traten bereits in der cDNA-Microarray-Analyse als stark reguliert auf (Abbildung 5B).

Um aufzuklären, ob AMD-1 die Aktivität von PLC- γ 1 beeinflusst, wurde der Phosphorylierungsgrad von PLC- γ 1 nach siRNA Transfektion gegen AMD-1 in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (Abbildung 26A) ermittelt. Die verminderte AMD-1-Expression führte hier zu einer verminderten PLC- γ 1-Phosphorylierung. Ebenso zeigte sich im Lungenhomogenat von AMD-1^{+/-}-Mäusen nach chronisch hypoxischer Exposition (Abbildung 26B) eine erniedrigte PLC- γ 1-Phosphorylierung.

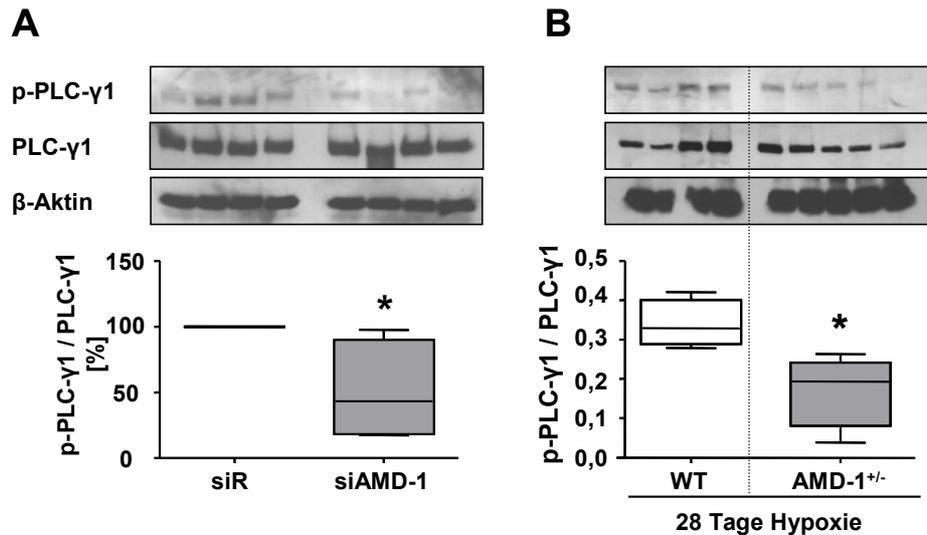


Abbildung 26: Einfluss von AMD-1 auf die Phosphorylierung von PLC- γ 1

A) PLC- γ 1-Phosphorylierung nach *Knockdown* von AMD-1 in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Die Daten wurden auf totales PLC- γ 1 normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. n = 4 individuelle Experimente. *Signifikante Unterschiede zum siR. B) PLC- γ 1-Phosphorylierung nach *Knockdown* von AMD-1 in Lungenhomogenat von Wildtyp(WT)- und AMD-1^{+/-}-Mäusen nach chronisch hypoxischer Exposition (28 Tage, 10 % O₂). Die Daten wurden auf totales PLC- γ 1 normalisiert. β -Aktin diente als Ladekontrolle. n = 4 – 5 Tiere pro Gruppe. *Signifikante Unterschiede zum Wildtypen.

Zur Verifizierung der möglichen Signaltransduktionskette wurde anschließend der Einfluss von EGF auf die Phosphorylierung von PLC- γ 1 untersucht. Im Western Blot zeigt sich, dass eine EGF-Applikation über 24 Stunden zu einer erhöhten Phosphorylierung führte (Abbildung 27, Reihe 2). Dieser Effekt konnte durch vorherige Applikation eines Erk1/2-Inhibitors (U0126) oder eines PLC-Inhibitors (U73122) aufgehoben werden (Abbildung 27, Reihen 3 und 4).

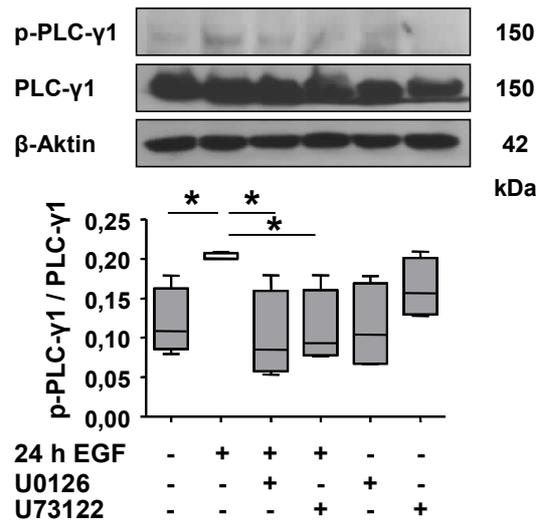


Abbildung 27: EGF-Applikation induziert die Aktivierung von PLC-γ1

Western Blot Analyse der PLC-γ1 Phosphorylierung in Anwesenheit des Erk1/2-Inhibitors U0126 (10 μM) oder des PLC-Inhibitors U73122 (3 μM). Die Werte wurden aus n = 4 individuellen Experimenten gewonnen und zu totalem PLC-γ1 normalisiert. *Signifikante Unterschiede zur induzierten Gruppe. β-Aktin ist als Ladekontrolle gezeigt.

4 Diskussion

4.1 Auswahl des Tiermodells

In der vorliegenden Arbeit wurde das Maus-Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie (PH) verwendet. In diesem Modell wird durch chronische Hypoxie (10 % O₂) ein Anstieg im pulmonalarteriellen Druck sowie ein struktureller Umbau der pulmonalen Gefäße erzeugt, welches in einer anhaltenden Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands und einer gesteigerten Rechtsherzhypertrophie resultiert⁵⁴.

Hypoxie ist selbst ein natürlicher Stimulus der PH und führt zu ähnlichen pulmonalvaskulären Veränderungen wie sie in Patienten der Gruppe 3 der aktuellen Klassifikation zu finden sind (siehe Punkt 1.2.1). Im Gegensatz dazu stellt das Monocrotalin(MCT)-Modell eine künstliche und toxische Simulation der Erkrankung dar, in der neben Verletzungen in der Lunge, auch unerwünschte akute bis subakute Schäden an Niere, Leber und Herz auftreten⁵⁴.

Das Modell der Hypoxie-induzierten PH ist sehr gut prognostizierbar und innerhalb einer Spezies/eines Stammes überaus reproduzierbar⁵⁴. Die chronische Hypoxie führt in fast allen Säugetieren zu ähnlichen strukturellen Veränderungen⁵⁴. Beachtet werden muss jedoch die starke Varianz der Suszeptibilität zwischen verschiedenen Tierarten, so zeigen Lämmer keinen Anstieg im pulmonalarteriellen Druck (*pulmonary arterial pressure* – PAP) durch chronisch hypoxische Exposition¹³⁰, Mäuse reagieren verhältnismäßig schwach⁹⁹ und Kälber relativ stark auf einen chronisch verminderten pO₂⁵⁴. Auch Alter⁶⁴ und Geschlecht^{131, 132} sind maßgeblich für die Ausprägung der Symptome verantwortlich. Eine Adaptation an geringere Sauerstoffzufuhr ist allerdings auch bewiesen. So zeigen Yaks im Gegensatz zu Rindern keinen signifikant erhöhten PAP in großen Höhen. Auch eine Kreuzung von Kühen und Yaks führte zu einem protektiven Phänotyp was auf einen autosomal-dominanten Erbgang schließen lässt¹³³. Ebenso haben sich Hochlandvölker, wie z.B. die tibetische Bevölkerung, durch den Aufenthalt in großen Höhen über viele Generationen an das geringe Sauerstoffangebot angepasst, was sich in außergewöhnlich niedrigen Werten im PAP und im pulmonalen Widerstand bemerkbar macht¹³⁴.

Generell ist aber anzumerken, dass durch MCT-Applikation in der Ratte eine schwerere PH als durch Hypoxie induziert wird. Diese ist mit den Stadien 3 und 4 der NYHA-

Klassifikation (siehe Tabelle 1) vergleichbar⁴⁹ und führt nach sechs bis acht Wochen zum Tod durch Rechtsherzversagen⁹⁵. Hypoxie verursacht dagegen nur einen mäßigen Grad an Gefäßumbauprozessen⁹⁹ und somit eine schwache Form der PH; diese ist vergleichbar mit dem Stadium 2 in der NYHA-Klassifikation⁴⁹.

Der Aspekt, dass die Hypoxie-induzierte PH im Tiermodell durch Reoxygenierung reversibel ist¹⁰⁰⁻¹⁰⁴, muss kritisch betrachtet werden, da dies nicht dem progredienten und meist tödlichen Verlauf der humanen Erkrankung entspricht⁵⁴. Hierbei ist aber zu beachten, dass auch bei Menschen, die eine reine Hypoxie-induzierte PH in der Höhe entwickeln, eine deutliche Verbesserung durch Rückkehr auf Meereshöhe eintritt⁵⁴. Dennoch erlaubt dieses Modell gerade durch den Punkt der Reversibilität Einblicke in die Mechanismen zu nehmen, die an der Umkehrung der Gefäßumbauprozesse beteiligt sind. Durch die Identifizierung und Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die dieser Umkehrung zu Grunde liegen, könnten Angriffspunkte gefunden werden, durch die diese lebensbedrohliche Erkrankung nicht nur wie bisher symptomatisch sondern auch kausal und kurativ behandelt werden könnte. Da gerade die Ergründung der Faktoren, die diesem Gesundungsprozess zu Grunde liegen das Ziel der vorliegenden Arbeit ist und kein anderes Tiermodell der PH reversibel ist, kann diese Fragestellung nur im Tiermodell der Hypoxie-induzierten PH untersucht werden.

Ein großer Vorteil in der Verwendung von Mäusen in dieser Arbeit liegt in der vollständigen Sequenzierung des Mäuse-Genoms. Durch gezielte Manipulation im Erbgut können Modellorganismen geschaffen werden, in denen das gewünschte Gen z.B. nicht, nur teilweise oder vermehrt exprimiert wird, wodurch wichtige Erkenntnisse über dessen Funktion gewonnen werden können. Auch konnten trotz der großen Diskrepanz zum humanen Organismus z.B. in Anatomie und im Metabolismus, schon einige erfolgreiche Therapiekonzepte auch basierend auf Ergebnissen aus dem Modellorganismus Maus auf den Menschen übertragen werden. So stammt z.B. die heute etablierte Verwendung von Sildenafil in der Behandlung der PH aus der Forschung der Hypoxie-induzierten PH am Tier¹³⁵.

4.2 Auswahl eines Kandidatengens aus den reversiblen Gefäßumbauprozessen der Hypoxie-induzierten PH

Die Reversibilität der Hypoxie-induzierten PH¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ konnte durch Untersuchungen in dem Labor, in dem auch die vorliegende Doktorarbeit angefertigt wurde, bestätigt werden¹²¹. In dieser der eigenen Arbeit vorangegangenen Studie konnte ein signifikanter Abfall im rechtsventrikulären systolischen Druck (*right ventricular systolic pressure* – RVSP), dem Muskularisierungsgrad der kleinen, normalerweise nichtmuskularisierten Gefäße sowie in der Rechtsherzhypertrophie nach normoxischer Reexposition chronisch hypoxischer Mäuse gezeigt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erlaubte die Bestimmung der veränderten Genexpression dieser Tiere nun Gene zu identifizieren, die im Zeitverlauf der reversiblen Gefäßumbauprozesse reguliert sind und somit einen Einfluss auf die Rückbildung des Gefäßumbaus haben könnten.

Die Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit zu mehreren Zeitpunkten während der Umkehr der Gefäßveränderungen betrachtet, um so ein besseres Verständnis über den Gefäßumbauprozess zu gewinnen. Die Analyse erfolgte im Zeitverlauf um die Aussagekraft der Ergebnisse zu erhöhen. Eine konsistente Regulation eines so ermittelten Kandidatengens erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass dieses eine wichtige Rolle in der Revertierung des Gefäßumbaus innehaben könnte. Wäre stattdessen nur ein willkürlicher Zeitpunkt gewählt worden, könnte dies zur Fehlinterpretation der Daten führen. So war z.B. der Chemokin-Rezeptor 2 (Cr2) nach Reoxygenierung zunächst vermindert exprimiert, am dritten Tag der normoxischen Reexposition zeigte sich keine Regulation im Vergleich zu chronisch hypoxischen Tieren und im weiteren Zeitverlauf war er stark erhöht. Wäre nur ein willkürlich gewählter Zeitpunkt untersucht worden, könnten sich folglich drei verschiedene Interpretationsmöglichkeiten für die Rolle dieses Gens im Umkehrprozess der Gefäßveränderungen ergeben.

Die Verwendung von *cDNA-Microarrays* in der vorliegenden Arbeit erlaubt eine genomweite Untersuchung zur differentiellen Genexpression im Zeitverlauf der Reoxygenierung nach vorheriger chronisch hypoxischer Exposition. Durch dieses Verfahren besteht die Möglichkeit die Expression tausender von Genen simultan zu beurteilen¹³⁶. *cDNA-Microarrays* können zur Identifikation prognostischer Marker für bestimmte Krankheiten herangezogen werden und Aufschluss über ganze Gensätze geben, die unter den untersuchten Bedingungen differentiell exprimiert sind¹³⁷. Als weitere

Vorteile dieser Methode sind die vergleichsweise geringen Probenmengen, die zur Durchführung benötigte, relativ kurze Zeit und der verhältnismäßig geringe Arbeitsaufwand zu nennen.

Andererseits ist die Verwendung von *cDNA-Microarrays* aber auch enorm kostspielig und die Ergebnisse sind extrem abhängig von der Reinheit der RNA¹³⁷. Mit der Generierung enormer Datenmassen steigt ebenfalls das Risiko, falschpositive Resultate zu erlangen¹³⁸. Daher sind tiefgreifende bioinformatische Kenntnisse in der Datenerfassung, bei der Vernetzung der Ergebnisse, in der Implementierung und Erweiterung statistischer Methoden sowie bei der Auswertung der Ergebnisse unabdingbar, um eine solche Menge an Daten in verlässliche und interpretierbare biologische Informationen umzuwandeln^{136, 138}. Darüberhinaus empfiehlt es sich, eine Verifizierung der Ergebnisse auf mRNA-Ebene durch q-PCR sowie auf Proteinebene mittels Western Blot durchzuführen¹³⁸. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Verwendung einer kapillarelektrophoretischen Testung sichergestellt, dass die verwendete RNA eine hohe Reinheit besaß. Zur Gewährleistung der sorgfältigen und verlässlichen Auswertung der *cDNA-Microarrays* erfolgte die Analyse der Daten durch den erfahrenen Statistiker Dr. Jochen Wilhelm. Das Expressionsprofil des so gefundenen Kandidatengens AMD-1 wurde des Weiteren an Hand randomisierter Proben auf mRNA-Ebene durch q-PCR bestätigt. Die Bestimmung der Proteinexpression konnte nicht durchgeführt werden, da die zur Verfügung stehenden Antikörper eine geringe Spezifität aufweisen.

In den in dieser Arbeit vorliegenden *cDNA-Microarray*-Untersuchungen zeigten sich Veränderungen in mehreren Signaltransduktionswegen, von denen einige bereits in der Pathogenese der PH bekannt sind. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Calcium- oder MAPKinase-Signaltransduktionswege, Zellzyklus oder Apoptose^{28, 111, 139}. Dies bestätigt die Validität der Methode, da Veränderungen in Zellzyklus-Regulation und der Zellproliferation eine wichtige Rolle in den Hypoxie-induzierten Gefäßumbauprozessen spielen und zu einer Verdickung der Gefäßwand führen^{51, 140}. Diese Regulation konnte in der vorliegenden Arbeit an Hand von q-PCR-, Western Blot-Analysen und immunhistochemischen Färbungen bestätigt werden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Hypoxie-induzierte erhöhte Expression des Antigens Ki67 (Ki67) und des nuklearen Antigens proliferierender Zellen (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* - PCNA) durch anschließende Reoxygenierung wieder erniedrigt wurde.

Ki67 und PCNA sind beide aus der Literatur als Proliferationsmarker bekannt^{141, 142}.

PCNA ist ein auxiliäres Protein der DNA-Polymerase δ ¹⁴² und wird vor allem in der G1- und S-Phase verstärkt exprimiert¹⁴³. Es konnte gezeigt werden, dass PCNA sowohl eine Rolle bei der DNA-Replikation spielt als auch in der Reparatur von Zellschäden¹⁴⁴. Des Weiteren eignet sich Ki67 sehr gut als Proliferationsmarker, da Ki67 nicht in ruhenden Zellen präsent ist, aber in proliferierenden Zellen universal exprimiert wird¹⁴⁵. Das Antigen ist während der Interphase im Nukleus detektierbar, während es in der Mitose vor allem auf der Oberfläche der Chromosomen zu finden ist¹⁴¹. So konnte z.B. in einer Metaanalyse eine Korrelation von Ki67 mit einem frühen Brustkrebsstadium aufgezeigt werden¹⁴⁶.

Neben der Veränderung in Signaltransduktionswegen, zeigten sich in den Versuchen zur differentiellen Expression nach Reoxygenierung auch Veränderungen in der Expression von einzelnen Genen, die mit der Entstehung der PH in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählen Elastin, Kollagene oder der natriuretische Peptidrezeptor 3 (NPR3)¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Als eines der am stärksten runterregulierten Gene in dieser Studie zeigte sich die S-Adenosylmethionin-decarboxylase 1 (AMD-1). AMD-1 katalysiert die Decarboxylierung von S-Adenosylmethionin und ist eins der beiden geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme in der Polyaminsynthese⁸⁹. Auf Basis der cDNA-*Microarray*-Daten wurde AMD-1 als Kandidat zur Untersuchung der vaskulären Umbauprozesse und ihrer Reversibilität und den damit einhergehenden Mechanismen ausgewählt.

Die Auswahl erfolgte aus folgenden Gründen:

1. AMD-1 war eins der am stärksten erniedrigten Gene zu allen untersuchten Zeitpunkten der Reoxygenierung nach chronischer Hypoxie, sowie stark hochreguliert während hypoxischer Exposition;
2. wie bereits gezeigt wurde, besitzt AMD-1 eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung¹²⁴;
3. AMD-1 wurde in Verbindung mit der Progression von hochproliferativen Erkrankungen wie verschiedenen Krebsformen gebracht¹⁵⁰⁻¹⁵² und
4. schließlich wurde AMD-1 eine Rolle in der Geweberegeneration zugesprochen^{150, 153}.

4.3 Polyamine

Wie bereits genannt stellt AMD-1 eins der beiden geschwindigkeitsbestimmenden

Enzymen der Polyaminbiosynthese dar⁸⁹. Polyamine sind niedermolekulare, organische Verbindungen, die durch primäre und sekundäre Aminogruppen charakterisiert sind. Diese liegen unter physiologischen Bedingungen protoniert vor¹⁵⁴. Erstmals wurden sie 1678 von Antonie van Leeuwenhoek¹⁵⁵ in der menschlichen Samenflüssigkeit beschrieben, die Aufklärung der chemischen Struktur erfolgte 1924¹⁵⁶.

Ihre physiologische Konzentration liegt im millimolaren Bereich, der freie Anteil ist aber durch ionische Bindung an anionische Verbindungen wie DNA, RNA, Proteine und Phospholipide deutlich geringer¹⁵². Polyamine sind essentiell für alle Zellen von Säugetieren. Sie besitzen eine regulatorische Funktion in hochproliferativen Prozessen wie in der Embryonalentwicklung¹²⁴, bei der Progression von Krebswachstum^{150, 151} und in der Wundheilung^{150, 153}. Sie werden für ein optimales Zellwachstum benötigt: So sind die Enzyme der Polyaminsynthese in der Embryonalentwicklung, der Leber und in verschiedenen Krebsformen stark exprimiert, wogegen sie in alternden Zellen und in vielen adulten Geweben erniedrigt sind¹⁵³. Ist die Polyaminsynthese durch Mutation oder Inhibitoren verhindert, so muss zumindest ein Polyamin substituiert werden, um ein kontinuierliches Überleben der Zellen zu sichern¹⁵⁵. Mit wachsender Evidenz wird eine Polyamin-Inhibition mit verringerten Raten im Zellwachstum, der Angiogenese und der Expression von Genen in Verbindung gebracht, die die Tumorerkrankung regulieren¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. Eine erhöhte Polyamin-Konzentration im Urin korreliert dagegen sehr gut mit der Progression von Tumorerkrankungen¹⁶¹. Diese bedeutende Rolle von Polyaminen in der Regulation von proliferativen Prozessen, welche ein wichtiges Charakteristikum der vaskulären Umbauprozesse in der PH darstellen⁴⁰, lässt daher auf eine mögliche Beteiligung von Polyaminen und ihren Schlüsselenzymen in der Signalweiterleitung von PH-induzierenden Stimuli wie z.B. der Hypoxie auf die pulmonale Strombahn schließen.

Neben der Rolle für die Zellproliferation und die Angiogenese besitzen Polyamine auch eine regulatorische Funktion im induzierten Zelltod. Diese ist bivalent: So wirkt Spermin in unphysiologisch hohen Konzentrationen toxisch auf BHK-Zellen (*baby hamster kidney cells*)¹⁶² und induziert Apoptose in U937-Zellen über die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien¹⁶³. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Polyamine eine experimentell-induzierte Apoptose in Kleinhirnneuronen der Ratte¹⁶⁴ sowie in verschiedenen Krebszelllinien¹⁶⁵ inhibieren. Diese antiapoptotischen Funktionen könnten durch die Rolle der Polyamine in der DNA-Stabilisation, dem Schutz der DNA vor oxidativem Stress, sowie durch Inhibition von Endonukleasen erklärt werden¹⁵⁴. Da neben

der erhöhten Proliferation auch eine verminderte Apoptose von Zellen der Gefäßwand in der PH bekannt ist⁹, könnten Polyamine und ihre Schlüsselenzyme also auch durch ihr antiapoptotisches Potential zur Etablierung und Manifestierung der PH beitragen.

4.3.1 Polyaminbiosynthese

Polyamine können auf verschiedenen Wegen in die Zelle gelangen. Sie können über die Nahrung aufgenommen oder durch Bakterien im Darm gebildet werden¹⁵⁵. Der größte Teil entsteht aber durch Biosynthese in der Zelle selbst, ausgehend von der Aminosäure Arginin¹⁵⁵. Durch enzymatische Umsetzung entsteht Ornithin, welches durch die Ornithindecaboxylase 1 (ODC-1) unter Abspaltung von CO₂ in die Polyaminvorstufe Putrescin umgewandelt wird. Die Synthese der Polyamine Spermidin und Spermin erfolgt durch Anlagerung von Aminopropylgruppen durch die Transferasen Spermidin- und Spermin-Synthase¹⁵². Diese sind konstitutiv exprimiert und werden vor allem durch die Verfügbarkeit ihrer Substrate reguliert¹⁵². Die Aminopropylgruppen stammen von decarboxyliertem S-Adenosylmethionin (d-SAM), welches durch das Enzym S-Adenosylmethionin-decarboxylase-1 (AMD-1) gebildet wird (Abbildung 28). ODC-1 und AMD-1 sind induzierbare Enzyme und stellen somit die Schlüsselenzyme im Polyaminaufbau dar.

4.3.2 Polyaminabbau

Polyamine können katabolisiert und anschließend über den Urin ausgeschieden werden. Zu diesem Zweck werden sie über die Spermidin/Spermin-N¹-acetyltransferase (SSAT) in N¹-Acetylspermidin bzw. -sperimidin umgewandelt und können als solche aus der Zelle exportiert werden¹⁵². Die Acetylgruppe stammt von Acetylcoenzym A. Andererseits können die acetylierten Polyamine auch durch die N¹-Acetylpolyaminoxidase (APAO) in Spermidin oder Putrescin sowie 3-Aceto-aminopropanal und Wasserstoffperoxid umgewandelt werden¹⁶⁶ und bleiben somit dem Polyaminpool der Zelle erhalten. Die Umwandlung von Spermin zu Spermidin kann auch in einem Schritt über die Sperminoxidase (SMO) erfolgen. Hierbei entstehen ebenfalls 3-Aceto-aminopropanal und

Wasserstoffperoxid als Nebenprodukte¹⁵².

ODC-1 und AMD-1 besitzen eine sehr kurze Halbwertszeit (ODC-1 10 - 30 Minuten¹⁵², AMD-1 um eine Stunde¹⁶⁷) und werden über das 26S Proteasom abgebaut¹⁵². AMD-1 wird hierbei zunächst ubiquitinyliert¹⁵², ODC-1 dagegen wird über den endogenen Inhibitor Antizym zum proteasomalen Abbau markiert¹⁶⁸.

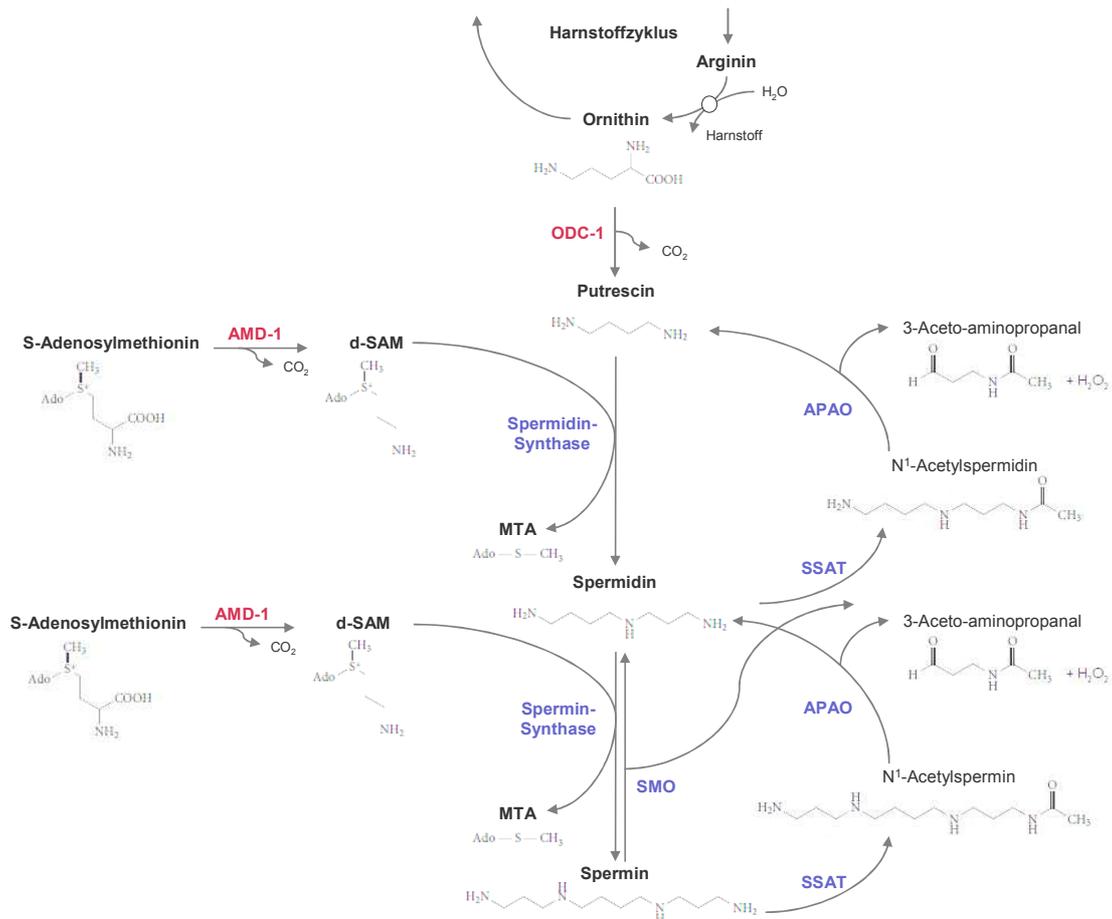


Abbildung 28: Polyaminbiosynthese

Ausgehend von Ornithin aus dem Harnstoffzyklus wird über die Ornithindecarboxylase (ODC-1) Putrescin gebildet. Die S-Adenosylmethionindecarboxylase 1 (AMD-1) induziert die Abspaltung von CO₂ von S-Adenosylmethionin (SAM), wodurch decarboxyliertes S-Adenosylmethionin (d-SAM) entsteht. Die Transferasen Spermidin- und Spermin-Synthasen übertragen anschließend eine Aminopropylgruppe von d-SAM auf Putrescin bzw. Spermidin, wodurch Spermidin bzw. Spermin und 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin (MTA) entstehen. Der Abbau der Polyamine erfolgt durch Acetylierung über Spermidin/Spermin-N1-acetyltransferasen (SSAT), wodurch ein acetyliertes Abbauprodukt entsteht, welches aus der Zelle exportiert werden kann. Andererseits kann dieses Produkt auch durch die N¹-Acetylpolyaminoxidase (APAO) in das

jeweils vorgeschaltete Polyamin, 3-Aceto-aminopropanal und H₂O₂ umgesetzt werden. Die Bildung von Spermidin aus Spermin kann auch in einem Schritt über die Sperminoxidase (SMO) erfolgen, hierbei entstehen ebenfalls 3-Aceto-aminopropanal und H₂O₂. (Ado = Adenosyl). Aus Casero *et al.*¹⁵², modifiziert.

4.4 Charakterisierung von AMD-1 in der Hypoxie-induzierten PH

Wie bereits gezeigt wurde, spielen Polyamine eine bedeutende Rolle in der Zellproliferation^{150, 151, 153}. Da die Zellproliferation ein wichtiges Charakteristikum der Hypoxie-induzierten PH darstellt⁴⁰, lässt sich eine mögliche regulatorische Funktion der Polyamine und ihrer Schlüsselenzyme auf das pulmonale Gefäßsystem unter hypoxischen Bedingungen ableiten.

Mittels q-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von AMD-1 unter chronischer Hypoxie in murinen Gefäßen der Lunge, dem Ort der pulmonalvaskulären Umbauprozesse^{23, 51}, erhöht war. Im Gegensatz zu pulmonalen Gefäßen, reagierten systemische Arterien auf hypoxische Exposition nicht mit einer erhöhten Expression von AMD-1. Dies zeigt die Spezifität der Regulation für die pulmonale Strombahn. Des Weiteren wurde AMD-1 auch in Gefäßen von IPAH-Patienten stärker exprimiert als in denen von gesunden Donoren, welches eine potentielle Translation der Daten aus dem Tiermodell auf die humane Erkrankung nahelegt.

Im Einklang mit dieser Annahme konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine hypoxische Exposition *in vivo* zu einer gesteigerten Expression von AMD-1 im Mauslungenhomogenat führte. Ebenso wurden bereits eine signifikant erhöhte AMD-1-Aktivität in chronisch hypoxischen Rattenlungen¹⁶⁹ sowie deutliche Anstiege in der ODC-1- und AMD-1-Aktivität nach der Applikation von Monocrotalin nachgewiesen¹⁷⁰. Darüberhinaus wurden auch erhöhte Polyaminspiegel unter hypoxischen Bedingungen in der Rattenlunge gefunden^{169, 171}. Die Applikation des ODC-1-Inhibitors α -Difluormethylornithin (DFMO) verhinderte die MCT-induzierte PH¹⁷² und führte zur partiellen Reversion der MCT-induzierten PH, wenn die Applikation nach Etablierung der Erkrankung erfolgte¹⁷². Nichtsdestotrotz liegt bis heute kein direkter molekularer Beweis *in vivo* vor, der die Relevanz der polyaminsynthetisierenden Enzyme ODC-1 und AMD-1 in der Entstehung oder Regression der PH bestätigt.

Die eigenen Daten konnten zeigen, dass AMD-1 in der Mauslunge überwiegend in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen exprimiert wird, den mutmaßlichen Effektorzellen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion²²⁻²⁴ (HPV, siehe Punkt 1.1.2). Des Weiteren spielt die Hypertrophie der glatten Muskelschicht auch eine wichtige Rolle in den Gefäßumbauprozessen der Lunge, wie z.B. in der Verdickung der Gefäßwand und der Neomuskularisierung (Pulmonalvaskuläre Umbauprozesse, siehe Punkt 1.3). Dies ist ein weiteres Argument für eine mögliche Beteiligung von AMD-1 an pulmonalen Gefäßumbauprozessen bei PH.

Zur Bestimmung der Lokalisation wurde eine nicht-isotopische *in situ* Hybridisierung (NISH) anstatt einer üblichen immunhistochemischen Methode verwendet, da die kommerziell erhältlichen Antikörper gegen AMD-1 ein hohes Maß an unspezifischen Reaktionen aufwiesen und sonst keine immunhistochemischen Untersuchungen angewendet werden konnten.

Um die Rolle von AMD-1 in der Hypoxie-induzierten PH *in vivo* zu untersuchen, wurden *Knockout*-Tiere chronischer Hypoxie ausgesetzt. Da AMD-1^{-/-} ebenso wie ODC-1^{-/-}-Mäuse in der frühen Embryonalentwicklung sterben^{124, 173}, wurden in dieser Arbeit heterozygote Tiere eingesetzt. Bisher ist kein Phänotyp in AMD-1^{+/-}-Tieren bekannt. Sie werden als normal, fruchtbar und lebensfähig beschrieben¹²⁴.

Verglichen zu Wildtyp-Mäusen war die Hypoxie-induzierte PH in AMD-1^{+/-}-Tieren weniger stark ausgeprägt. Dies zeigte sich durch signifikant niedrigere Werte im RVSP, in der Rechtsherzhypertrophie sowie im Muskularisierungsgrad der kleinen pulmonalen Gefäße. Gleichzeitig führte eine verminderte AMD-1-Expression zu einer erniedrigten Proliferation und einer erhöhten Apoptose. Die präzise Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen ist sehr wichtig für die Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität der pulmonalen Gefäße⁷. Eine therapeutische Intervention an diesem in der PH gestörten Gleichgewicht, durch Inhibition der Zellproliferation oder Induktion der Apoptose in der Gefäßwand umgebauter Pulmonalarterien, konnte in Tierexperimenten eine bereits etablierte PH wieder aufheben⁹⁰. Eine Inhibition von AMD-1 könnte demnach auch zu einer Revertierung der Erkrankung führen.

Im Gegensatz zu AMD-1 zeigte sich in der mRNA-Expression des zweiten geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Polyaminsynthese - ODC-1 - keine

Veränderung im Mauslungenhomogenat nach chronisch hypoxischer Exposition. Auch in isolierten humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zeigten sich konstante ODC-1-Spiegel nach hypoxischer Inkubation, in murinen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen fielen diese sogar ab. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurden bereits eine erniedrigte ODC-1-Expression in hypoxisch exponierten bovinen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen¹⁷⁴ sowie eine verminderte ODC-1 Aktivität in chronisch hypoxischen Rattenlungen gezeigt¹⁶⁹. Dagegen wurde in einer anderen Studie ein positiver Einfluss der präventiven ODC-1-Inhibition während chronisch hypoxischer Exposition von Ratten durch einen verringerten PAP und die Abnahme der medialen Gefäßdicke festgestellt. Die Rechtsherzhypertrophie wurde jedoch durch eine Inhibition von ODC-1 nicht beeinflusst^{89, 175}. In der vorliegenden Arbeit konnte dagegen kein präventiver Phänotyp von ODC-1^{+/-}-Mäusen bei chronisch hypoxischer Exposition ermittelt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein solcher Phänotyp in homozygoten *Knockout*-Tieren auftreten könnte, hier aber durch eine funktionelle Kopie des Gens überdeckt wurde. Um dies zu überprüfen, könnten in weitergehenden Studien induzierbare ODC-1-*Knockout*-Mäuse oder ein spezifischer Inhibitor verwendet werden. Unabhängig von der Rolle von ODC-1 lässt sich aus den eigenen Daten ableiten, dass AMD-1, zumindest in der murinen Lunge, ein Schlüsselenzym des Polyaminstoffwechsels ist, welches an den Hypoxie-induzierten Umbauprozessen der Lungengefäße beteiligt ist.

4.5 Aufklärung des Upstream-Signaltransduktionsweges von AMD-1 im Hypoxiemodell

Interessanterweise wurde die AMD-1-mRNA-Expression weder in isolierten murinen noch humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen durch einen direkten Effekt von Hypoxie (z.B. durch den Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 – HIF-1) auf diese Zellen beeinflusst. Dies bestätigt erneut, dass die Hypoxie-induzierten Gefäßumbauprozesse in der pulmonalen Zirkulation einen sehr komplexen Prozess darstellen, in dem viele interaktive Vorgänge zwischen verschiedenen Zelltypen, deren Differenzierung sowie die Freisetzung von Wachstumsfaktoren stattfinden^{64, 176, 177}.

Hypoxie führt neben der Induktion von HIF-1 auch zur verstärkten Expression von anderen Wachstumsfaktoren, die ihrerseits in die Regulation einer Vielzahl von Genen eingreifen

können. So werden in der Literatur z.B. PDGF, TGF- β 1 und EGF als Hypoxie-induzierbare Wachstumsfaktoren beschrieben und als Einflussgrößen in der Pathogenese der tierexperimentellen und humanen PH diskutiert^{48, 65, 89, 178-180}. Diese wirken stimulierend auf die Proliferation von glatten Muskelzellen nach Freisetzung z.B. aus adventitiellen Fibroblasten¹⁷⁶ oder Endothelzellen¹⁸¹. Diese Wachstumsfaktoren können auch die AMD-1-Spiegel in verschiedenen Zelltypen verändern^{182, 183}. Dennoch ist wenig über die Regulation der AMD-1-Expression in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen bekannt. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Wachstumsfaktoren PDGF und EGF die AMD-1-Expression in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen erhöhen. Der stärkste Anstieg wurde hierbei nach EGF-Gabe beobachtet.

In diesem Kontext ist bekannt, dass das multifunktionale Zytokin EGF unter hypoxischen Bedingungen verstärkt gebildet wird¹⁸⁴ und dass Hypoxie die Ausbildung einer PH induzieren kann^{42, 48}. Somit ergibt sich hier also ein möglicher Zusammenhang zwischen erhöhten EGF-Spiegeln in Hypoxie, der darausfolgenden erhöhten Expression von AMD-1 und der Etablierung einer PH. EGF induziert neben anderen Liganden wie z.B. TGF- α , Amphiregulin, heparin-bindendes EGF (HB-EGF) und Betacellulin¹⁸⁵, die Dimerisierung, intrazelluläre Phosphorylierung und somit die Aktivierung des EGF-Rezeptors¹⁸⁶. Dieser gehört zur ErbB-Familie, eine Gruppe von vier strukturell verwandten Rezeptortyrosinkinasen¹⁸⁷. Eine Deletion des EGF-Rezeptors im Mausmodell führt zu schweren Anomalien in der Entwicklung von Haut, Niere, Gehirn, Leber und im Gastrointestinaltrakt und abhängig vom genetischen Hintergrund innerhalb von drei Wochen zum Tode¹⁸⁸. Eine Überexpression des EGF-Rezeptors ist dagegen aus verschiedenen Krebsarten bekannt und wird mit einer schlechten Prognose und einer geringen Überlebensrate in Verbindung gebracht^{189, 190}. Ebenso wird eine erhöhte EGF-Expression mit weiteren pro-proliferativen Erkrankungen assoziiert, so wird EGF in kardialer und pulmonaler Fibrose verstärkt gebildet^{191, 192} und konnte in Lungenbiopsien von Patienten mit angeborenen Herzfehlern in der Neointima nachgewiesen werden¹⁹³. Eine Blockade des EGF-Rezeptors steigerte das Überleben im Tiermodell der MCT-induzierten PH⁸⁸. Eine Applikation von humanem rekombinantem EGF in Ratten führten zu ähnlichen strukturellen Veränderungen der Gefäße, wie sie vier Wochen nach MCT-Applikation zu finden sind. In beiden Fällen sind auch erhöhte Spiegel von Polyaminen messbar¹⁹⁴.

EGF kann eine Reihe von Mediatoren induzieren, darunter auch den Transkriptionsfaktor Egr1¹²⁵⁻¹²⁷ welcher im Gegenzug aber auch die Expression von EGF verstärken kann^{195, 196}.

Somit wird letztendlich eine positive *Feedback*-Schleife erzeugt, die zur Progression der PH beitragen könnte. Egr1 kann ebenso wie EGF auch durch Hypoxie induziert werden¹⁹⁶ und wird in verschiedenen humanen Tumoren überexprimiert^{197, 198}. Ebenso wie EGF, spielt auch Egr1 eine wichtige Rolle in der Zellproliferation. So wird die Proliferation von pulmonalvaskulären Zellen durch Zigarettenrauch über die Aktivierung von Egr1 gesteuert¹⁹⁹. Darüber hinaus ist die Egr1-Expression während der Entwicklung der Neointima in der Scher-Stress-assoziierten PH erhöht²⁰⁰. Es wurde bereits gezeigt, dass EGF die Expression von Egr1 über den Erk1/2-Signaltransduktionsweg beeinflussen kann^{126, 127}. Erk1/2 ist die Abkürzung für *extracellular-signal-regulated kinases* und gehört zu den Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-Kinasen, MAPK), die durch mehrere aufeinanderfolgende Kinasen gekennzeichnet sind. Diese werden durch Phosphorylierung aktiviert. MAPK-Signaltransduktionswege können durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren aktiviert werden und regulieren eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen wie Proliferation, Apoptose und Zelldifferenzierung¹²⁸.

In diesem Kontext konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der stimulierende Effekt von EGF auf die Egr1-Expression auch in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen durch Erk1/2 vermittelt wird, was durch erniedrigte Egr1-Spiegel nach Inhibition von Erk1/2 demonstriert wurde. Die Aktivierung des Erk1/2-Signaltransduktionswegs spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen²⁰¹ und eine Fehlregulation der MAP-Kinasen ist im Zusammenhang mit der PH bekannt²⁰². So ist eine Aktivierung der MAP-Kinasen durch Hypoxie in der Mauslunge²⁰³ sowie in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen aus Ratte und Mensch nachgewiesen²⁰⁴. Darüber hinaus wird eine überschießende Erk1/2-Signalweiterleitung in der vererbaren PAH vermutet²⁰¹.

Eine computergestützte Promotoranalyse des humanen AMD-1-Gens in der eigenen Arbeit konnte die Existenz einer Egr1-Bindestelle mit der Sequenz „cgtccccgc“ in der Position -386 vor dem Transkriptionsstart zeigen. Diese wurde von Nishimura *et al.* bereits in einer allgemeinen Charakterisierung des AMD-1-Promotors beschrieben²⁰⁵. Diese Bindestelle ist bis auf die Änderung in einem Nukleotid im Genom von Maus, Ratte und Mensch konserviert²⁰⁵. Die Funktionalität dieser hypothetischen Egr1-Erkennungssequenz wurde aber bis heute weder *in vivo* noch *in vitro* bewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels ChIP- und EMSA-Experimenten gezeigt werden, dass Egr1 mit dem AMD-1-Promotor in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen interagiert. Des Weiteren wurde hier ermittelt, dass diese Interaktion zwischen Egr1 und AMD-1 durch EGF-

Applikation noch potenziert wird. Somit wurde hier erstmals eine Signalkaskade in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen aufgezeigt, die ausgehend von EGF über Erk1/2 und Egr1 zu einer verstärkten Expression von AMD-1 führt. Da bei der ChIP-Methode die Fixierung der Komplexe aus Proteinen und DNA in lebenden Zellen erfolgt, wird angenommen, dass die so gewonnenen Ergebnisse auch der Situation *in vivo* entsprechen.

4.6 Aufklärung des Downstream-Signaltransduktionsweges von AMD-1 im Hypoxiemodell

Um den molekularen Mechanismus der EGF-Erk1/2-Egr1-AMD-1-Signalkaskade in der PH zu untersuchen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Zielstrukturen von AMD-1 analysiert. Da in der eigenen *Microarray*-Studie das Phosphatidylinositol-(PI)-Signalsystem und der Inositolphosphatmetabolismus als stark reguliert auftraten, wurde die mögliche Expression von Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) in diesem Zusammenhang untersucht. Die PLC- γ 1 ist ein Schlüsselprotein des PI-Signalsystems und des Inositolphosphatmetabolismus. Die Aktivierung der PLC- γ 1 erfolgt durch Phosphorylierung, diese kann unter anderem durch Polyamine induziert werden¹²⁹. Phosphoryliertes PLC- γ 1 induziert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃)²⁰⁶. IP₃ wird in das Zytosol abgegeben und führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern²⁰⁷. Eine erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration wiederum vermittelt (hypoxische) pulmonale Vasokonstriktion und Gefäßumbauprozesse und ist somit an der Ausbildung einer PH beteiligt³⁴. DAG dagegen induziert einen nicht selektiven Kationeninflux durch rezeptor-aktivierte Kanäle (*receptor-operated channels*, ROC) wie z.B. durch den *transient receptor potential channel 6* (TRPC6)¹⁹. Eine vermehrte Expression von TRPC6 konnte in Lungen und isolierten glatten Muskelzellen von IPAH-Patienten nachgewiesen werden²⁰⁸ und eine Deletion des Rezeptors resultiert in der kompletten Abwesenheit der akuten Phase der HPV¹⁹. Darüberhinaus fungiert DAG als Aktivator der Proteinkinase C (PKC)²⁰⁹, die eine wichtige regulatorische Rolle in vielen zellulären Prozessen wie Migration, Apoptose, Tumorgenese sowie Zellwachstum und – differenzierung spielt^{210, 211}. Vor diesem Hintergrund ist interessant, dass in der

vorliegenden Arbeit eine verminderte AMD-1-Expression in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen mittels RNA-Interferenz sowie in hypoxischen *Knockout*-Tieren zu einer signifikant erniedrigten Phosphorylierung von PLC- γ 1 führte.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass AMD-1 eine bedeutende, evtl. sogar eine Schlüsselrolle im Prozess der Hypoxie-induzierten pulmonalen Gefäßumbauprozesse und somit der Hypoxie-induzierten PH spielen könnte. Die eigenen Daten werden von vorangehenden Studien gestützt, die zeigen konnten, dass unter hypoxischer Exposition von Ratten eine erhöhte Polyaminkonzentration auftrat^{169, 171} und dass durch pharmakologische Inhibition von ODC-1 ebenfalls in Ratten zumindest eine teilweise Verminderung der Symptome der Hypoxie-induzierten Gefäßumbauprozesse und der PH herbeigeführt werden konnte¹⁷⁴.

Dies ist jedoch die erste Untersuchung, die die Rolle von AMD-1 in der Pathogenese der PH durch Aufklärung der Regulationskaskade zeigt, und darüber hinaus Informationen zur Funktion der Polyamin-Familie in der PH liefert. Auf Basis der eigenen Daten kann postuliert werden, dass eine pharmakologische Inhibition von AMD-1 zur Prävention von zumindest Hypoxie-induzierter PH führen sollte.

4.7 Fazit

In dieser Arbeit konnte eine veränderte AMD-1-Genexpression in Hypoxie-induzierten pulmonalen Gefäßumbauprozessen sowie in deren Umkehr durch Reoxygenierung gezeigt werden. Darüber hinaus stärken die Lokalisation von AMD-1 in pulmonalen Gefäßen und die schwächer ausgeprägte PH in AMD-1^{+/-}-Mäusen die Hypothese, dass AMD-1 eine wichtige Funktion in der PH-Pathogenese und –Revertierung innehat. Gleichzeitig wurde deutlich, dass AMD-1 über den EGF-Erk1/2-Egr1-Signaltransduktionsweg reguliert wird und dass AMD-1 möglicherweise über PLC- γ 1 ein wichtiger Faktor bei der Initiierung des vaskulären Umbaus ist (Abbildung 29).

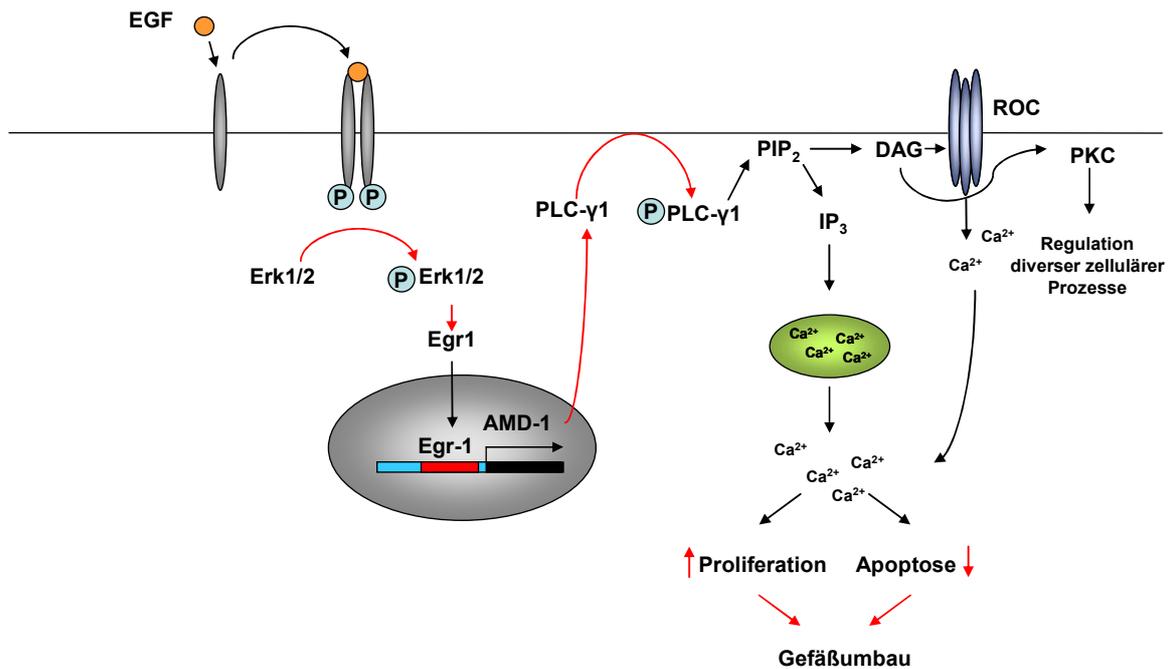


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Rolle von AMD-1 in der Pathogenese der vaskulären Umbauprozesse in der Hypoxie-induzierten PH

Hypoxische Exposition führt zu einer erhöhten Expression von EGF. EGF wiederum aktiviert seinen Rezeptor, wodurch dieser dimerisiert und ein Homodimer bildet. Dies führt zur Phosphorylierung des intrazellulären Rezeptors und induziert die Phosphorylierung von Erk1/2. Die resultierende Induktion der Egr1-Transkription und Translation führt zu einer erhöhten Bildung von AMD-1 und sukzessiv von Polyaminen. Diese führen zu einer vermehrten Phosphorylierung von PLC- γ 1, was eine erhöhte Hydrolyse von PIP₂ zu IP₃ und DAG zur Folge hat. IP₃ führt zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. DAG aktiviert rezeptor-aktivierte Kanäle (*receptor-operated channels* (ROC)), wodurch ein Kationeninflux in die Zelle induziert wird und induziert über die Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) eine Vielzahl diverser zellulärer Prozesse. Erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel wiederum können vaskuläre Umbauprozesse wie sie in der PH vorkommen, induzieren. Die in rot dargestellten Signalwege entsprechen den Daten, die in den eigenen Untersuchungen identifiziert wurden. Die schwarzen Pfeile stellen Daten dar, die aus der Literatur bekannt sind.

Um den therapeutischen Nutzen der Inhibition der Polyaminsynthese in der Behandlung der PH zu klären, sollte in weitergehenden Untersuchungen Studien mit AMD-1-Inhibitoren vorgenommen werden. Ein solcher, möglicher spezifischer AMD-1 Inhibitor ist SAM486A. SAM486A wurde bereits in den Phasen I und II der klinischen Prüfung in anderen Einsatzgebieten getestet²¹²⁻²¹⁷. So könnte verifiziert werden, ob die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Signalwege auch zur pharmakologischen Therapie der PH eingesetzt werden könnten. Hier sollte zunächst im Tiermodell ein präventiver

Behandlungsansatz getestet werden. Bei Erfolg sollte dann untersucht werden, ob auch ein kurativer Behandlungserfolg, d.h. ein Therapiebeginn nach Erkrankung der Tiere zu einer verringerten PH führt. Der kurative Effekt könnte auch in induzierbaren *Knockout*-Mäusen untersucht werden, bei welchen das AMD-1-Gen erst nach Krankheitsentstehung ausgeschaltet wurde. Bei einem positiven Ergebnis könnten die Ergebnisse aus einer pharmakologischen Inhibitor-Studie im Rahmen einer klinischen Studie auf ihre Übertragbarkeit auf den Menschen analysiert werden.

Da AMD-1 vor allem in den pulmonalen Gefäßen, dem Ort der vaskulären Umbauprozesse^{23, 51} detektiert wurde und systemische Arterien auf hypoxische Exposition nicht mit einer erhöhten Expression von AMD-1 reagierten, lässt sich eine Spezifität der Regulation in der pulmonalen Strombahn ableiten. Mit Bezug auf eine mögliche Therapie der PH durch AMD-1-Inhibitoren könnte dies von Vorteil sein, da die Verwendung eines zielgerichteten Inhibitors gegen AMD-1 dort zu weniger unerwünschten Wirkungen führen könnte als bereits etablierte Substanzen.

Als unerwünschte Wirkungen bei systemischer Gabe des AMD-1-Inhibitors SAM486A mittels intravenöser Applikation beim Menschen sind Fatigue, Neutropenie, palmar-plantares Erythrodyästhesie-Syndrom, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhö, Obstipation²¹⁶, hämatologische Toxizität (Granulozytopenie, Thrombozytopenie, Leukopenie, Anämie), Anorexie, abnorme Leberwerte²¹², Knochenmarksdepression²¹³, Myalgie, Flushing²¹⁵, Hypotonie mit Synkopen und T-Wellen-Inversion sowie Fazialisparese²¹⁷ bekannt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass diese unerwünschten Wirkungen in Verträglichkeits- und Dosisfindungsstudien und somit bei sehr hohen Dosen beobachtet wurden. Des Weiteren könnten durch eine mögliche inhalative Anwendung bei der Behandlung der PH die zu erwartenden systemischen unerwünschten Wirkungen weiter reduziert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass *Screening*-Verfahren, wie cDNA-*Microarray*-Untersuchungen geeignet sind, potentielle Schlüsselfaktoren der PH-Pathogenese zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Die PH ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, die unbehandelt zum Tode führt. Sie ist durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck, erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand sowie die mit PH einhergehenden Gefäßumbauprozesse charakterisiert, die letztendlich zum Rechtsherzversagen führen können. Da die der Erkrankung zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht vollständig entschlüsselt sind, zielen die derzeitigen Behandlungsmöglichkeiten eher auf die Verbesserung der Symptomatik, nicht jedoch auf eine Beseitigung der eigentlichen Ursachen.

Im Modell der Hypoxie-induzierten PH der Maus führt eine normoxische Reexposition nach vollständiger Ausbildung der Erkrankung zu einer Gesundung der Versuchstiere. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Identifizierung der in diesem Heilungsprozess involvierten Gene genomweite Analysen an Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde die S-Adenosylmethionindecaboxylase 1 (AMD-1), ein Enzym der Polyaminsynthese, als ein äußerst stark regulierter Kandidat im Prozess des Revertierens der Hypoxie-induzierten PH gefunden. AMD-1 stellte einerseits eines der am stärksten erniedrigten Gene bei Reoxygenierung dar und andererseits eines der am stärksten erhöhten Gene unter chronisch hypoxischen Bedingungen.

Durch *in situ* Hybridisierung wurde die vermehrte Expression von AMD-1 unter pathophysiologischen Bedingungen einer PH sowohl bei der Maus als auch in humanem Material bestätigt. Des Weiteren zeigte sich eine Lokalisation von AMD-1 in pulmonalen Gefäßen, dem Ort der Umbauprozesse bei PH. Interessanterweise wurde AMD-1 nur in pulmonalen Gefäßen unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert und nicht in systemischen Gefäßen, was im Hinblick auf eine pharmakologische Intervention eine gewisse Selektivität für die Lunge versprechen könnte. Unter chronischer hypoxischer Exposition der heterozygoten AMD-1-*Knockout*-Tiere zeigte sich ein präventiver Phänotyp, der in Verringerung der PH resultierte. Im Gegensatz dazu zeigte eine verminderte Expression der Ornithindecaboxylase 1 (ODC-1), dem zweiten geschwindigkeitsbestimmendem Enzym der Polyaminsynthese neben AMD-1, keinen positiven Effekt auf die Hypoxie-induzierten PH.

Des Weiteren konnte diese Arbeit zeigen, dass die Hypoxie-induzierte PH durch vermehrte Proliferation von Zellen der Gefäßwand gekennzeichnet ist, die durch Reoxygenierung normalisiert wurde. Eine verminderte AMD-1-Expression sowohl *in vivo* als auch in

isolierten humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen führte zu einer verminderten Proliferation und induzierte gleichzeitig Apoptose.

Schließlich konnte in der vorliegenden Arbeit durch computergestützte Analysen und molekularbiologische Methoden der Signalweg aufgeklärt werden, der über EGF-Erk1/2-Egr1 zu einer erhöhten AMD-1-Expression unter hypoxischen Bedingungen führt. Darüberhinaus konnten die Untersuchungen zeigen, dass AMD-1 für die Phosphorylierung der Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen sowie in der Mauslunge notwendig ist. PLC- γ 1 ist ein wichtiges Signalmolekül in der Regulation der Calciumhomöostase und somit ein möglicher, wichtiger Effektor des Gefäßumbauprozesses. Zusammengefasst wurde in dieser Studie über *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass AMD-1 den Gefäßumbauprozess bei pulmonaler Hypertonie *in vivo* steuern kann und dass genomweite Studien, insbesondere im Prozess der Revertierung einer PH im chronisch hypoxischen Mausmodell geeignet sind, neue essentielle Kandidaten der PH-Pathogenese, die auch Ziel einer Therapie sein könnten, zu identifizieren.

6 Summary

PH is a life-threatening disease leading to death if untreated. This disease is characterized by an elevated pulmonary arterial pressure, pulmonary vascular remodeling and an increased pulmonary vascular resistance, ultimately leading to right heart failure. Since the underlying mechanisms of the disease are not fully understood yet, the actually available treatment strategies are rather symptomatic than targeted to resolve the cause of the disease.

In the mouse model of hypoxia-induced PH, reexposure to normoxia after full establishment of the disease induces full recovery from PH. In the present study, a genome wide screening was performed to identify genes involved this recovery process. In this analysis, s-adenosylmethionine decarboxylase 1 (AMD-1), an enzyme involved in polyamine synthesis, was found as an extremely strong regulated candidate in the reversal of hypoxia-induced PH. On the one hand, AMD-1 displayed one of the strongest downregulated genes during reoxygenation, on the other hand, AMD-1 was one of the strongest upregulated genes upon chronic hypoxic exposure.

By applying *in situ* hybridization increased AMD-1 expression was confirmed under pathophysiological conditions of PH in mice as well as in human IPAH samples. Furthermore, localization of AMD-1 was demonstrated in pulmonary vessels, the site of vascular remodeling processes in PH. Interestingly, enhanced AMD-1 expression under hypoxic conditions was only detected in pulmonary vessels in contrast to systemic vessels. This might predict at least some selectivity for the pulmonary circulation when applying pharmacological intervention.

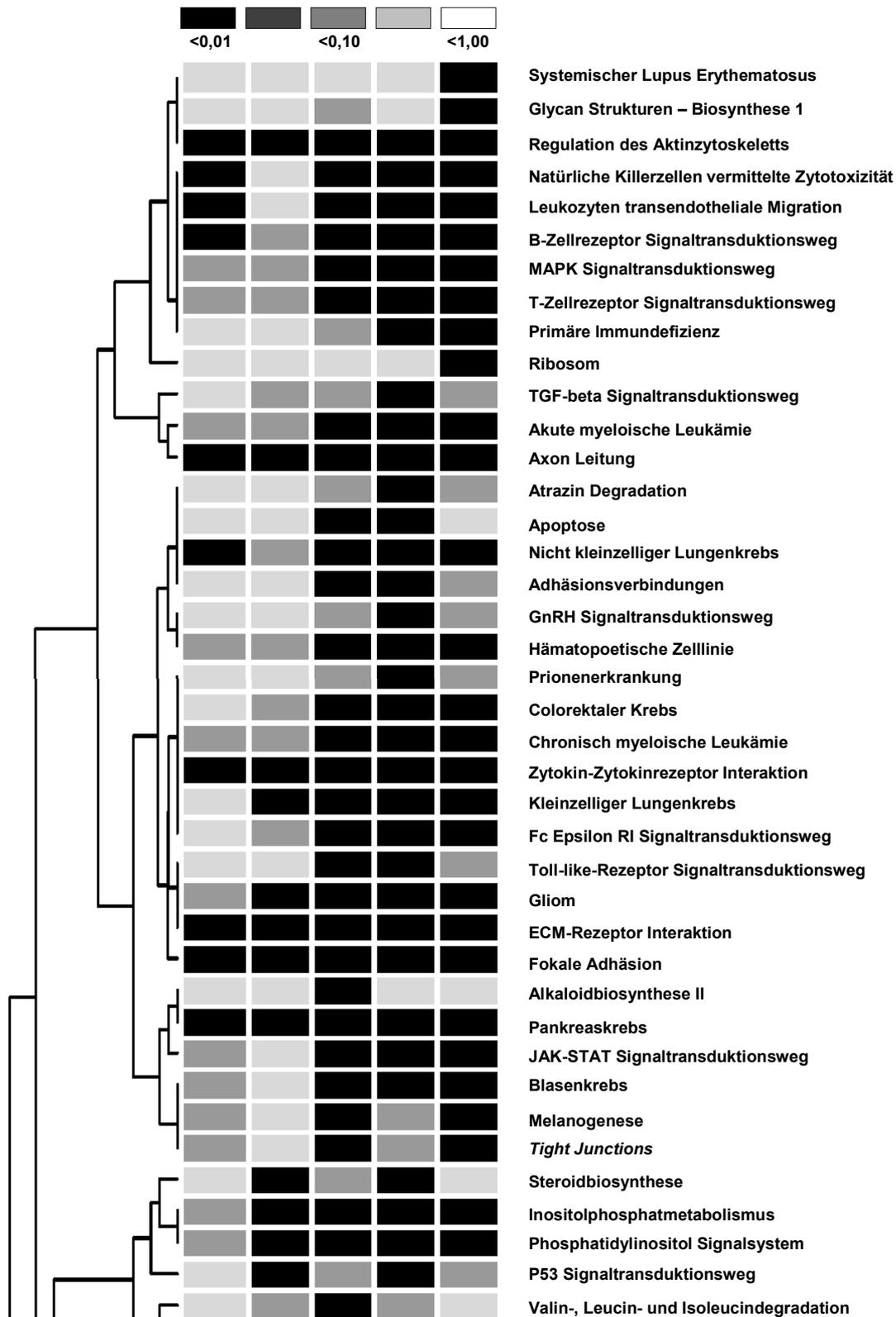
Under chronic hypoxic conditions AMD-1^{+/-} mice displayed a preventive phenotype, resulting in a reduced PH. In contrast, diminished expression of ornithine decarboxylase 1 (ODC-1), the second rate-limiting enzyme of the polyamine synthesis next to AMD-1, did not display preventive effects on hypoxia-induced PH.

Furthermore, in this study it was demonstrated that the hypoxia-induced PH was accompanied by increased proliferation of cells from the vessel wall, which was normalized by reoxygenation. Decreased AMD-1 expression *in vivo* and *in vitro* led to decreased proliferation and augmented apoptosis.

Moreover, by applying computational based analysis and molecular biological methods, a signaling cascade leading to increased AMD-1 expression under hypoxia via EGF-Erk1/2-

Egr1 was identified. Furthermore, it was verified that AMD-1 is required for the phosphorylation of phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) in hPASMCs and in the mouse lung. PLC- γ 1 is a crucial signaling molecule in the regulation of calcium homeostasis and therefore a possible essential effector of vascular remodeling processes. Taken together, it was shown by *in vivo* and *in vitro* approaches, that AMD-1 can regulate the vascular remodeling process in pulmonary hypertension *in vivo* and that genomewide studies, particularly during the process of reversal of PH in the mouse model of chronic hypoxia, are feasible to identify new, essential candidates in the pathogenesis of PH which may also can serve as a possible target for the pharmacotherapy of PH.

7 Anhang I



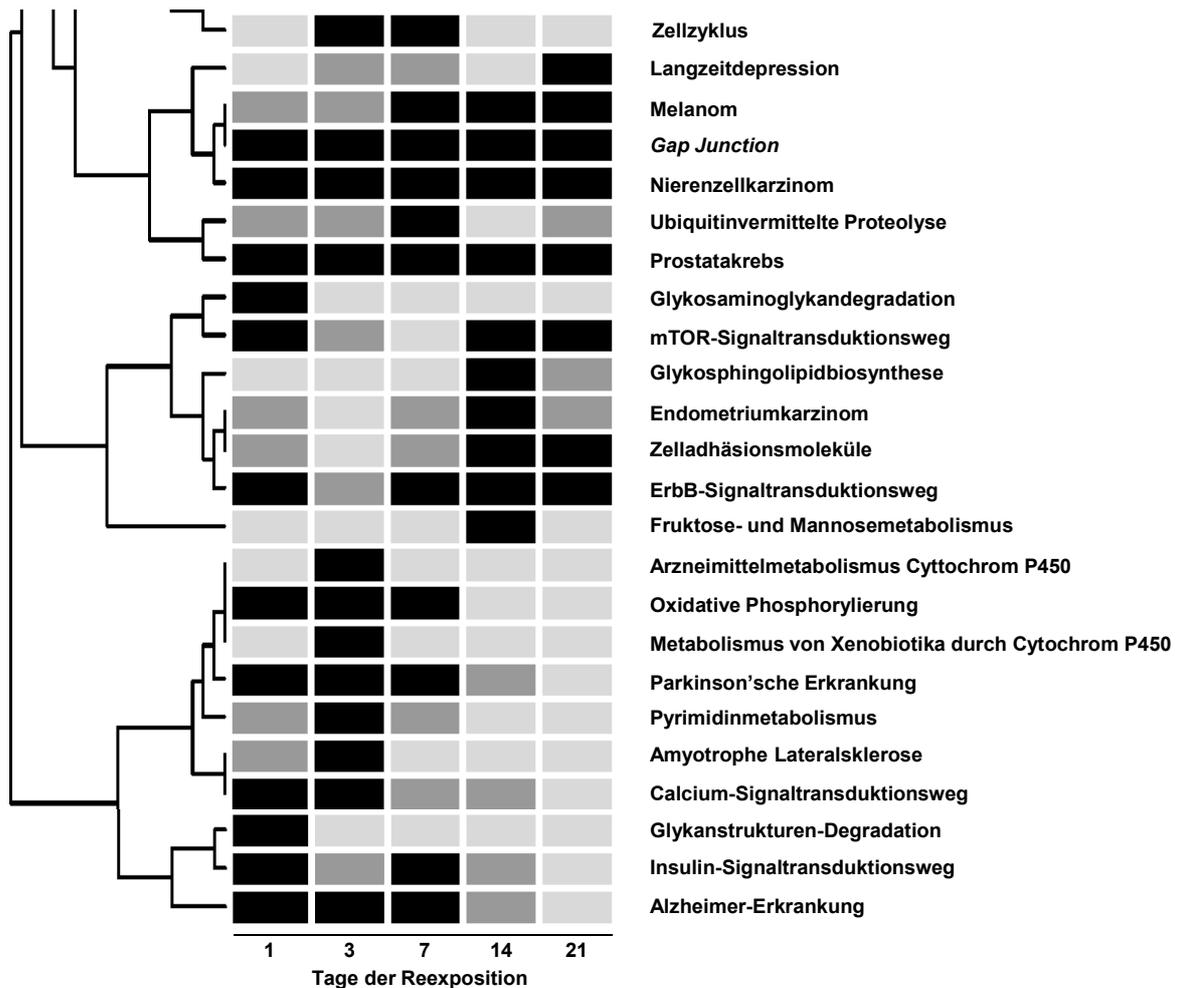


Abbildung 30: Stark regulierte Signaltransduktionswege im Zeitverlauf der Reoxygenierung nach chronisch hypoxischer Exposition

Signaltransduktionswege, die im reversiblen Gefäßumbauprozess zur hypoxischen Kontrollgruppe differentiell reguliert sind. Die Graustufen geben die p-Werte von $<0,01$ (schwarz) bis $<1,00$ (weiß) wieder. Die Daten wurden mittels cDNA-Microarray-Analyse von $n = 20$ Tieren in der Kontrollgruppe und $n = 12$ Tieren in den Behandlungsgruppen gewonnen.

8 Anhang II

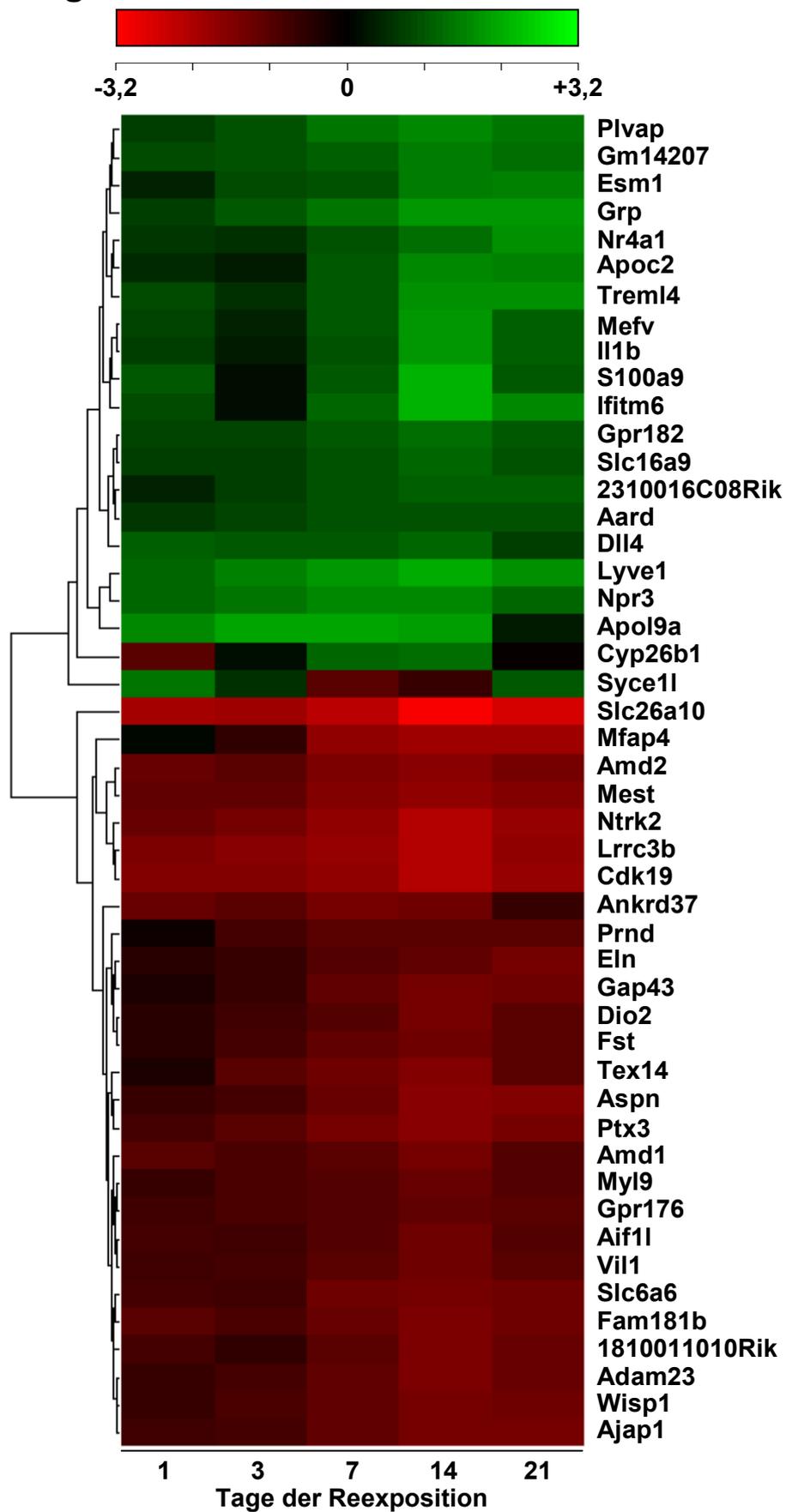


Abbildung 31: Stark regulierte Gene im Zeitverlauf der Reoxygenierung nach chronisch hypoxischer Exposition

Gene, die im reversiblen Gefäßumbauprozess in mindestens 2 Zeitpunkten um mehr als das 2-fache zur hypoxischen Kontrollgruppe differentiell reguliert sind. In grün sind Gene dargestellt, die zu dem betreffenden Zeitpunkt der normoxischen Reexposition stärker exprimiert vorliegen als in der hypoxischen Kontrollgruppe. Nicht differentiell exprimierte Gene sind in schwarz gekennzeichnet und vermindert transkripierte Gene sind in rot dargestellt. Die Daten wurden mittels cDNA-Microarray-Analyse von n = 20 Tieren in der Kontrollgruppe und n = 12 Tieren in den Behandlungsgruppen gewonnen.

9 Literaturverzeichnis

1. Campbell NA. Biologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford. 1997.
2. Brockhaus. Bibliographischen Institut & F. A. Brockhaus, Mannheim, 2006;21. Edition.
3. Mörike KD, Betz E und Mergenthaler W. Biologie des Menschen. Ein Lehrbuch der Anatomie, Physiologie und Entwicklungsgeschichte des Menschen. Quelle & Meyer, Heidelberg. 1976;9. Auflage.
4. Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York. 1994;257. Auflage.
5. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK und Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 2001;8. Auflage.
6. <http://www.lungeninformationsdienst.de/index.html>.
7. Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res*. 2004;68(2):75-103.
8. Bals R und Vogelmeier C. Lunge und Atmung. In: Siegenthaler, Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag, 2006.
9. Mandegar M, Thistlethwaite PA, Yuan JX. Molecular biology of primary pulmonary hypertension. *Cardiol Clin*. 2004;22(3):417-429, vi.
10. Weir EK, Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J*. 1995;9(2):183-189.
11. Wadsworth RM. Vasoconstrictor and vasodilator effects of hypoxia. *Trends Pharmacol Sci*. 1994;15(2):47-53.
12. Morrell NW, Wilkins MR. Genetic and molecular mechanisms of pulmonary hypertension. *Clin Med*. 2001;1(2):138-145.
13. Euler U, Liljestrand, G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*. 1946;12:301-320.
14. Weissmann N, Akkayagil E, Quanz K, Schermuly RT, Ghofrani HA, Fink L, Hanze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F. Basic features of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2004;139(2):191-202.
15. Weissmann N, Grimminger F, Walmrath D, Seeger W. Hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Respir Physiol*. 1995;100(2):159-169.

16. Peake MD, Harabin AL, Brennan NJ, Sylvester JT. Steady-state vascular responses to graded hypoxia in isolated lungs of five species. *J Appl Physiol.* 1981;51(5):1214-1219.
17. Weissmann N, Sommer N, Schermuly RT, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Oxygen sensors in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):620-629.
18. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J.* 2008;32(6):1639-1651.
19. Fuchs B, Dietrich A, Gudermann T, Kalwa H, Grimminger F, Weissmann N. The role of classical transient receptor potential channels in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Adv Exp Med Biol.* 2010;661:187-200.
20. Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(2):L314-317.
21. Stroud RC, Rahn H. Effect of O₂ and CO₂ tensions upon the resistance of pulmonary blood vessels. *Am J Physiol.* 1953;172(1):211-220.
22. Evans MA, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction--invited article. *Adv Exp Med Biol.* 2009;648:351-360.
23. Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Chest.* 1985;88(4 Suppl):240S-245S.
24. Hillier SC, Graham JA, Hanger CC, Godbey PS, Glenny RW, Wagner WW, Jr. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J Appl Physiol.* 1997;82(4):1084-1090.
25. Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature.* 1993;361(6410):315-325.
26. Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A, Evans AM. Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem.* 2001;276(14):11180-11188.
27. Ng LC, Wilson SM, Hume JR. Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative Ca²⁺ entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Physiol.* 2005;563(Pt 2):409-419.
28. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003;285(3):L740-754.

29. Robertson TP, Hague D, Aaronson PI, Ward JP. Voltage-independent calcium entry in hypoxic pulmonary vasoconstriction of intrapulmonary arteries of the rat. *J Physiol.* 2000;525 Pt 3:669-680.
30. Dipp M, Evans AM. Cyclic ADP-ribose is the primary trigger for hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat lung in situ. *Circ Res.* 2001;89(1):77-83.
31. Ward JP, Snetkov VA, Aaronson PI. Calcium, mitochondria and oxygen sensing in the pulmonary circulation. *Cell Calcium.* 2004;36(3-4):209-220.
32. Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1430-1442.
33. Wang YX, Zheng YM. Role of ROS signaling in differential hypoxic Ca²⁺ and contractile responses in pulmonary and systemic vascular smooth muscle cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;174(3):192-200.
34. Weir EK, Olschewski A. Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia. *Cardiovasc Res.* 2006;71(4):630-641.
35. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(50):19093-19098.
36. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(1 Suppl):S43-54.
37. Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, Badesch DB, Roux S, Rainisio M, Bodin F, Rubin LJ. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet.* 2001;358(9288):1119-1123.
38. Olschewski H. Dana Point: what is new in the diagnosis of pulmonary hypertension?. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008;133 Suppl 6:S180-182.
39. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J.* 2009;34(4):888-894.
40. Boutet K, Montani D, Jais X, Yaici A, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Therapeutic advances in pulmonary arterial hypertension. *Thorax.* 2008;63(4):249-265.
41. Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S. Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):40S-47S.

42. Galie N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery JL, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the 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 the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2009;30(20):2493-2537.
43. Naeije R. Pulmonary hypertension and right heart failure in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):20-22.
44. Barbera JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2003;21(5):892-905.
45. Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(16):1527-1538.
46. Chaouat A, Coulet F, Favre C, Simonneau G, Weitzenblum E, Soubrier F, Humbert M. Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2004;59(5):446-448.
47. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Morrell NW, Berg J, Manes A, McGaughan J, Pauculo M, Wheeler L. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 2001;345(5):325-334.
48. Schultz K, Fanburg BL, Beasley D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;290(6):H2528-2534.
49. Dupuis J WN. Animal models of pulmonary hypertension. In Yuan JX, Garcia JGN, West JB, Hales CA, Rich S, Archer SL, editors. Textbook of pulmonary vascular disease. New York: Springer US. 2011;184:453-458.
50. Voelkel NF, Tuder RM. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 1995;8(12):2129-2138.
51. Jeffery TK, Wanstall JC. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. 2001;92(1):1-20.
52. Dingemans KP, Wagenvoort, C. A. Pulmonary arteries and veins in experimental hypoxia. *Am J Pathol*. 1978;93:353-368.
53. Meyrick B, Reid L. Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol*. 1980;100(1):151-178.

54. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(6):L1013-1032.
55. Rounds S, Hill NS. Pulmonary hypertensive diseases. *Chest*. 1984;85(3):397-405.
56. Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2002;20(6):1559-1572.
57. Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2372-2379.
58. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(8):443-455.
59. Mecham RP, Whitehouse LA, Wrenn DS, Parks WC, Griffin GL, Senior RM, Crouch EC, Stenmark KR, Voelkel NF. Smooth muscle-mediated connective tissue remodeling in pulmonary hypertension. *Science*. 1987;237(4813):423-426.
60. Pullamsetti SS, Schermuly RT. Endothelin receptor antagonists in preclinical models of pulmonary hypertension. *Eur J Clin Invest*. 2009;39 Suppl 2:3-13.
61. Tozzi CA, Poiani GJ, Harangozo AM, Boyd CD, Riley DJ. Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium. *J Clin Invest*. 1989;84(3):1005-1012.
62. Kolpakov V, Rekhter MD, Gordon D, Wang WH, Kulik TJ. Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types. *Circ Res*. 1995;77(4):823-831.
63. Resnick N, Collins T, Atkinson W, Bonthron DT, Dewey CF, Jr., Gimbrone MA, Jr. Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(10):4591-4595.
64. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*. 2006;99(7):675-691.
65. Faller DV. Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1999;26(1):74-84.
66. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE*. 2007;2007(407):cm8.
67. Madden MC, Vender RL, Friedman M. Effect of hypoxia on prostacyclin production in cultured pulmonary artery endothelium. *Prostaglandins*. 1986;31(6):1049-1062.
68. Chen YF, Li H, Elton TS, Yang RH, Jin H, Oparil S. The role of atrial natriuretic peptide and endothelin in hypoxia induced pulmonary hypertension. *Chin J Physiol*.

- 1994;37(3):165-183.
69. Cooper AL, Beasley D. Hypoxia stimulates proliferation and interleukin-1alpha production in human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1999;277(4 Pt 2):H1326-1337.
 70. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubreau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.* 1995;99(3):249-254.
 71. Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, Fadel E, Fuhrman C, Bugnet AS, Darteville P, Housset B, Hamon M, Weitzenblum E, Adnot S. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation.* 2003;108(15):1839-1844.
 72. Eddahibi S, Hanoun N, Lanfumey L, Lesch KP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S. Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J Clin Invest.* 2000;105(11):1555-1562.
 73. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M, Adnot S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1141-1150.
 74. Shimoda LA, Sham JS, Sylvester JT. Altered pulmonary vasoreactivity in the chronically hypoxic lung. *Physiol Res.* 2000;49(5):549-560.
 75. Wort SJ, Woods M, Warner TD, Evans TW, Mitchell JA. Endogenously released endothelin-1 from human pulmonary artery smooth muscle promotes cellular proliferation: relevance to pathogenesis of pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(1):104-110.
 76. Ferri C, Bellini C, De Angelis C, De Sisti L, Perrone A, Properzi G, Santucci A. Circulating endothelin-1 concentrations in patients with chronic hypoxia. *J Clin Pathol.* 1995;48(6):519-524.
 77. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med.* 1991;114(6):464-469.
 78. Chen SJ, Chen YF, Meng QC, Durand J, Dicarolo VS, Oparil S. Endothelin-receptor antagonist bosentan prevents and reverses hypoxic pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol.* 1995;79(6):2122-2131.
 79. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1992;327(2):70-75.
 80. Cargill RI, Lipworth BJ. The role of the renin-angiotensin and natriuretic peptide systems in the pulmonary vasculature. *Br J Clin Pharmacol.* 1995;40(1):11-18.

81. Christman BW. Lipid mediator dysregulation in primary pulmonary hypertension. *Chest*. 1998;114(3 Suppl):205S-207S.
82. Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, Yuan JX. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284(2):C316-330.
83. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2811-2821.
84. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G, Emilie D. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*. 1998;11(3):554-559.
85. Dahal BK, Heuchel R, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor-beta. *Pulm Circ*. 2011;1(2):259-268.
86. Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD, Grover TR, Kinsella JP, Abman SH. Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(5):L826-833.
87. Benisty JJ, McLaughlin VV, Landzberg MJ, Rich JD, Newburger JW, Rich S, Folkman J. Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2004;126(4):1255-1261.
88. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2005;112(3):423-431.
89. Gillespie MN, Olson JW. Polyamine regulatory pathways as pharmacologic targets in pulmonary arterial hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2010;661:375-389.
90. Stenmark KR, Rabinovitch M. Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med*. 2010;11(2 Suppl):S85-90.
91. O'Callaghan DS, Savale L, Jais X, Natali D, Montani D, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Evidence for the use of combination targeted therapeutic approaches for the management of pulmonary arterial hypertension. *Respir Med*. 2010;104 Suppl 1:S74-80.
92. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111(23):3105-3111.

93. Davies RJ, Morrell NW. Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest*. 2008;134(6):1271-1277.
94. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2005;353(13):1412-1413.
95. Pak O, Janssen W, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT, Weissmann N. Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. *Drug Discov Today Dis Models*. 2010;7:89-97.
96. Meyrick BO, Perrett EA. The sequence of cellular and hemodynamic changes of chronic pulmonary hypertension induced by hypoxia and other stimuli. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(5):1486-1489.
97. Voelkel NF, Tudor RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J Clin Invest*. 2000;106(6):733-738.
98. Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD, Strassheim D, Stenmark KR. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(2):L238-250.
99. van Suylen RJ, Smits JF, Daemen MJ. Pulmonary artery remodeling differs in hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(5 Pt 1):1423-1428.
100. Herget J, Suggett AJ, Leach E, Barer GR. Resolution of pulmonary hypertension and other features induced by chronic hypoxia in rats during complete and intermittent normoxia. *Thorax*. 1978;33(4):468-473.
101. Abraham AS, Kay JM, Cole RB, Pincock AC. Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat. *Cardiovasc Res*. 1971;5(1):95-102.
102. Ressler J, Urbanova D, Widimsky J, Ostadal B, Pelouch V, Prochazka J. Reversibility of pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy induced by intermittent high altitude hypoxia in rats. *Respiration*. 1974;31(1):38-46.
103. Chassagne C, Eddahibi S, Adamy C, Rideau D, Marotte F, Dubois-Randé JL, Adnot S, Samuel JL, Teiger E. Modulation of angiotensin II receptor expression during development and regression of hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;22(3):323-332.
104. Hislop A, Reid L. Changes in the pulmonary arteries of the rat during recovery from hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol*. 1977;58(6):653-662.
105. Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1988;255(6 Pt 2):H1484-

- 1491.
106. Schultze AE, Roth RA. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 1998;1(4):271-346.
 107. Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti SS, Ghofrani HA, Samidurai A, Traupe H, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med.* 2008;8:25.
 108. Deyo JA, Reed RL, Buhler DR, Kerkvliet NI. Role of metabolism in monocrotaline-induced immunotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxicology.* 1994;94(1-3):209-222.
 109. Reid MJ, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ. Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of ¹⁴C-monocrotaline in rat liver microsomes. *J Biochem Mol Toxicol.* 1998;12(3):157-166.
 110. Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, Hulin A, Marcos E, Giraudier S, Vainchenker W, Adnot S, Eddahibi S, Maitre B. Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res.* 2007;8:8.
 111. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2001;15(2):427-438.
 112. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010;121(25):2747-2754.
 113. Ciuculan L, Bonneau O, Hussey M, Duggan N, Holmes AM, Good R, Stringer R, Jones P, Morrell NW, Jarai G, Walker C, Westwick J, Thomas M. A novel murine model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(10):1171-1182.
 114. Marshall C, Mamary AJ, Verhoeven AJ, Marshall BE. Pulmonary artery NADPH-oxidase is activated in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996;15(5):633-644.
 115. Waypa GB, Chandel NS, Schumacker PT. Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circ Res.* 2001;88(12):1259-1266.
 116. Mittal M, Roth M, Konig P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, Selbitz AC, Schermuly RT, Ghofrani HA, Kwapiszewska G, Kummer W, Klepetko W, Hoda MA, Fink L, Hanze J, Seeger W, Grimminger F, Schmidt HH, Weissmann N. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary

- vasculature. *Circ Res.* 2007;101(3):258-267.
117. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria; 2007.
 118. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor.* Springer, 2005:397-420.
 119. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 2004;5(10):R80.
 120. Smyth GK, Speed T. Normalization of cDNA microarray data. *Methods.* 2003;31(4):265-273.
 121. Kloepfing C. Hypoxie-induzierte Pulmonale Hypertonie: Reversibilität und therapeutische Effekte durch körperliches Training. VVB Laufersweiler Verlag, 2010.
 122. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol.* 1979;236(6):H818-827.
 123. Weissmann N, Nollen M, Gerigk B, Ardeschir Ghofrani H, Schermuly RT, Gunther A, Quanz K, Fink L, Hanze J, Rose F, Seeger W, Grimminger F. Downregulation of hypoxic vasoconstriction by chronic hypoxia in rabbits: effects of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(3):H931-938.
 124. Nishimura K, Nakatsu F, Kashiwagi K, Ohno H, Saito T, Igarashi K. Essential role of S-adenosylmethionine decarboxylase in mouse embryonic development. *Genes Cells.* 2002;7(1):41-47.
 125. Arora S, Wang Y, Jia Z, Vardar-Sengul S, Munawar A, Doctor KS, Birrer M, McClelland M, Adamson E, Mercola D. Egr1 regulates the coordinated expression of numerous EGF receptor target genes as identified by ChIP-on-chip. *Genome Biol.* 2008;9(11):R166.
 126. Kaufmann K, Thiel G. Epidermal growth factor and platelet-derived growth factor induce expression of Egr-1, a zinc finger transcription factor, in human malignant glioma cells. *J Neurol Sci.* 2001;189(1-2):83-91.
 127. Hackel PO, Zwick E, Prenzel N, Ullrich A. Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):184-189.
 128. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007;26(22):3100-3112.

129. Rao JN, Liu L, Zou T, Marasa BS, Boneva D, Wang SR, Malone DL, Turner DJ, Wang JY. Polyamines are required for phospholipase C-gamma1 expression promoting intestinal epithelial restitution after wounding. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292(1):G335-343.
130. Grover RF. Pulmonary circulation in animals and man at high altitude. *Ann N Y Acad Sci*. 1965;127(1):632-639.
131. Rhodes J. Comparative physiology of hypoxic pulmonary hypertension: historical clues from brisket disease. *J Appl Physiol*. 2005;98(3):1092-1100.
132. Lahm T, Patel KM, Crisostomo PR, Markel TA, Wang M, Herring C, Meldrum DR. Endogenous estrogen attenuates pulmonary artery vasoreactivity and acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the effects of sex and menstrual cycle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(3):E865-871.
133. Anand IS, Harris E, Ferrari R, Pearce P, Harris P. Pulmonary haemodynamics of the yak, cattle, and cross breeds at high altitude. *Thorax*. 1986;41(9):696-700.
134. Groves BM, Droma T, Sutton JR, McCullough RG, McCullough RE, Zhuang J, Rapmund G, Sun S, Janes C, Moore LG. Minimal hypoxic pulmonary hypertension in normal Tibetans at 3,658 m. *J Appl Physiol*. 1993;74(1):312-318.
135. Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A, Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;104(4):424-428.
136. Simon R, Radmacher MD, Dobbin K, McShane LM. Pitfalls in the use of DNA microarray data for diagnostic and prognostic classification. *J Natl Cancer Inst*. 2003;95(1):14-18.
137. Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6497-6507.
138. Victor A, Klug SJ, Blettner M. cDNA-Microarrays - Strategien zur Bewältigung der Datenflut. *Deutsches Ärzteblatt*. 2005;Jg. 102(6):A355-360.
139. Moreno-Vinasco L, Garcia JG. Receptor tyrosine kinase inhibitors in rodent pulmonary hypertension. *Adv Exp Med Biol*. 2010;661:419-434.
140. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43(6):629-634.
141. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-322.
142. Leonardi E, Girlando S, Serio G, Mauri FA, Perrone G, Scampini S, Dalla Palma P, Barbareschi M. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol*. 1992;45(5):416-419.

143. Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res.* 1986;166(1):209-219.
144. Shivji KK, Kenny MK, Wood RD. Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell.* 1992;69(2):367-374.
145. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(28):7212-7220.
146. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer.* 2007;96(10):1504-1513.
147. Todorovich-Hunter L, Johnson DJ, Ranger P, Keeley FW, Rabinovitch M. Altered elastin and collagen synthesis associated with progressive pulmonary hypertension induced by monocrotaline. A biochemical and ultrastructural study. *Lab Invest.* 1988;58(2):184-195.
148. Rabinovitch M. Investigational approaches to pulmonary hypertension. *Toxicol Pathol.* 1991;19(4 Pt 1):458-469.
149. Li H, Oparil S, Meng QC, Elton TS, Chen YF. Selective downregulation of ANP-clearance-receptor gene expression in lung of rats adapted to hypoxia. *Am J Physiol.* 1995;268(2 Pt 1):L328-335.
150. Russell D, Snyder SH. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1968;60(4):1420-1427.
151. Regenass U, Mett H, Stanek J, Mueller M, Kramer D, Porter CW. CGP 48664, a new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitor with broad spectrum antiproliferative and antitumor activity. *Cancer Res.* 1994;54(12):3210-3217.
152. Casero RA, Jr., Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(5):373-390.
153. Gerner EW, Meyskens FL, Jr. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(10):781-792.
154. Wallace HM, Fraser AV, Hughes A. A perspective of polyamine metabolism. *Biochem J.* 2003;376(Pt 1):1-14.
155. Wallace HM. The polyamines: past, present and future. *Essays Biochem.* 2009;46:1-9.
156. Dudley HW, Rosenheim MC, Rosenheim O. The Chemical Constitution of Spermine. I. The Isolation of Spermine from Animal Tissues, and the Preparation of its Salts. *Biochem J.* 1924;18(6):1263-1272.

157. Ignatenko NA, Zhang H, Watts GS, Skovan BA, Stringer DE, Gerner EW. The chemopreventive agent alpha-difluoromethylornithine blocks Ki-ras-dependent tumor formation and specific gene expression in Caco-2 cells. *Mol Carcinog.* 2004;39(4):221-233.
158. Brzozowski T, Konturek SJ, Drozdowicz D, Dembinski A, Stachura J. Healing of chronic gastric ulcerations by L-arginine. Role of nitric oxide, prostaglandins, gastrin and polyamines. *Digestion.* 1995;56(6):463-471.
159. Takigawa M, Enomoto M, Nishida Y, Pan HO, Kinoshita A, Suzuki F. Tumor angiogenesis and polyamines: alpha-difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits B16 melanoma-induced angiogenesis in ovo and the proliferation of vascular endothelial cells in vitro. *Cancer Res.* 1990;50(13):4131-4138.
160. Takahashi Y, Mai M, Nishioka K. alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *Int J Cancer.* 2000;85(2):243-247.
161. Wallace HM, Caslake R. Polyamines and colon cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001;13(9):1033-1039.
162. Brunton VG, Grant MH, Wallace HM. Spermine toxicity and glutathione depletion in BHK-21/C13 cells. *Biochem Pharmacol.* 1990;40(8):1893-1900.
163. Stefanelli C, Bonavita F, Stanic I, Pignatti C, Flamigni F, Guarnieri C, Caldarera CM. Spermine triggers the activation of caspase-3 in a cell-free model of apoptosis. *FEBS Lett.* 1999;451(2):95-98.
164. Harada J, Sugimoto M. Polyamines prevent apoptotic cell death in cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res.* 1997;753(2):251-259.
165. Redman C, Xu MJ, Peng YM, Scott JA, Payne C, Clark LC, Nelson MA. Involvement of polyamines in selenomethionine induced apoptosis and mitotic alterations in human tumor cells. *Carcinogenesis.* 1997;18(6):1195-1202.
166. Vujcic S, Diegelman P, Bacchi CJ, Kramer DL, Porter CW. Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem J.* 2002;367(Pt 3):665-675.
167. Shirahata A, Pegg AE. Regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase activity in rat liver and prostate. *J Biol Chem.* 1985;260(17):9583-9588.
168. Heller JS, Fong WF, Canellakis ES. Induction of a protein inhibitor to ornithine decarboxylase by the end products of its reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(6):1858-1862.
169. Shiao RT, Kostenbauder HB, Olson JW, Gillespie MN. Mechanisms of lung polyamine accumulation in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol.* 1990;259(6 Pt 1):L351-358.

170. Olson JW, Altieri RJ, Gillespie MN. Prolonged activation of rat lung ornithine decarboxylase in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Biochem Pharmacol.* 1984;33(22):3633-3637.
171. Olson JW, Hacker AD, Atkinson JE, Altieri RJ, Gillespie MN. Polyamine content in rat lung during development of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem Pharmacol.* 1986;35(4):714-716.
172. Olson JW, Atkinson JE, Hacker AD, Altieri RJ, Gillespie MN. Suppression of polyamine biosynthesis prevents monocrotaline-induced pulmonary edema and arterial medial thickening. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985;81(1):91-99.
173. Pendeville H, Carpino N, Marine JC, Takahashi Y, Muller M, Martial JA, Cleveland JL. The ornithine decarboxylase gene is essential for cell survival during early murine development. *Mol Cell Biol.* 2001;21:6549-6558.
174. Harrod KS, Olson JW, Gillespie MN. Regulation of ornithine decarboxylase by hypoxia in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1996;271(1 Pt 1):L31-37.
175. Atkinson JE, Olson JW, Altieri RJ, Gillespie MN. Evidence that hypoxic pulmonary vascular remodeling in rats is polyamine dependent. *J Appl Physiol.* 1987;62(4):1562-1568.
176. Stenmark KR, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:134-145.
177. Pak O, Aldashev A, Welsh D, Peacock A. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J.* 2007;30(2):364-372.
178. Kourembanas S, Hannan RL, Faller DV. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene in human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1990;86(2):670-674.
179. Kremer C, Breier G, Risau W, Plate KH. Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res.* 1997;57(17):3852-3859.
180. Jiang Y, Dai A, Li Q, Hu R. Hypoxia induces transforming growth factor-beta1 gene expression in the pulmonary artery of rats via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39(1):73-80.
181. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest.* 2009;119(3):512-523.
182. Hardin MS, Hurta RA. Growth factor-mediated altered expression and regulation of S-adenosylmethionine decarboxylase in a H-ras transformed cell line capable of malignant progression. *J Cell Biochem.* 2002;84(2):349-358.

183. Milovic V, Turhanowa L, Fares FA, Lerner A, Caspary WF, Stein J. S-adenosylmethionine decarboxylase activity and utilization of exogenous putrescine are enhanced in colon cancer cells stimulated to grow by EGF. *Z Gastroenterol.* 1998;36(11):947-954.
184. Swinson DE, O'Byrne KJ. Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2006;7(4):250-256.
185. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995;19(3):183-232.
186. Yarden Y, Schlessinger J. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry.* 1987;26(5):1443-1451.
187. Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19(2):124-134.
188. Threadgill DW, Dlugosz AA, Hansen LA, Tennenbaum T, Lichti U, Yee D, LaMantia C, Mourton T, Herrup K, Harris RC, et al. Targeted disruption of mouse EGF receptor: effect of genetic background on mutant phenotype. *Science.* 1995;269(5221):230-234.
189. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004;59(2 Suppl):21-26.
190. Herbst RS, Langer CJ. Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol.* 2002;29(1 Suppl 4):27-36.
191. Ghazvini-Boroujerdi M, Clark J, Narula N, Palmatory E, Connolly JM, DeFelice S, Xu J, Jian B, Hazelwood S, Levy RJ. Transcription factor Egr-1 in calcific aortic valve disease. *J Heart Valve Dis.* 2004;13(6):894-903.
192. Lee CG, Cho SJ, Kang MJ, Chapoval SP, Lee PJ, Noble PW, Yehualaeshet T, Lu B, Flavell RA, Milbrandt J, Homer RJ, Elias JA. Early growth response gene 1-mediated apoptosis is essential for transforming growth factor beta1-induced pulmonary fibrosis. *J Exp Med.* 2004;200(3):377-389.
193. Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. *Annu Rev Pathol.* 2007;2:369-399.
194. Gillespie MN, Rippetoe PE, Haven CA, Shiao RT, Orlinska U, Maley BE, Olson JW. Polyamines and epidermal growth factor in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140(5):1463-1466.
195. Banks MF, Gerasimovskaya EV, Tucker DA, Frid MG, Carpenter TC, Stenmark KR. Egr-1 antisense oligonucleotides inhibit hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery adventitial fibroblasts. *J Appl Physiol.* 2005;98(2):732-738.

196. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC. Early Growth Response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res.* 2002;62(3):827-834.
197. Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(21):8602-8606.
198. Merlino GT, Xu YH, Ishii S, Clark AJ, Semba K, Toyoshima K, Yamamoto T, Pastan I. Amplification and enhanced expression of the epidermal growth factor receptor gene in A431 human carcinoma cells. *Science.* 1984;224(4647):417-419.
199. Fukuda N. Cigarette smoking induces vascular proliferative disease through the activation of Egr-1. *Cardiovasc Res.* 2010;88(2):207-208.
200. van Albada ME, Bartelds B, Wijnberg H, Mohaupt S, Dickinson MG, Schoemaker RG, Kooi K, Gerbens F, Berger RM. Gene expression profile in flow-associated pulmonary arterial hypertension with neointimal lesions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2010;298(4):L483-491.
201. Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, Atkinson C, Chen H, Trembath RC, Morrell NW. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2005;96(10):1053-1063.
202. Morecroft I, Doyle B, Nilsen M, Kolch W, Mair K, Maclean MR. Mice lacking the Raf-1 kinase inhibitor protein exhibit exaggerated hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol.* 2011;163(5):948-963.
203. Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA. Gene expression of cyclin-dependent kinase inhibitors and effect of heparin on their expression in mice with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;345(4):1565-1572.
204. Murray F, MacLean MR, Pyne NJ. An assessment of the role of the inhibitory gamma subunit of the retinal cyclic GMP phosphodiesterase and its effect on the p42/p44 mitogen-activated protein kinase pathway in animal and cellular models of pulmonary hypertension. *Br J Pharmacol.* 2003;138(7):1313-1319.
205. Nishimura K, Liisanantti M, Muta Y, Kashiwagi K, Shirahata A, Janne M, Kankare K, Janne OA, Igarashi K. Structure and activity of mouse S-adenosylmethionine decarboxylase gene promoters and properties of the encoded proteins. *Biochem J.* 1998;332 (Pt 3):651-659.
206. Takeishi Y, Goto K, Kubota I. Role of diacylglycerol kinase in cellular regulatory processes: a new regulator for cardiomyocyte hypertrophy. *Pharmacol Ther.* 2007;115(3):352-359.
207. Berridge MJ, Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature.* 1984;312(5992):315-321.
208. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno

- DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ, Yuan JX. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(38):13861-13866.
209. Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Mori T, Nishizuka Y. Unsaturated diacylglycerol as a possible messenger for the activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;91(4):1218-1224.
210. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*. 1988;334(6184):661-665.
211. Griner EM, Kazanietz MG. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):281-294.
212. Paridaens R, Uges DR, Barbet N, Choi L, Seeghers M, van der Graaf WT, Groen HJ, Dumez H, Buuren IV, Muskiet F, Capdeville R, Oosterom AT, de Vries EG. A phase I study of a new polyamine biosynthesis inhibitor, SAM486A, in cancer patients with solid tumours. *Br J Cancer*. 2000;83(5):594-601.
213. Siu LL, Rowinsky EK, Hammond LA, Weiss GR, Hidalgo M, Clark GM, Moczygemba J, Choi L, Linnartz R, Barbet NC, Sklenar IT, Capdeville R, Gan G, Porter CW, Von Hoff DD, Eckhardt SG. A phase I and pharmacokinetic study of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, administered on a daily-times-five every-three-week schedule in patients with Advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res*. 2002;8(7):2157-2166.
214. Pless M, Belhadj K, Menssen HD, Kern W, Coiffier B, Wolf J, Herrmann R, Thiel E, Bootle D, Sklenar I, Muller C, Choi L, Porter C, Capdeville R. Clinical efficacy, tolerability, and safety of SAM486A, a novel polyamine biosynthesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter study. *Clin Cancer Res*. 2004;10(4):1299-1305.
215. Millward MJ, Joshua A, Kefford R, Aamdal S, Thomson D, Hersey P, Toner G, Lynch K. Multi-centre Phase II trial of the polyamine synthesis inhibitor SAM486A (CGP48664) in patients with metastatic melanoma. *Invest New Drugs*. 2005;23(3):253-256.
216. van Zuylen L, Bridgewater J, Sparreboom A, Eskens FA, de Bruijn P, Sklenar I, Planting AS, Choi L, Bootle D, Mueller C, Ledermann JA, Verweij J. Phase I and pharmacokinetic study of the polyamine synthesis inhibitor SAM486A in combination with 5-fluorouracil/leucovorin in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(6):1949-1955.
217. Eskens FA, Greim GA, van Zuylen C, Wolff I, Denis LJ, Planting AS, Muskiet FA, Wanders J, Barbet NC, Choi L, Capdeville R, Verweij J, Hanauske AR, Brunsch U. Phase I and pharmacological study of weekly administration of the polyamine synthesis inhibitor SAM 486A (CGP 48 664) in patients with solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer Early Clinical Studies Group. *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1736-1743.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Gasaustausch in den Alveolen	2
Abbildung 2:	Abstimmung von Ventilation und Perfusion durch HPV in der Lunge unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen	4
Abbildung 3:	Vaskuläre Veränderungen in der PH	11
Abbildung 4:	Hypoxie-induzierte Gefäßumbauprozesse sind im Tiermodell durch Reoxygenierung reversibel	18
Abbildung 5:	Veränderung der Genexpression durch normoxische Reexposition nach chronischer Hypoxie in der Mauslunge	55
Abbildung 6:	AMD-1-mRNA-Expression nach chronischer Hypoxie sowie unter anschließender Reoxygenierung	56
Abbildung 7:	Lokalisation von AMD-1 in der Mauslunge	58
Abbildung 8:	Lokalisation von AMD-1 in der humanen Lunge	60
Abbildung 9:	Die AMD-1-Expression in systemischen Gefäßen der Maus im Vergleich von Normoxie und Hypoxie.	61
Abbildung 10:	AMD-1 mRNA-Expression in AMD-1 ^{+/-} - und Wildtyp-Mäusen	62
Abbildung 11:	Entwicklung der pulmonalen Hypertonie in AMD-1 ^{+/-} - und Wildtyp-Mäusen unter chronischer Hypoxie	63
Abbildung 12:	ODC-1-mRNA-Expression nach chronischer Hypoxie sowie unter anschließender Reoxygenierung	64
Abbildung 13:	ODC-1-Expression in isolierten glatten Muskelzellen nach hypoxischer Exposition	65
Abbildung 14:	ODC-1-mRNA-Expression in ODC-1 ^{+/-} - und Wildtyp-Mäusen	65
Abbildung 15:	Entwicklung der Hypoxie-induzierten PH in ODC-1 ^{+/-} - im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen	67
Abbildung 16:	Vaskuläre Umbauprozesse und reversible Gefäßumbauprozesse sind durch Veränderungen in der Proliferation charakterisiert	68
Abbildung 17:	Verminderung der AMD-1-Expression erniedrigt die Proliferation	70
Abbildung 18:	Untersuchung des AMD-1-Promotors auf HRE-Bindestellen	71
Abbildung 19:	Abhängigkeit der AMD-1-Hochregulation von HIF	72
Abbildung 20:	AMD-1-mRNA-Expression nach Inkubation mit den Wachstumsfaktoren PDGF-BB, TGF-β1 oder EGF	73

Abbildung 21:	Untersuchung des humanen AMD-1-Promotors auf Egr1-Bindestellen .	73
Abbildung 22:	Auswirkung von EGF auf die Expression von Egr1	74
Abbildung 23:	Untersuchung einer möglichen Interaktion von Egr1 mit dem AMD-1-Promotor nach EGF-Stimulation	75
Abbildung 24:	Die Auswirkung von EGF auf die Expression von Erk1/2 und Egr1	77
Abbildung 25:	Der Einfluss von EGF auf die AMD-1-Expression und Proliferation in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen von Egr1 ^{-/-} -Mäusen	78
Abbildung 26:	Einfluss von AMD-1 auf die Phosphorylierung von PLC- γ 1	79
Abbildung 27:	EGF-Applikation induziert die Aktivierung von PLC- γ 1	80
Abbildung 28:	Polyaminbiosynthese	88
Abbildung 29:	Schematische Darstellung der Rolle von AMD-1 in der Pathogenese der vaskulären Umbauprozesse in der Hypoxie-induzierten PH.....	96
Abbildung 30:	Stark regulierte Signaltransduktionswege im Zeitverlauf der Reoxygenierung nach chronisch hypoxischer Exposition	103
Abbildung 31:	Stark regulierte Gene im Zeitverlauf der Reoxygenierung nach chronisch hypoxischer Exposition	105

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Funktionelle Klassifikation der PH	7
Tabelle 2:	Klinische Klassifikation der PH	9
Tabelle 3:	Verwendete Puffer und Lösungen.....	29
Tabelle 4:	Liste der verwendeten Primer.....	31
Tabelle 5:	Verwendete siRNA	32
Tabelle 6:	Herstellung von Polyacrylamid-Trenngelen.....	32
Tabelle 7:	Herstellung eines Polyacrylamid-Sammalgels	32
Tabelle 8:	Herstellung von Agarose- und TBE-Gelen.....	33
Tabelle 9:	Hybridisierungen im cDNA- <i>Microarray</i> -Experiment.....	39

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich auf dem Weg zur Dissertation unterstützt und auf unterschiedlichste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank geht an...

... Herrn Prof. Dr. Norbert Weißmann für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine Unterstützung, Beratung und die Bewertung dieser Arbeit.

... Herrn Prof. Dr. Ernst Petzinger für die Zweitbetreuung dieser Arbeit.

... Frau Prof. Dr. Gabriele Grunig für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie an Frau Prof. Dr. Kerstin Fey und Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kummer für die Bewertung meiner Disputation.

... Frau Dr. Grażyna Kwapiszewska für die wissenschaftliche Betreuung, die kritischen und konstruktiven Ratschläge sowie die freundschaftliche Unterstützung. Ich möchte ihr ferner für ihre stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen und für ihre wertvollen Anregungen danken.

... Herrn Dr. Markus Roth für die Betreuung im ersten Jahr sowie für die Abwicklung der Modalitäten für die Tiereinfuhr.

... Frau Prof. Dr. Karen Ridge und Herrn Dr. Albert Sitikov von der Northwestern University, Chicago, IL, USA, für die herzliche Aufnahme, Betreuung und Unterstützung in ihrem Labor. Es freut mich, dass ich viele Anregungen und Fragestellungen mit auf den Weg bekommen habe.

... Frau Lisa Fröhlich, Frau Carmen Homberger und Frau Miriam Wessendorf für die technische Unterstützung bei der Isolierung von primären Zellen sowie bei der Bestimmung des Muskularisierungsgrades.

... Frau Christina Klöpping und Frau Alexandra Pichl für die Ausführung der physiologischen Messungen ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

... Herrn Dr. Jochen Wilhelm für die Auswertung der *Microarrays* sowie die vielen Stunden, in denen er mir die Grundzüge der Statistik nähergebracht hat.

... meine Bürokollegen und MBML-Mitstreiter Frau Christine Veith, Herrn Florian Veit und Frau Katrin Milger sowie Herrn Oleg Pak für die vielen anregenden Gespräche und Diskussionen.

... die gesamte Arbeitsgruppe Weißmann für die kollegiale, freundliche, fröhliche und dennoch professionelle Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima. Insbesondere danke ich hier Frau Ingrid Breitenborn-Müller für die stets hilfsbereite, freundliche und herzliche Hilfe in allen Lebenslagen, die immerwährende Unterstützung, das offene Ohr für Probleme sowie die gute Laune.

... Papa für das Korrekturlesen.

Der größte Dank geht an meine Familie und meine Freunde für die immerwährende Hilfe, die unerschöpfliche Geduld, die stete Ermutigung und vor allem für die uneingeschränkte Unterstützung in anstrengenden Zeiten.

13 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.

13.1 Veröffentlichungen

13.1.1 Originalarbeiten

- Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, **Weisel FC**, 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 RT, Grimminger F, and Ghofrani HA, Weissmann N. *Inducible NOS inhibition cures tobacco smoke induced emphysema and pulmonary hypertension in mice*. Cell, 147, 2, 293-305, 2011.

13.1.2 Vorträge

- **Weisel FC (2012)** „Identification and characterization of *AMD-1* as a new target in vascular remodeling” *CPC – INSERM Winter Retreat 2012 Helmholtz Research School “Lung Biology and Disease”, Fürstenfeldbruck, Deutschland.*
- **Weisel FC (2011)** „Reverse remodelling in pulmonary hypertension: impact of *AMD-1*”, *MBML Retreat, Rauischholzhausen, Deutschland.*
- **Weisel FC**, Kwapiszewska G, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2011) „Vascular reverse remodeling in the mouse model of hypoxia-induced pulmonary hypertension – role of *AMD-1*”, **52. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V., Dresden, Deutschland.**
- **Weisel FC (2010)** „*AMD1* – a potential target in hypoxia-induced vascular remodeling”, *MBML Retreat, Rauischholzhausen, Deutschland.*
- **Weisel FC**, Kwapiszewska G, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2010) „Reverse remodeling in pulmonary arterial hypertension”, *Keystone Symposia, Keystone, CO, USA.*
- **Weisel FC**, Kwapiszewska G, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2010) „Lab News – New Pathways in Hypoxia-Induced PH”, *Winterschool 2010 der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie, Oberlech, Österreich.*

- **Weisel FC, Kwapiszewska G, Kloeping C, Roth M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2009)** „AMD-1: ein neuer Kandidat für die Behandlung der pulmonalen arteriellen Hypertonie?“, **Herbsttagung der Sektion Zellbiologie, Borstel, Deutschland.**
- **Weisel FC (2009)** „*AMD-1: a new candidate in vascular reverse remodelling*“, **MBML Retreat, Rauischholzhausen, Deutschland.**

13.2 Posterpräsentationen

- **Weisel FC, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Pichl A, Seeger W, Ridge KM, Weissmann N, Kwapiszewska G (2011)** „*Reversion of Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension - impact of AMD-1*“, **Grover Conference, Sedalia, CO, USA.**
- **Weisel FC, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Pichl A, Seeger W, Ridge KM, Weissmann N, Kwapiszewska G (2011)** „*Reverse Remodeling in Pulmonary Hypertension – impact of S-Adenosylmethionine decarboxylase 1*“, **4th GGL Annual Conference, Gießen, Deutschland.**
- **Weisel FC, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Pichl A, Seeger W, Ridge KM, Weissmann N, Kwapiszewska G (2011)** „*Reverse Remodeling in Pulmonary Hypertension – impact of S-Adenosylmethionine decarboxylase 1*“, **ECCPS Retreat, Bad Nauheim, Deutschland.**
- **Weisel FC, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Pichl A, Seeger W, Ridge KM, Weissmann N, Kwapiszewska G (2010)** „*Vascular Reverse Remodeling in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension - Role of Amd-1*“, **3rd GGL Annual Conference, Gießen, Deutschland.**
- **Weisel FC, Kwapiszewska G, Kloeping C, Roth M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2010)** „*Vascular reverse remodeling in the mouse model of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension*“, **ERS, Barcelona, Spanien.**
- **Weisel FC, Roth M, Kloeping C, Wilhelm J, Pichl A, Seeger W, Ridge KM, Weissmann N, Kwapiszewska G (2010)** „*AMD-1: a new candidate in vascular reverse remodeling*“, **2nd GGL Annual Conference, Gießen, Deutschland.**
- **Weisel FC, Kwapiszewska G, Kloeping C, Roth M, Ghofrani HA, Schermuly RT,**

Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2010) „*Vascular reverse remodeling in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension*”, **ECCPS Retreat, Bad Nauheim, Deutschland.**

- **Weisel FC**, Kwapiszewska G, Klopping C, Roth M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2010) „*Vascular reverse remodeling in hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension*”, **ATS, New Orleans, LA, USA.**
- **Weisel FC**, Kwapiszewska G, Klopping C, Roth M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F and Weissmann N (2009) „*Investigation of new candidates involved in vascular reverse remodeling in pulmonary hypertension*”, **ECCPS Retreat, Bad Nauheim, Deutschland.**