

Aus dem
Exzellenzcluster Cardio-Pulmonales System, Gießen
am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Pulmonale Hypertonie -
Einfluss von Paxillin auf die Regulation der
pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christine Veith
aus
Gießen 2012

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Volkmar Wolters

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss
Institut für Tierphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann
Exzellenzcluster Cardio-Pulmonales System
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2012

*Bewerte deine Erfolge daran,
was du aufgeben musstest, um sie zu erzielen.*

Dalai Lama

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „*Molecular Biology and Medicine of the Lung*“ (MBML) am Exzellenzcluster Cardio-Pulmonales System (ECCPS) des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von März 2008 bis Januar 2012 angefertigt. Die Themenstellung erfolgte durch Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lunge und Gasaustausch	1
1.2	Die pulmonale Hypertonie.....	4
1.3	Der pulmonalvaskuläre Gefäßumbau in der pulmonalen Hypertonie	8
1.3.1	Charakteristika des pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozesses.....	8
1.3.2	Mechanismen des pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozesses.....	11
1.3.3	Konsequenzen des pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozesses.....	14
1.4	Integrine als Mechanotransduktoren.....	14
1.5	LIM-Proteine	17
1.5.1	Die Familie der <i>four and a half LIM domains</i> Proteine	18
1.6	Zielsetzung der Arbeit/bearbeitete Fragestellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Verwendete Geräte.....	20
2.1.2	Verwendete Materialien und Chemikalien.....	21
2.1.3	Seren, Antibiotika, Medien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	24
2.1.4	Größenstandards.....	24
2.1.5	Verwendete Kits und Assays.....	24
2.1.6	Verwendete Antikörper	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Die <i>Yeast two-Hybrid</i> Analyse	27
2.2.2	Zellkultur	28
2.2.3	Die Co-Immunopräzipitation	30
2.2.4	Humanes Lungengewebe	30
2.2.5	Die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie in der Maus	30
2.2.6	Laser-unterstützte Mikrodissektion.....	31
2.2.7	RNA Isolation	32
2.2.8	cDNA Synthese und <i>Real-Time</i> PCR.....	33

2.2.9	siRNA-Transfektion von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen	34
2.2.10	Der Adhäsions-, Proliferations- und Apoptose-Assay	35
2.2.11	Kultivierung von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen auf Fibronectin	36
2.2.12	Protein-Isolation und Western Blot Analyse.....	36
2.2.13	Promotoranalyse.....	37
2.2.14	Der <i>Electrophoretic Mobility Shift</i> Assay	37
2.2.15	Immunohistochemie	39
2.2.16	Immunofluoreszenz	40
2.2.17	Statistische Analyse und Datenverarbeitung.....	41
2.3	Puffer, Lösungen und Gele	42
3	Ergebnisse	45
3.1	Suche nach neuen Fhl-1 Interaktionspartnern	45
3.2	Paxillin-Expression in Lungen von Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie	50
3.3	Regulation von Paxillin in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie.....	52
3.3.1	Paxillin-Expression in der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus	53
3.3.2	Paxillin-Expression im Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie in der Ratte	55
3.4	Regulation der Fibronectin-Expression in Lungen von Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie	57
3.5	Einfluss von Fibronectin auf die Phosphorylierung von Paxillin.....	59
3.6	Rolle von Fibronectin und/oder Paxillin auf das Adhäsions-Verhalten humaner pulmonalarterieller glatter Muskelzellen	60
3.7	Einfluss der reziproken Paxillin oder <i>focal adhesion kinase</i> Expression auf die Phosphorylierung der Proteine.....	64
3.8	Einfluss von Paxillin auf die Proliferation und Apoptose von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen.....	66
3.9	Wirkung von Hypoxie auf die Regulation der Paxillin-Expression	69
3.10	Molekulare Mechanismen der Paxillin-Expression unter Hypoxie	71
3.11	Einfluss von Hypoxie auf die Paxillin Tyrosin Phosphorylierung	72

4	Diskussion.....	76
4.1	Kritische Betrachtung der verwendeten Modelle und Methoden	83
4.2	Fazit	86
4.3	Ausblick	88
5	Zusammenfassung	89
6	Summary	91
7	Literaturverzeichnis	92
8	Abbildungsverzeichnis	105
9	Tabellenverzeichnis	107
10	Anhang.....	108
10.1	Abkürzungen.....	108
10.2	Sequenzen	113
11	Curriculum vitae	115
11.1	Persönliche Daten	115
11.2	Ausbildung.....	115
11.3	Stipendien und Auszeichnungen.....	116
12	Veröffentlichungen und Beiträge.....	117
12.1	Eigene Veröffentlichungen	117
12.2	Beiträge	117
12.2.1	Vorträge.....	117
12.2.2	Poster/Posterdiskussion.....	117

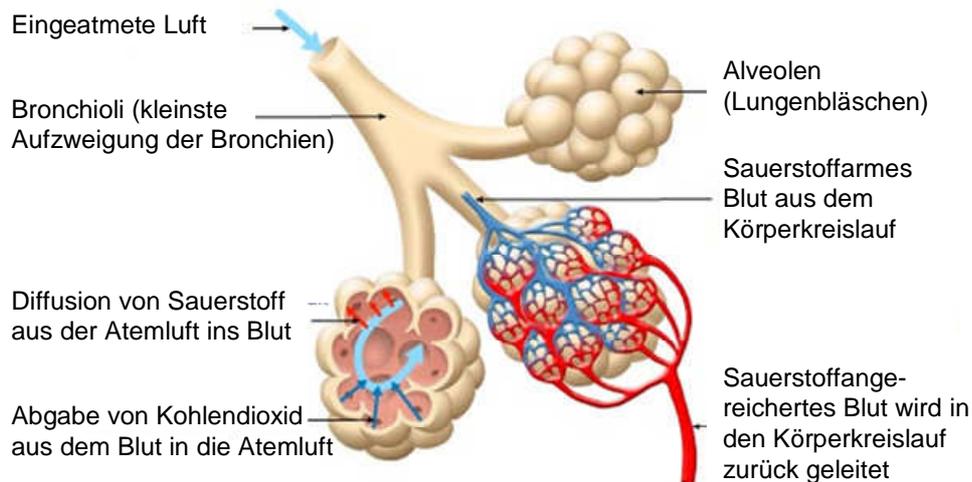
13	Versicherung.....	119
14	Danksagung.....	120

1 Einleitung

1.1 Lunge und Gasaustausch

Zur Energiegewinnung sind Tiere auf die Aufnahme von Sauerstoff (O_2) aus der Umgebung angewiesen, gleichzeitig muss das im oxidativen Stoffwechsel entstehende Kohlendioxid (CO_2) an die Umgebung abgegeben werden (Penzlin, 2005). Die Vorgänge der O_2 -Aufnahme und CO_2 -Abgabe werden als „äußere“ Atmung oder Gasaustausch bezeichnet (Klinke & Silbernagel, 1996; Silbernagel & Despopoulos, 2003). Beim Menschen ist die Lunge das dafür verantwortliche Organ. Sie besteht aus zwei Lungenflügeln, die sich links in zwei und rechts in drei Lungenlappen gliedern (Champbell, 2000). In das Lungengewebe sind der Bronchialbaum (als Bestandteil des Luftraums) und die Lungenarterien und -venen (als Bestandteil des Blutraums) eingebettet. Die Bronchiolen enden dabei über die Alveolargänge und Alveolarsäcke in den Alveolen (Lungenbläschen), die von einem dichten Kapillarnetz umspannt sind. O_2 gelangt mit der Atemluft in den Alveolarraum wo er über die alveolokapilläre Membran ins Blut diffundiert (**Abbildung 1**). Das oxigenierte, d.h. das mit O_2 angereicherte Blut, wird dann mit dem Blutkreislauf an die Körperzellen verteilt, in die O_2 wiederum durch Diffusion gelangt. In den Mitochondrien der Körperzellen wird O_2 schließlich mit Hilfe der „inneren Atmung“ zur Energiefixierung (ATP-Produktion) eingesetzt. Das als Endprodukt im Energiestoffwechsel entstehende CO_2 geht den umgekehrten Weg (Silbernagel & Despopoulos, 2003).

Das alveolare Epithel, welches zusammen mit dem Kapillarendothel das Gas im Alveolarraum vom Blut in den Lungenkapillaren trennt, muss folgende Voraussetzungen aufweisen, um einen optimalen Gasaustausch (Aufnahme O_2 und Abgabe von CO_2) sicher stellen zu können: 1. es muss extrem dünn sein (bis zu ca. $0,2 \mu m$ dünn beim Menschen), da der Austausch der Atemgase (O_2 und CO_2) durch passive Diffusion entlang eines Gaspartialdruckgefälles aus dem Luftraum in das Blut (O_2), bzw. aus dem Blut in den Luftraum (CO_2) erfolgt; 2. es muss mechanischen Schutz bieten, um einen Austritt von Flüssigkeit aus dem Blut in den Alveolarraum zu verhindern; 3. es muss eine große Gesamtfläche (bis zu ca. $120 m^2$ beim erwachsenen Menschen) aufweisen, da die Diffusionsrate direkt proportional zur Größe der Austauschfläche ist (Gehr et al, 1978; West, 2003).



(geändert nach *evidence*, dem medizinischen Wissensnetzwerk der Universität Witten/Herdecke)

Abbildung 1: Gasaustausch in den Lungenalveolen

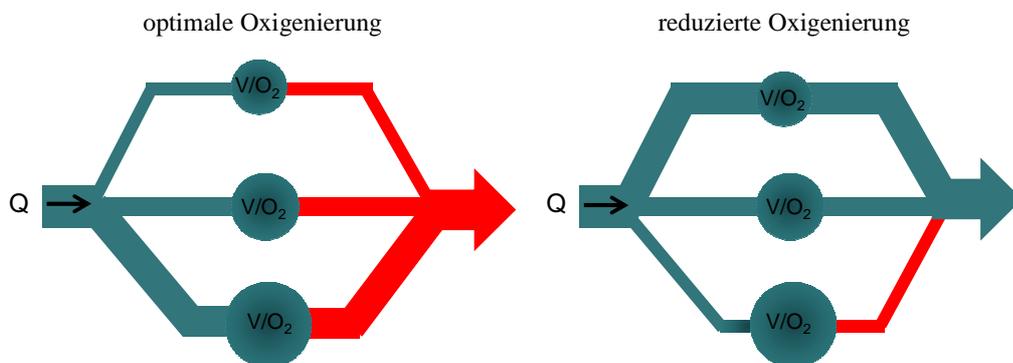
Die eingeatmete Luft gelangt über die Bronchiolen in die Alveolen. In den Alveolen diffundiert der Sauerstoff aus der Atemluft über das alveolokapilläre Epithel in das Blut. Das aus dem Körperkreislauf stammende sauerstoffarme Blut wird so mit Sauerstoff angereichert/beladen und fließt in den Körperkreislauf zurück.

Um eine optimale Sauerstoffversorgung des Körpers zu gewährleisten, ist die pulmonale Zirkulation ein System mit einem hohen Blutfluss und einem niedrigen mittleren pulmonalarteriellen Blutdruck (*mean pulmonary arterial pressure* - mPAP) und Widerstand (*pulmonary vascular resistance* – PVR) (Humbert et al, 2004; Mandegar et al, 2004). Der Gesamtwiderstand der Gefäße der Lungenstrombahn setzt sich dabei aus dem Einzel-Widerstand der Gefäße zusammen (Mandegar et al, 2004). Er ist in etwa nur 1/10 so groß wie der totale periphere Widerstand des Körperkreislaufes. In Folge dessen ist der mPAP im Lungenkreislauf deutlich niedriger als im Körperkreislauf, er beträgt in der Regel < 20 mmHg (Silbernagel & Despopoulos, 2003; Weissmann et al, 2006) und ist das Produkt aus dem PVR und dem Herzzeitvolumen (*cardiac output* – CO; Maß für die Pumpfunktion des Herzens) (Mandegar et al, 2004).

Auch unter schwerer körperlicher Belastung steigt der mPAP bei gesunden Individuen nur minimal an (Mandegar et al, 2004). Zwar bewirkt der akute Abfall der O₂-Konzentration von 21 % auf weniger als 12 % (als akute Hypoxie bezeichnet) (Tuder et

al, 2007b) in den Alveolen der entsprechenden Lungenabschnitte eine Konstriktion der glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells* - SMC) in den Gefäßwänden (Mandegar et al, 2004). In Folge der Konstriktion kommt es zur Lumenverengung der arteriellen, präkapillären Gefäße und zum Anstieg des mPAP. Letztendlich wird jedoch durch die Vasokonstriktion nur ein Anstieg des mPAP um 4 - 8 mmHg erreicht (Tuder et al, 2007b), insofern sich die Gefäße der ganzen Lunge verengen. Das unter Belastung steigende Herzzeitvolumen führt im Gesunden zu dieser nur minimalen Erhöhung des mPAP, da die Rekrutierung von zuvor nicht-perfundierten Gefäßen, sowie die passive und aktive Vasodilatation einem mPAP-Anstieg entgegen wirken (Mandegar et al, 2004).

Der Regulationsprozess der Hypoxie-induzierten Vasokonstriktion (*hypoxic pulmonary vasoconstriction* - HPV) wird auch als Von Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnet. Er dient dazu die Durchblutung in schlecht belüfteten Lungenabschnitten zu vermindern und den pulmonalen Blutfluss in besser belüftete Lungengebiete umzuleiten (Von Euler & Liljestrand, 1946). Die Oxigenierung des Blutes wird so optimiert und es wird verhindert, dass das Blut die Lunge passiert, ohne ausreichend mit O_2 beladen zu werden (**Abbildung 2**).



(geändert nach Ghofrani et al. 2006 (Ghofrani et al, 2006))

Abbildung 2: Modell der Hypoxie-induzierten Vasokonstriktion – der Von Euler-Liljestrand-Mechanismus.

Beim gesunden Individuum wird der Blutfluss (Q) in die Bereiche der Lunge gelenkt, die gut ventilert (V) und oxigeniert (O_2) sind (große blaue Alveolen). Nur hier kann ein optimaler Gasaustausch und somit die Oxigenierung des Blutes (in rot dargestellt) gewährleistet werden. Ein sehr kleiner Anteil des Blutes gelangt in die Bereiche, die schlecht ventilert und oxigeniert sind (kleinere und mittlere blaue Alveolen). Bei Individuen mit Lungenerkrankungen kann der Mechanismus der Hypoxie-induzierten

Vasokonstriktion gestört sein. Es kommt dann zur Durchblutung von nicht oder schlecht ventilerten Bereichen der Lunge und damit zu einer reduzierten/verminderten Oxygenierung des Blutes (in blau dargestellt).

Wird die akute Hypoxie in den Alveolen chronisch, unter anderem bei Lungenerkrankungen, die durch eine chronisch-alveoläre Hypoxie charakterisiert sind (Weissmann et al, 2006), wird die Vasokonstriktion durch einen Umbauprozess der pulmonalen Gefäße „fixiert“. Dieser Vorgang wird als Hypoxie-induzierter Gefäßumbauprozess (engl. *pulmonary vascular remodelling*) bezeichnet (Jeffery & Wanstall, 2001; Weissmann et al, 2006). Die Folge des Gefäßumbaus ist ein progressiver Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstands und schließlich des mPAP im Lungenkreislauf (Humbert et al, 2004; Jeffery & Wanstall, 2001) bei gleichzeitiger Abnahme des Herzzeitvolumens (Bristow et al, 1998). Ist der mPAP höher als normal, wird schließlich die Expression bestimmter Gene aktiviert, die den Gefäßumbauprozess weiter potenzieren. In Folge des fortwährenden, positiven *feedback*-Mechanismus entsteht im Laufe der Zeit der chronische Lungenhochdruck, die sogenannte pulmonale Hypertonie (Mandegar et al, 2004).

1.2 Die pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie ist eine Sammelbezeichnung für progressive Erkrankungen, die durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Widerstand (PVR) und Druck (mPAP) charakterisiert werden (Jeffery & Wanstall, 2001). Weltweit leiden bis zu 100 Millionen Menschen an dieser Erkrankung (Simonneau et al, 2009).

Die pulmonale Hypertonie wird anhand eines mit Rechtsherzkatheterisierung gemessenen mPAP von ≥ 25 mmHg in Ruhelage (Archer et al; Galie et al, 2009) diagnostiziert und definiert. Während der normale mPAP im Bereich von 14 ± 3 mmHg und das obere Limit bei 20 mmHg liegt (Badesch et al, 2009; Kovacs et al, 2009), werden Werte zwischen 20 und 24 mmHg als kritisch angesehen und bedürfen genauerer Untersuchung.

Ausgelöst werden kann die pulmonale Hypertonie durch die unterschiedlichsten Faktoren, unter anderem durch die bereits erwähnte Hypoxie und/oder

Lungenerkrankungen, aber auch durch Thromboembolien, vorausgegangene Erkrankungen des linken Herzens oder durch verschiedenste weitere Faktoren (Archer et al, 2010).

Patienten mit pulmonaler Hypertonie leiden unter stark eingeschränkter körperlicher Leistungsfähigkeit, Synkopen (eine kurz andauernde Bewusstlosigkeit) und Müdigkeit (Rabinovitch, 2008; Voelkel & Cool, 2004). In Folge des erhöhten PVR und mPAP muss der rechte Ventrikel des Herzens das Blut gegen einen enormen Widerstand in die Lunge pumpen (Mandegar et al, 2004). Mit fortschreitender Krankheit kann das Herz diese erhöhte Arbeitslast nicht mehr kompensieren und das Herzzeitvolumen sinkt immer mehr ab und kann während körperlicher Betätigung schließlich nicht mehr ausreichend erhöht werden, um den gesteigerten Sauerstoffbedarf decken zu können (Voelkel & Cool, 2004). Letztendlich kann es zum Rechtsherzversagen, eine der häufigsten Todesursachen der pulmonalen Hypertonie, kommen (Mandegar et al, 2004).

Die klinische Klassifizierung der pulmonalen Hypertonie war im Laufe der Jahre vielen Änderungen unterworfen (Galie et al, 2009). Die vierte Weltkonferenz der pulmonalen Hypertonie, in Dana Point im Jahr 2008, unterteilt die Erkrankung in fünf Unterklassen (**Tabelle 1**), gemäß pathologischen, pathophysiologischen und therapeutischen Merkmalen (Galie et al, 2009; Simonneau et al, 2009).

Tabelle 1: Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie, nach Dana Point, 2008.

(Modifiziert nach (Simonneau et al, 2009)).

<p>1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH)</p> <ul style="list-style-type: none"> 1.1. Idiopathische PAH (IPAH) 1.2. Hereditäre PAH <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. BMPR2 1.2.2. ALK1, Endoglin (mit oder ohne hereditärer hämorrhagischer Telangiektasie) 1.2.3. Unbekannt 1.3. Arzneimittel- und Toxin-induziert 1.4. Assoziierte PAH; bei <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Kollagenosen 1.4.2. HIV-Infektion 1.4.3. Portaler Hypertonie 1.4.4. Angeborenem Herzfehler 1.4.5. Schistosomiasis 1.4.6. Chronisch hämolytischer Anämie 1.5. Persistierende pulmonalarterielle Hypertonie des Neugeborenen 1'. Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD für engl. <i>Pulmonary veno-occlusive disease</i>) und/oder pulmonalkapilläre Hämangiomatose (PCH)
<p>2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankung des linken Herzens</p> <ul style="list-style-type: none"> 2.1. Systolische Dysfunktion 2.2. Diastolische Dysfunktion 2.3. Herzklappenerkrankung
<p>3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie</p> <ul style="list-style-type: none"> 3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung 3.2. Interstitielle Lungenerkrankung 3.3. Andere restriktiv und obstruktiv gemischte pulmonale Erkrankungen 3.4. Schlafapnoe-Syndrom 3.5. Alveolare Hypoventilation 3.6. Chronische Höhenkrankheit 3.7. Anlagenbedingte Fehlbildungen
<p>4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thromboembolien (CTEPH)</p>
<p>5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen</p> <ul style="list-style-type: none"> 5.1. Hämatologische Erkrankungen: Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie 5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszellenhistiozytose, Lymphangioliomyomatose, Neurofibromatose, Vaskulitis 5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen 5.4. Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse

BMPR2: *bone morphogenetic protein receptor, type 2*; ALK1: *activin receptorlike kinase 1*.

Die Gruppe 1 der pulmonalen Hypertonie bildet die pulmonalarterielle Hypertonie (*pulmonary arterial hypertension* - PAH) (**Tabelle 1**). Diese beinhaltet Erkrankungen, deren primäre pathologischen Veränderungen besonders in den kleinen, distalen pulmonalen Arterien auftreten (Durchmesser < 500 µm) (Davies & Morrell, 2008).

Zur Gruppe der PAH wird die idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie (*idiopathic pulmonary arterial hypertension* - IPAH) zugeordnet. Sie ist eine eher seltene Form der pulmonalen Hypertonie, mit einer Prävalenz von zwei bis drei Individuen auf eine Million Menschen pro Jahr (Gaine & Rubin, 1998). Die IPAH wird dadurch definiert, dass als Ursache weder ein familiärer noch ein anderer identifizierter Risikofaktor bestimmt werden kann (Schermuly et al, 2011).

Ein weiterer Vertreter der PAH ist die hereditäre PAH. Von ihr sind etwa 10 % der PAH-Patienten betroffen (Davies & Morrell, 2008). Ihr können Mutationen im BMPR2 (*bone morphogenetic protein receptor, type 2*), im ALK1 (*activin receptorlike kinase 1*) oder im Endoglin-Gen als zugrunde liegender Mechanismus zugeordnet werden (Rabinovitch, 2008). Weitere Formen der PAH sind Arzneimittel- oder Drogen-induziert, stehen im Zusammenhang mit Erkrankungen (z.B. HIV und Schistosomiasis), treten beim Neugeborenen auf, oder sind gekennzeichnet durch eine pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder eine pulmonalkapilläre Hämangiomatose (**Tabelle 1**).

Unterscheiden sich die Ursachen in den Untergruppen der PAH, so sind dennoch alle Erkrankungen dieser Gruppe durch eine exzessive Vasokonstriktion und/oder einen abnormalen vaskulären Gefäßumbauprozess charakterisiert (Schermuly et al, 2011). Der Gefäßumbau wird dabei durch die unterschiedlichsten Faktoren ausgelöst, er weist somit eine multifaktorielle Pathologie auf und beinhaltet verschiedenste biochemische Signalwege und Zelltypen (Galie et al, 2009). Auf die pathologischen Kennzeichen der PAH wird genauer unter **Abschnitt 1.3** eingegangen.

Die Gruppe 2 der pulmonalen Hypertonie steht im Zusammenhang mit Erkrankungen des linken Herzens. Auf diese Gruppe der pulmonalen Hypertonie wird im Folgenden nicht genauer eingegangen.

Die Hypoxie- und/oder Lungenerkrankung-induzierte pulmonale Hypertonie bildet die Gruppe 3 der pulmonalen Hypertonie. Hier werden solche Erkrankungen zusammen gefasst, die aufgrund von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie entstehen. Als solche zählen unter anderem die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease* - COPD) und das Schlafapnoe-Syndrom. Auch Menschen, die in

großen Höhen leben und eine pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Hypoxie aufweisen, werden dieser Gruppe zugeordnet. (Mandegar et al, 2004).

Die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen dieser Gruppe sind vielseitig. Die hypoxische Vasokonstriktion kommt ebenso vor, wie der Verlust an Kapillaren und inflammatorische Ereignisse. Es kommt ferner zur Hypertrophie der Media durch die Proliferation von glatten Muskelzellen (Shimoda & Semenza, 2011) und zu intimalen, obstruktiven Proliferationen in den distalen pulmonalen Arterien (Galie et al, 2009).

Der Gruppe 4 der pulmonalen Hypertonie werden pulmonale Hypertonien aufgrund chronischer Thromboembolien zugeordnet. Gruppe 5 beinhaltet pulmonale Hypertonien mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen, unter anderem in Folge von systemischen und metabolischen Erkrankungen. Auch auf diese beiden Gruppen der pulmonalen Hypertonie wird im Folgenden nicht genauer eingegangen.

1.3 Der pulmonalvaskuläre Gefäßumbau in der pulmonalen Hypertonie

Unter normalen Bedingungen findet in den pulmonalen Gefäßwänden eine Balance zwischen der Proliferation und der Apoptose von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells* - PASMC), Fibroblasten und Endothelzellen statt. Ist dieses Gleichgewicht zur Proliferation hin verschoben und unterliegen die Arterien zudem einer Vasokonstriktion, werden Signaltransduktionswege aktiviert, die den vaskulären Gefäßumbauprozess induzieren/bedingen (Mandegar et al, 2004). In Folge dessen verdicken sich die Arterienwände, das Gefäßlumen verengt sich und der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR) und Druck (mPAP) steigen an.

1.3.1 Charakteristika des pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozesses

Der pulmonalvaskuläre Gefäßumbau ist ein sehr komplexer, multifaktorieller Prozess. Es umfasst alle drei Schichten der Gefäßwand, die außen liegende Adventitia, die Media und die innen liegende Intima (Jeffery & Wanstall, 2001) (Humbert et al, 2004).

Die Verdickung der Gefäßwand beruht dabei auf der Hyperplasie (Proliferation) und/oder Hypertrophie (Zellwachstum) des dominierenden Zelltyps in der jeweiligen Schicht (Jeffery & Wanstall, 2001); in der Adventitia die Fibroblasten, in der Media die glatten Muskelzellen (SMC) und in der Intima die Endothelzellen.

Veränderungen in der Intima beinhalten eine Schädigung des Endothels, die Proliferation von Endothelzellen, die Einwanderung von (Myo)Fibroblasten-ähnlichen Zellen in die Intima und die Ablagerung von extrazellulären Matrix-Komponenten (z.B. Kollagen, Elastin und Fibronectin) mit einer intimalen Fibrose und unter Umständen eine Obstruktion des vaskulären Lumens durch plexiforme Läsionen (Galie et al, 2009; Jeffery & Morrell, 2002; Schermuly et al, 2011). Die plexiformen Läsionen beruhen dabei auf einer dysregulierten Proliferation von Endothelzellen (Sakao et al, 2005; Voelkel & Cool, 2004) und sind vor allem an den Verzweigungspunkten von muskularisierten Arterien zu finden (Tuder et al, 2007a).

Die Endothelschädigungen steht des Weiteren auch im Zusammenhang mit der Bildung von *in situ* Thrombosen (Davies & Morrell, 2008). Auf Grund der verminderten Blutflussgeschwindigkeit in Folge der Gefäßverengung und dem Mangel an antithrombotischen Molekülen (Prostazyklin und Stickstoffmonoxid - NO) wird die Bildung von Thrombosen in den pulmonalen Gefäßen begünstigt und die pulmonale Hypertonie verschlimmert (Budhiraja et al, 2004).

Die adventitiellen Veränderungen beinhalten sowohl die Proliferation von Fibroblasten als auch das Auftreten von Fibrose (Archer et al, 2010; Davies & Morrell, 2008). Die hyperproliferativen adventitiellen Fibroblasten können sich dabei zum Einen in SMC differenzieren und in die Media einwandern, oder zum Anderen die Proliferation von SMC stimulieren, indem sie Wachstumsfaktoren sezernieren (Tuder et al, 2007a).

Diese Proliferation der SMC in der Media wird als die wichtigste pathologische Veränderung in der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) angesehen (Mandegar et al, 2004). Während die SMC-Schicht der Media ca. 10 – 15 % der Gefäßwanddicke bei normal muskularisierten pulmonalen Arterien ausmacht, so erreicht sie in Lungen von IPAH-Patienten Werte von 30 – 60 % (Tuder et al, 2007a). Neben der Media-Verdickung in den Arterien des Lungengefäßbaums führt die SMC-Proliferation auch zur *de novo* Muskularisierung. Diese Phänomen wird durch die

Migration von SMC in teilweise muskularisierte oder auch nicht-muskularisierte kleine periphere Arterien ausgelöst (Rabinovitch, 2008). Die SMC können dabei auch in Folge der Differenzierung von Vorläuferzellen neu gebildet werden (Jeffery & Wanstall, 2001). In Bereichen mit gesteigerter/erhöhter Muskularisierung kann es außerdem zur Ausbildung von neointimalen Läsionen kommen, welche auf die dysregulierte Proliferation von SMC, sowie auf die Deposition von extrazellulären Matrix-Proteinen zurück gehen (Budhiraja et al, 2004; Humbert et al, 2004).

In schweren Formen der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH) kann sich zusätzlich zwischen dem Endothel und der Lamina eine Schicht, die Neointima, bestehend aus Myofibroblasten und extrazellulärer Matrix ausbilden (Humbert et al, 2004).

Inzwischen sind mehrere Faktoren und Signaltransduktionswege identifiziert worden, die für den vaskulären Gefäßumbauprozess verantwortlich gemacht werden. Zum Einen liegt in Folge der endothelialen Dysfunktion (**Abbildung 3**) ein Ungleichgewicht zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren vor (Davies & Morrell, 2008; Rabinovitch, 2008). Während die Bildung von gefäßerweiternden, vasodilatatorischen Mediatoren (z.B. Prostaglandin 1, Stickstoffmonoxid – NO, zyklisches Guanosin-Monophosphat – cGMP) reduziert ist, ist die Synthese potenter gefäßverengender Vasokonstriktoren (z.B. Thromboxan, Endothelin 1, Serotonin, Angiotensin II,) erhöht (Giaid et al, 1993; Schermuly et al, 2011). Neben dem Einfluss auf den Gefäßtonus, sind vasokonstriktorische Mediatoren auch als pro-proliferative Mediatoren charakterisiert worden. Endothelin und Serotonin potenzieren beispielsweise das Proliferations-Verhalten der SMC in der Gefäßwand (Jeffery & Morrell, 2002; Rabinovitch, 2008). Nach wie vor versuchen die meisten Therapie-Formen der PAH in diese Imbalance einzugreifen (Davies & Morrell, 2008).

Auch Ionenkanälen kommt eine Rolle an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie zu. Ihr verändertes Expressions-Verhalten und/oder veränderte Funktionalität stehen in Verbindung mit Veränderungen im Gefäßtonus und der zellulären Homöostase (Schermuly et al, 2011). In einigen Formen der PAH (unter anderem in der IPAH) wird eine verminderte Expression von spannungsabhängigen K^+ (Kv)-Kanälen beobachtet. In Folge der Membrandepolarisation öffnen sich intrazelluläre spannungs-abhängige Ca^{2+} -Kanäle. Mit dem Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration wird die

Vasokonstriktion initiiert und die Proliferation begünstigt (Humbert et al, 2004; Rabinovitch, 2008).

Neben Vasodilatoren/Vasokonstriktoren und Ionenkanälen sind auch Wachstumsfaktoren am vaskulären Gefäßumbauprozess und der pulmonalen Hypertonie involviert. Über die Bindung an Tyrosin-Kinase Rezeptoren in der Zellmembran induzieren sie intrazelluläre Signaltransduktionswege, die das Proliferations-, das Migrations- und das Apoptose-Verhalten von Zellen steuern und beeinflussen. Wachstumsfaktoren mit einer Verbindung zur Pathogenese der pulmonalen Hypertonie sind VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und der VEGF Rezeptor 2 (VEGFR-2), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), HGF (*hepatocyte growth factor*) und TGF- β (*transforming growth factor beta*) (Schermyly et al, 2011).

Neben dem erhöhten Proliferations-Verhalten der Zellen spielt auch die chronische Inflammation mit der vermehrten Synthese von Zytokinen (unter anderem Interleukin 1 und 6 – IL-1 und IL-6) und Chemokinen eine Rolle beim vaskulären Gefäßumbauprozess (Humbert et al, 2004; Rabinovitch, 2008; Schermuly et al, 2011). Inflammatorische Zellen (Monozyten, Makrophagen, T-Lymphozyten, und dendritische Zellen) kommen darüber hinaus in plexiformen und anderen Läsionen vor und tragen zur Entstehung und der Vergrößerung dieser Läsionen bei (Schermyly et al, 2011).

1.3.2 Mechanismen des pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozesses

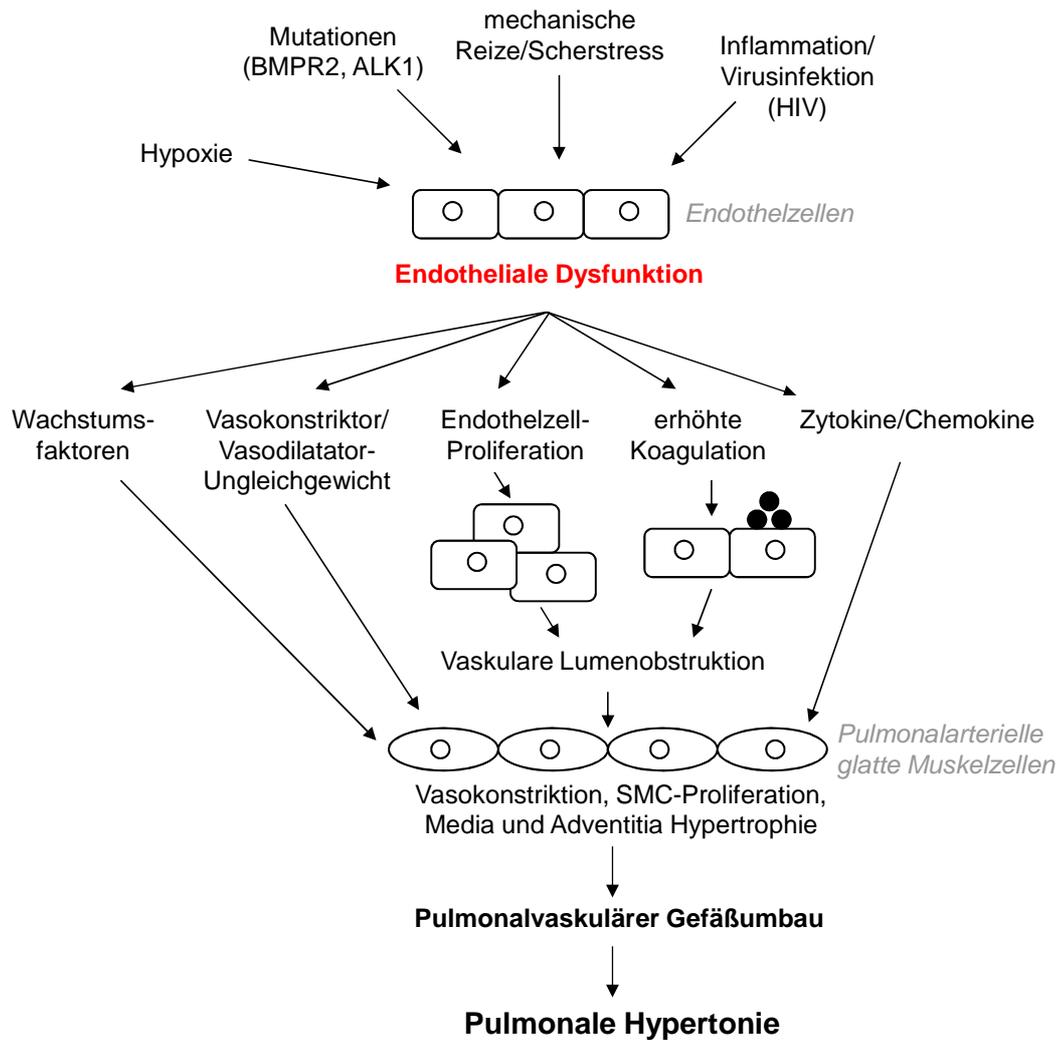
Neben verschiedensten zuvor aufgeführten Mediatoren (vasoaktive Substanzen, Wachstumsfaktoren, inflammatorische Zytokine und Chemokine) kann der pulmonalvaskuläre Gefäßumbauprozess auch durch physikalische Reize (z.B. mechanische Reize, Scherstress) und durch die bereits in **Abschnitt 1.1** aufgeführte Hypoxie ausgelöst werden (Jeffery & Wanstall, 2001). Die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie wird wie bereits unter **Abschnitt 1.2** erwähnt, der Gruppe 3 der Klassifikation der pulmonalen Hypertonie zugeordnet, obwohl sie auch hauptsächlich die arteriellen Gefäße betrifft (Stenmark et al, 2006).

Es ist letztendlich davon auszugehen, dass der Gefäßumbauprozess nicht durch einen Faktor alleine induziert wird, sondern, dass vielmehr eine synergistische Kombination

aus sowohl chemischen Reizen, als auch physikalischen Stimuli für den Gefäßumbau verantwortlich ist (Jeffery & Wanstall, 2001).

Folgenden Veränderungen finden als Antwort auf physikalische Reize statt: die vermehrte Synthese an Proteinen der extrazellulären Matrix, die Hypertrophie der SMC und die Proliferation von SMC und Fibroblasten (Jeffery & Wanstall, 2001). Möglicherweise werden durch die mechanischen Reize weiterhin mechanosensitive Ionenkanäle aktiviert, es kommt zum Ca^{2+} -Einstrom und/oder erhöhtem Phosphatidylinositol Metabolismus (Jeffery & Wanstall, 2001), der für die Weiterleitung von extrazellulären Signalen in die Zelle von Bedeutung ist.

Innerhalb der Gruppe der chemischen Reize induziert Hypoxie eine pulmonale Vasokonstriktion, welche zur Erhöhung des Drucks, der Spannung und des Scherstress führt. Diese Stimuli stellen wiederum Reize für den Gefäßumbau dar (Jeffery & Wanstall, 2001). Es entsteht der zuvor unter **Abschnitt 1.1** beschriebene positive *feedback* Mechanismus. Neben der Vasokonstriktion ist Hypoxie auch ein Stimulus für die Produktion und/oder die Ausschüttung von mitogenen (pro-proliferativen) Faktoren aus SMC und Endothelzellen (z.B. VEGF und Endothelin 1) und die verminderte Freisetzung von anti-mitogenen (anti-proliferativen) Faktoren (z.B. Prostazyklin). Des Weiteren kann Hypoxie auch Transkriptionsfaktoren wie den Hypoxie-induzierten Faktor (*hypoxia-inducible factor* – HIF) stabilisieren und damit dessen Aktivität verlängern und so die Expression von Ziel-Genen regulieren (Shimoda & Semenza, 2011).



(geänderte Abbildung nach (Budhiraja et al, 2004))

Abbildung 3: Modell der endothelialen Dysfunktion in der pulmonalen Hypertonie und dem pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess.

Mechanische Reize durch einen Blutdruckanstieg, inflammatorische Ereignisse z.B. in Folge viraler Infektionen (HIV), alveolare Hypoxie und genetische Prädispositionen (BMPR2, ALK1 Mutationen) gelten als Auslöser für eine endotheliale Dysfunktion. In Folge der Endothel-Schädigung tritt ein Ungleichgewicht zwischen vasokonstriktischen und vasodilatatorischen Mediatoren, eine Proliferation der Endothelzellen, eine vermehrte Synthese und Ausschüttung von pro-proliferativen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen, sowie eine verminderte Synthese von anti-koagulierenden Faktoren auf. Es kommt schließlich zur Vasokonstriktion, zur Proliferation der glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells* – SMC) und zur Adventitia und Media-Verdickung. Dieser pulmonale Gefäßumbauprozess charakterisiert schließlich die pulmonale Hypertonie.

1.3.3 Konsequenzen des pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozesses

Der pulmonalvaskuläre Gefäßumbauprozess führt zu mehreren Veränderungen in der Gefäßwand. Zum Einen entsteht durch die Zunahme der Zahl gatter Muskelzellen in der Gefäßwand und die *de novo* Muskularisierung eine zunehmende Wandspannung der Gefäße als Antwort auf kontraktile Stimuli. Des Weiteren findet eine Lumenverengung einiger pulmonaler Arterien, in Folge der Media-Verdickung und der Intima-Proliferation statt, welches steigende Auswirkungen auf den pulmonalvaskulären Widerstand und Druck hat. Letztendlich bewirkt die Deposition von extrazellulären Matrix-Proteinen in der Media und Adventitia eine reduzierte Compliance (Jeffery & Wanstall, 2001; Tozzi et al, 1994), das heißt, dass die Arterien weniger dehnbar sind. Es muss demnach vom Herz mehr Arbeit aufgewendet werden, um das gleiche Volumen an Blut durch die weniger elastischen Lungengefäße zu befördern. Der rechte Herzmuskel adaptiert zunächst an diese erhöhte Arbeitslast und hypertrophiert. Schließlich kann die erhöhte Arbeitslast nicht mehr kompensiert werden was schließlich zum Rechtsherzversagen und Tod führt (Chin & Rubin, 2008; Galie et al, 2009; Humbert et al, 2004), insofern die pulmonale Hypertonie unbehandelt bleibt.

1.4 Integrine als Mechanotransduktoren

Arterienwände dehnen sich in Folge des Blutdruckanstiegs aus. Auf die glatten Muskelzellen (SMC) der Arterienwand wirken an den Stellen, wo sie an extrazelluläre Matrix-Proteine adhären, diese externen mechanischen Kräfte. Um adaptive Antworten auf diese Reize hin initiieren zu können, müssen an diesen Kontaktpunkten/Adhäsionsstellen Mechanismen zur Reiz-Detektion vorhanden sein (Gunst et al, 2003).

Integrine sind transmembrane, mechanosensitive Glykoproteine, die die Hauptverbindung des Zell-Zytoskeletts zu der extrazellulären Matrix herstellen (Katsumi et al, 2004). Ein Integrin-Molekül setzt sich aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammen (Defilippi et al, 1999; Sheppard, 2003), die jeweils eine kurze intrazelluläre C-terminale und eine große extrazelluläre N-terminale Domäne aufweist (Hynes, 2002). Während die N-terminale Domäne die Verbindung der Zellen zu extrazellulären Matrix-Proteinen (z.B. Laminin oder Fibronectin) herstellt, so ist die C-

terminale Domäne mit intrazellulären Signalproteinen assoziiert, die wiederum die Verbindung zum Zell-Zytoskelett herstellen (**Abbildung 4**).

Ihre Mechanosensitivität befähigt die Integrine zur Detektion äußerer mechanischer Reize (Katsumi et al, 2004). Da die Integrine jedoch selbst keine katalytische Aktivität aufweisen, sind sie auch nicht zur eigenständigen Signaltransduktion in der Lage (Sheppard, 2003). Die *scaffold*-Funktion der zytoplasmatischen Domäne kann jedoch die Aggregation von Signalproteinen an die intrazelluläre Domäne induzieren (Sheppard, 2003) und erlaubt durch die Umwandlung von mechanischen Reizen in chemische Signale (Katsumi et al, 2004) die Signaltransduktion und damit die Signalweiterleitung.

Werden Zellen mechanisch gereizt/stimuliert, ändern die Integrine zunächst in Folge der Reiz-Detektion ihre Konformation (Katsumi et al, 2004), bevor schließlich ihre Dichte an der betreffenden Adhäsions-Stelle erhöht wird. Dieser Vorgang wird als *Integrin-clustering* (Zusammenlagerung) bezeichnet. Des Weiteren verstärken sich die betreffenden Anheftungspunkte der Zellen an die extrazelluläre Matrix, indem sich fokale Adhäsionskomplexe aus- und umbilden. Fokale Adhäsionskomplexe bestehen aus Integrinen und zytoskeletalen Signalproteinen, die mit der zytoplasmatischen Domäne der Integrine assoziiert sind, und die wie bereits oben erwähnt, die Verbindung zum Zell-Zytoskelett herstellen (Burrige & Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Bei den durch das *Integrin-clustering* verursachten Veränderungen in den fokalen Adhäsionskomplexen kommt schließlich die *scaffold*-Eigenschaft der C-terminalen Domäne der Integrine zum Tragen. Sie induziert sowohl die Ausbildung neuer Protein-Protein Bindungen, als auch die Modulation enzymatischer Aktivität in diesen Komplexen (Katsumi et al, 2004).

Eines der Schlüsselproteine der fokalen Adhäsionskomplexe ist die *focal adhesion kinase* (FAK). In Folge des *Integrin-clustering* wird die *focal adhesion kinase* von Anker-Proteinen wie Talin zu den fokalen Adhäsionskomplexen rekrutiert, am Tyrosin-Rest 397 autophosphoryliert und damit aktiviert (Schlaepfer et al, 1994). Diese Aktivierung wiederum kann Bindestellen für weitere Signalproteine wie für das Proto-Onkogen Tyrosin-Protein Kinase Src generieren (Schlaepfer et al, 1994), welches schließlich die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes 576 von FAK induziert (Siesser & Hanks, 2006). Des Weiteren hat die *focal adhesion kinase* Bindestellen für weitere

Adapter-Proteine. Die Komplexität der Integrin-regulierten Signaltransduktionswege wird so deutlich erhöht.

Beispiele für Integrin-regulierte Signaltransduktionswege sowie deren Aufgaben sind: Änderungen im Phosphorylierungs-Zustand von Proteinen, des pH-Werts, des Ca^{2+} -Spiegels, sowie die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein-Kinase (MAPK, speziell der *extracellular signal-regulated* Kinase, Erk) und Rho GTPase-Kaskade und die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (*reactive oxygen species* - ROS) zu induzieren bzw. zu regulieren (Defilippi et al, 1999; Schwartz, 2010). All diese Signalwege münden schließlich im Umbau des Aktin-Zytoskeletts, welches unter anderem Voraussetzung für die Proliferation, die Migration und die Apoptose von Zellen sowie die Genexpression ist (Katsumi et al, 2004) (**Abbildung 4**). Die Adhäsion von Zellen über Integrine an die extrazelluläre Matrix ist demnach maßgebend an der normalen Physiologie der Zellen und so auch an der Entwicklung des ganzen Organismus beteiligt.

In Folge von Blutdruckänderungen wirken auf die Zellen enorme Kräfte. Um diesen stand halten zu können, wird von den Zellen eine Art Schutzmechanismus in Gang gesetzt (Isenberg & Tranquillo, 2003). Es wird eine vermehrte Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix (Fibronectin, Vitronectin, Kollagen Typ I, Laminin und Osteopontin) als Antwort auf mechanische Reize induziert (Schwartz). Werden die auf die Zellen wirkenden Kräfte schließlich zu groß, können diese regulatorischen Mechanismen letztendlich auch zu Erkrankungen wie der pulmonalen Hypertonie oder der Hypertrophie des Herzens führen (Schwartz, 2010; Turner, 2000a).

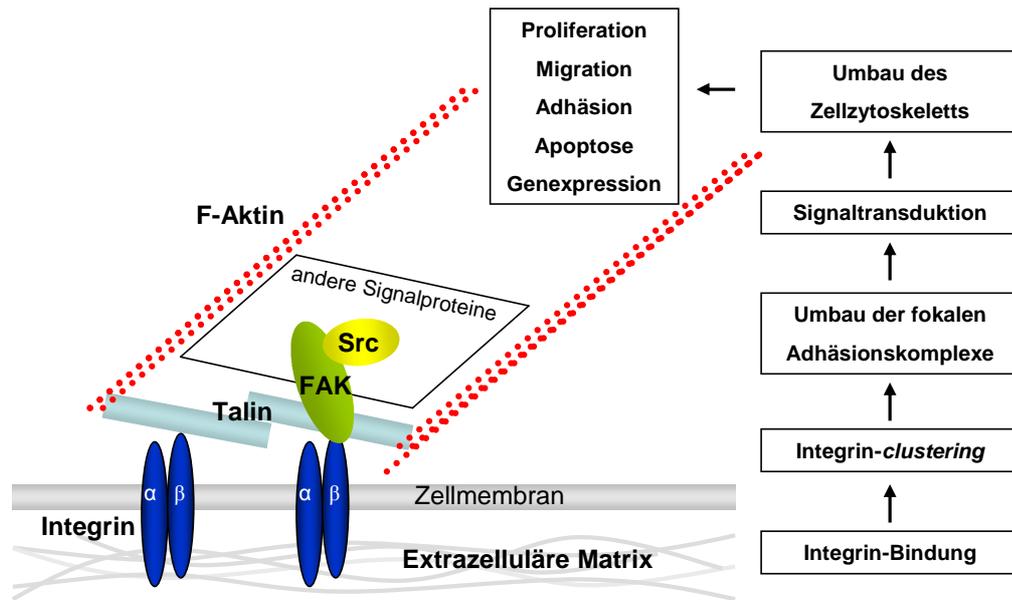


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion in Folge der Zell-Adhäsion.

Die Bindung der transmembranen Integrine an Proteine der extrazellulären Matrix induziert ein Zusammenlagern (*clustering*) der Integrine. In Folge des *clustering*s kommt es zu Umbauten in den fokalen Adhäsionskomplexen und schließlich zu Änderungen in Signaltransduktionswegen, die Änderungen im Zell-Zytoskelett bedingen. Umbauten im Zytoskelett der Zellen sind Voraussetzung für die Proliferation, Migration, Adhäsion und Apoptose von Zellen. FAK = *focal adhesion kinase*; Src = Proto-Onkogen Tyrosin-Protein Kinase Src.

1.5 LIM-Proteine

Das Aktin-Zytoskelett ist von entscheidender Bedeutung für verschiedenste zelluläre Aktivitäten, z.B. bei der Motilität, der Zell-Zell-, oder Zell-Substrat-Interaktion, der Ausbildung von fokalen Adhäsionskomplexen, der Zytokinese, der Proliferation, der Entwicklung und der Signaltransduktion (Feuerstein et al, 1994; Khurana et al, 2002; Robinson et al, 2003). Die Regulation des Aktin-Zytoskeletts erfolgt dabei über Aktin-bindende Proteine, darunter die Familie der LIM-Proteine (Khurana et al, 2002). LIM-Proteine können dabei entweder direkt oder über andere regulatorische Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett assoziieren.

LIM-Proteine werden Proteine mit einer oder mehreren LIM-Domänen genannt. Die LIM-Domäne ist dabei nach den Anfangsbuchstaben der drei Transkriptionsfaktoren

lin-11, Isl-1 und mec-3 benannt, in denen sie zum Ersten mal identifiziert wurde (Khurana et al, 2002). Die LIM-Domäne ist ein sehr konserviertes Motiv, das in einer Vielzahl von Proteinen, die sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär vorkommen, auftritt (Chu et al, 2000). Sie ist Cystein-reich und weist ein doppeltes Zinkfinger-Motiv auf, welches für die charakteristische Sekundär- und Tertiär-Struktur der Domäne von Bedeutung ist (Dawid et al, 1998).

LIM-Domänen sind von entscheidender Voraussetzung für Protein-Protein-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren, Signal- oder zytoskeletalen Proteinen (Bach, 2000; Robinson et al, 2003). LIM-Domänen binden dabei an LIM-Domänen anderer Proteine - als Folge entstehen Proteinkomplexe (Khurana et al, 2002). Proteine mit der Eigenschaft Proteine zu einem Proteinkomplex rekrutieren zu können und dadurch Signaltransduktionswege zu regulieren, werden auch als *scaffold* Proteine bezeichnet und sind unter den LIM-Proteinen weit verbreitet (Bach, 2000; Kolch, 2005).

Neben dem Einfluss auf zelluläre Prozesse sind viele LIM-Proteine auch an der Differenzierung und Funktion von quer gestreiften Muskeln beteiligt (Chu et al, 2000; McGrath et al, 2006; McGrath et al, 2003).

1.5.1 Die Familie der *four and a half LIM domains* Proteine

Die Familie der *four and a half LIM domains* (Fhl) -Proteine setzt sich aus den Proteinen Fhl-1, Fhl-2, Fhl-3 und Fhl-4 zusammen (Chu et al, 2000). Alle Mitglieder dieser Familie weisen N-terminal eine halbe, gefolgt von vier LIM-Domänen auf (Lee et al, 1998). Exprimiert werden Fhl-1, Fhl-2 und Fhl-3 in der adulten Maus und im Menschen überwiegend in der Herz- und Skelettmuskulatur (Chu et al, 2000; Khurana et al, 2002), Fhl-4 wird ausschließlich im murinen Hoden gebildet (Morgan & Madgwick, 1999).

In der Maus wird Fhl-1 hauptsächlich im Skelettmuskel und in der Lunge exprimiert; in einem geringeren Ausmaß auch im Herz, im Gehirn und in der Niere (Chu et al, 2000). Bei dem Protein Fhl-1 handelt es sich weiterhin um ein Protein mit Einfluss auf die Entwicklung und Funktion von Muskeln (Chu et al, 2000). Patienten mit Herzversagen durch Hypertrophie oder mit IPAH weisen eine deutlich erhöhte Expression von Fhl-1

im Herz bzw. der Lunge auf (Hwang et al, 1997; Kwapiszewska et al, 2008). In Sarkomeren der Herzmuskelzellen ist Fhl-1 Teil eines Komplexes, der biomechanische Reize wahrnimmt und dann über das Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAPK) *signalling* zur Hypertrophie des Herzens führt (Sheikh et al, 2008).

1.6 Zielsetzung der Arbeit/bearbeitete Fragestellung

Kwapiszewska et al. konnten Fhl-1 als ein mögliches neues Schlüsselprotein im vaskulären Gefäßumbauprozess identifizieren, welcher die pulmonale Hypertonie charakterisiert (Kwapiszewska et al, 2008). Es wurde gezeigt, dass Änderungen im Expressionsniveau von Fhl-1 zelluläre Prozesse beeinflussen, die sich durch eine Dysregulation in der pulmonalen Hypertonie auszeichnen. Während beispielsweise eine erhöhte Fhl-1 Expression das Migrations- und Proliferations-Verhalten von PASMC potenzierte, wurde es durch eine verminderte Fhl-1 Expression inhibiert.

Obwohl in dieser vorherigen Studie der Einfluss von Fhl-1 auf die pulmonale Hypertonie gezeigt werden konnte, sind die molekularen Mechanismen, welche die Organisation des Aktin-Zytoskeletts regulieren nach wie vor nicht bekannt. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, neue mögliche Interaktionspartner von Fhl-1 zu identifizieren und deren Beteiligung an den Pathomechanismen der pulmonalen Hypertonie zu untersuchen, um die Bedeutung von zytoskeletalen Proteinen für den Gefäßumbauprozess bei der pulmonalen Hypertonie schließlich besser verstehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

ABI 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems, Freiburg
ChemiGenius Bio Imaging System	VWR, Bruchsal
Combi-Spin Zentrifuge	Kisker-Biotech, Steinfurt
DM6000B Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
DMR Mikroskop (Fluoreszenzmikroskopie)	Leica Microsystems, Wetzlar
Elektrophorese-Kammer	Keutz Labortechnik, Reiskirchen
Filmentwicklungsmaschine Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
Gradienten PCR-iCycler	Bio-Rad, München
Heizblock <i>dry bath incubator</i>	Kisker-Biotech, Steinfurt
Heizplatte Hi 1220	Leica Microsystems, Wetzlar
Hotplate/Stirrer (371)	VWR, Bruchsal
Kryostat CM 1850 UV	Leica Microsystems, Wetzlar
Laser Microbeam System	P.A.L.M., Bernried
<i>laser-scanning</i> Konfokal-Mikroskop (LSM 510 Meta)	Zeiss, Göttingen
Magnetischer Konzentrierer Dynal MPC	Invitrogen, Karlsruhe
Mini-PROTEAN® Tetra Cell (EMSA und Western Blotting Equipment)	Bio-Rad, München
MinUVIS-Lampe (UV-Crosslinking Gerät)	Sarstedt, Nümbrecht
Mischgerät RM5	CAT Ingenieurbüro, M. Zipperer GmbH, Staufen
NanoDrop (ND-1000)	Kisker-Biotech, Steinfurt
Neubauer-Zählkammer	LO – Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Reinstwasseranlage Milli-Q®	Millipore, Schwalbach
Schüttelgerät Eb Swip KL-2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Spannungsgerät für Elektrophorese EPS 600	Pharmacia Biotech AG, Dübendorf

Sterilbank HERA Safe KS 12	Thermo Scientific, Dreieich
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen
TPersonal Thermocycler (PCR-Cycler)	Biometra, Göttingen
VERSA _{max} <i>lunable microplate reader</i>	Molecular Devices, Ismaning
Vortexer MS1 <i>Minishaker</i>	IKA GmbH, Staufen
Zellinkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Verwendete Materialien und Chemikalien

0,9 %ige NaCl-Lösung	B. Braun, Melsungen
2-Propanol	Merck, Darmstadt
ABgene [®] PCR-Platten	Thermo Scientific, Hamburg
ABsoluteQ PCR <i>seal</i>	Thermo Scientific, Hamburg
Aceton	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Fermentas, St. Leon-Rot
Agarose Type VII (niedrig schmelzend)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Amersham ECL Plus	GE Healthcare, München
<i>Western Blotting Detection System</i>	
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Promega, Mannheim
Ampuwa [®] (Ampullenwasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg v.d.H.
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Beatmungsgas (50 % O ₂ , 50 % N ₂)	Air Liquid, Siegen
Blotting-Papier Whatman	Schleicher & Schuell, Dassel
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module</i>	Thermo Scientific, Hamburg
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete [™] Protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Cronex 5 Medical X-Ray Film	AGFA, Mortsels, Belgien
Deckgläser	R. Langenbrinck, Emmendingen

Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol 70 %, 96 % und 100 %	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Ethanol (reinst) für die Molekularbiologie	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fe ₃ O ₄ -Kügelchen (Eisen-II, III-Oxid, 98 %)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Filterpapier	Bio-Rad, München
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Guanidinthiocyanat (GTC)	AppliChem, Darmstadt
Hämalaun	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster
Heparin Liquemin N 25000 [®]	Roche, Basel, Schweiz
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml Ketamin [®]	Pharmacia, Erlangen
Kollagenase Type IV	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Steinheim
Laemmli Proben-Puffer (2x)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lidocainhydrochlorid 2 % Xylocain [®]	Astra Zeneca, Wedel
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Medetomidin	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Methylgrün	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Microlance™ 3 Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Monocrotalin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN ₃)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Promega, Mannheim

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumvanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nylon-Membran, Amersham Hybond™-N ⁺	GE Healthcare, München
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe
PCR-Reaktionsgefäße	Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe
PeqGOLD Proteinase K	Peqlab, Erlangen
PeqGOLD TriFast™	Peqlab, Erlangen
Pertex	Medite Medizintechnik, Burgdorf
Protein A-Sepharose™ CL-4B Kügelchen	GE Healthcare, München
PVDF-Membran Immobilon™-P	Millipore Corporation, Bedford, USA
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid)	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Sarcosyl	AppliChem, Darmstadt
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sterilfilterspitzen	Nerbe plus GmbH, Wiesen/Luhe
SYBR® Safe	Invitrogen, Karlsruhe
Tergitol® (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
TissueTek®	Sakura Finetek, Staufen
TRIS Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton®-X 100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin	Zymed Laboratories Inc., Karlsruhe
Tubes BluCup	Greiner bio-one, Frickenhausen
Tween® 20	AppliChem, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe
Zitronensäure (Na ₃ Citrat)	Merck, Darmstadt

2.1.3 Seren, Antibiotika, Medien und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

8-Well Chamber Slides	BD Falcon, Heidelberg
fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Cölbe
Fibronektin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fluoreszenz Vectashield Eindeckmedium <i>including DAPI</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
L-Glutamin (200mM, 100x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Medium 199 (M199)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM [®] Medium	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (human)	Lonza, Köln
Serologische Pipetten 5, 10, 25, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
<i>Smooth Muscle Cell Growth Medium 2</i>	PromoCell, Heidelberg
Sterilfilter, Porengröße 0,22 µm	Millipore, Schwalbach
Trypsin/EDTA (1x)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Zellkulturflaschen, -schalen, -platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellschaber	Greiner bio-one, Frickenhausen
X-tremeGENE	Roche, Mannheim

2.1.4 Größenstandards

<i>Precision plus Protein™ Dual Color Standard</i>	Bio-Rad, München
--	------------------

2.1.5 Verwendete Kits und Assays

BCA Assay	Pierce, Rockford, USA
CaspACE Assay System	Promega, Mannheim
ImmPRESS Anti-Kaninchen Ig Polymer Detektions-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
iScript cDNA Synthese Kit	Bio-Rad, München

<i>LightShift Chemiluminescent</i> EMSA Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
<i>NE-PER</i> [®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
PeqGOLD Total RNA Kit	Peqlab, Erlangen
Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix UDG	Invitrogen, Karlsruhe
PXG β -Galaktosidase-Assay	Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Schweiz
QIAquick [®] PCR Purifikation Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Micro Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Mini Kit	Qiagen, Hilden
VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA
WT-Ovation [™] Pico RNA Amplifikations-System	Nugene, Bemmle, Niederlande

2.1.6 Verwendete Antikörper

2.1.6.1 Primärantikörper

<i>α-smooth muscle actin</i>	Maus: Sigma Aldrich, Steinheim Kaninchen: NeoMarkers, Fremont, USA
β -Aktin	Biozol, Eching
Akt	Cell Signaling, Boston, USA
phospho-Akt	Serin 473; Cell Signaling, Boston, USA
Erk1/2	Cell Signaling, Boston, USA
phospho-Erk1/2	Threonin 202/Tyrosin 204; Cell Signaling, Boston, USA
FAK	Cell Signaling, Boston, USA
phospho-FAK	Tyrosin 397; Epitomics, Burlingame, USA Tyrosin 576; Epitomics, Burlingame, USA
Fhl-1	Ziege und Kaninchen; beide von Abcam, Cambridge, UK
IgG	Millipore, Schwalbach (IHC-P) R&D Systems, Minneapolis, USA (Co-IP)
Ki67	Abcam, Cambridge, UK

LexA	Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Schweiz
Paxillin	Maus: Abcam, Cambridge, UK
	Kaninchen:
	BD Transduction Laboratories, Heidelberg (Co-IP)
	Abcam, Cambridge, UK (WB, ICH-P, IF)
phospho-Paxillin	Tyrosin 31; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
	Tyrosin 118; Cell Signaling, Boston, USA

2.1.6.2 Sekundärantikörper

Alexa Fluor [®] 488	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 555	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor [®] 568 Phalloidin	Invitrogen, Karlsruhe
Meerrettich-Peroxidase gekoppelt	Pierce, Rockford, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Die *Yeast two-Hybrid* Analyse

Die *Yeast two-Hybrid* Analyse ist eine Methode zur Identifikation unbekannter Protein-Protein Interaktionen.

Im Rahmen einer von der Europäischen Union geförderten Kooperation führte die Firma Dualsystems Biotech AG (Schlieren, Schweiz) eine *Yeast two-hybrid* Analyse durch, um neue, bisher unbekannte Interaktionspartner-Kandidaten von Fhl-1 zu identifizieren. Für das *bait*-Konstrukt wurde die für das murine Fhl-1 codierende cDNA (NM_001449) N- bzw. C-terminal von der LexA Domäne in den Vektor pLexA-DIR (Dualsystems Biotech AG) kloniert. Das *bait*-Konstrukt wurde dann in den Stamm NMY32 (MATa his3 Δ 200 trp1-901 leu2-3,112 (lexAop)₈-ADE2 LYS2::(lexAop)₄-HIS3 URA3::(lexAop)₈-lacZ GAL4) transformiert. Vorgegangen wurde dazu nach einem Standardprotokoll (Gietz & Woods, 2001). Die korrekte Expression des *bait*-Konstrukts in den Zellen wurde mittels Western Blot Analyse und einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen die LexA Domäne verifiziert. Um eine Selbst-Aktivierung auszuschließen wurde das *bait*-Konstrukt zusammen mit einem Kontroll-*prey*-Konstrukt (p53 oder Lamin C) transfiziert und auf einem Minimalmedium (Medium ohne die Aminosäuren Tryptophan, Leucin und Histidin) selektiert.

Für die *Yeast two-Hybrid* Analyse wurde schließlich das *bait*-Konstrukt zusammen mit einer cDNA-Bibliothek aus der Mauslunge in den Hefestamm NMY32 transformiert. Es wurden 6×10^6 (LexA-Fhl-1) und $9,5 \times 10^6$ (Fhl-1-LexA) Transformanten untersucht, wobei 22 bzw. 91 Transformanten auf dem Minimalmedium wuchsen. Positive Transformanten wurden mittels eines P_{XG} β -Galaktosidase-Assays auf β -Galaktosidase-Aktivität getestet. 21 der 22 und 47 der 91 ursprünglich positiven Transformanten zeigten β -Galaktosidase-Aktivität und wurden als wahre positive Klone angesehen. Plasmide aus positiven Klonen wurden isoliert und in einem *bait*-abhängigen Test mit den Kontroll-*bait*-Konstrukten LexA-Lamin C bzw. LexA-p53 untersucht (Kolonin et al, 2000). 20 der 21 und 47 der 91 positiven Klone zeigten β -Galaktosidase-Aktivität wenn sie zusammen mit dem *bait*, nicht aber mit dem Kontroll-*bait*-Konstrukt, exprimiert wurden. Sie wurden als *bait*-abhängige positive Interaktoren angesehen und durch Sequenzierung bestimmt.

2.2.2 Zellkultur

Kommerziell erworbene humane, primäre pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (*pulmonary arterial smooth muscle cells* - PASMC) wurden in *Smooth Muscle Cell Growth Medium 2*, inklusive Wachstumsfaktoren (*Supplement-Mix*: 0,5 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor - EGF; 2 ng/ml einfacher Fibroblasten-Wachstumsfaktor - bFGF; 5 µg/ml Insulin; 5 % fetales Kälberserum - FCS) kultiviert und bei 37°C in befeuchteter Luft und 5 % CO₂ inkubiert. PASMC in den Passagen fünf bis neun wurden für Experimente verwendet.

Primäre mikrovaskuläre PASMC wurden von technischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe (Miriam Wessendorf und Carmen Homberger) aus präkapillaren Gefäßen von C57BL/6J Mäusen (20 bis 22 g Körpergewicht; Charles River Laboratories, Sulzfeld) isoliert (Anzeigennummer: Gi 20/10 28/2009). Die Mäuse wurden dazu mit einer letalen, intraperitoneal Injektion von Xylocain[®] (25 µg/g Körpergewicht) und Ketamin[®] (125 µg/g Körpergewicht) euthanasiert und mit Heparin (2,5 U/g Körpergewicht) antikoaguliert. Das weitere Protokoll entsprach dem im Folgenden beschriebenen Protokoll der PASMC-Isolation aus der Ratte. Die einzige Abweichung war, dass die Zellen bei der Maus im Gegensatz zur Ratte aus der ganzen Lunge isoliert wurden. Für die Experimente wurden murine PASMC in Passage eins verwendet.

Aus adulten, männlichen Kontroll- oder Monocrotalin-behandelten Sprague-Dawley Ratten (300 bis 350 g Körpergewicht; Charles River Laboratories) wurden PASMC von zwei Doktoranden der Arbeitsgruppe (Florian Veit und Oleg Pak) isoliert. Die Ratten wurden vor der Zellisolation entweder mit Methylzellulose (Kontrolle) oder mit einer einzelnen, subkutanen Injektion von 60 mg/kg Monocrotalin (MCT) behandelt, wodurch eine pulmonale Hypertonie erzeugt wurde. Getestet wurde dies 35 Tage nach der Injektion mittels hämodynamischen Messungen. Die entsprechenden Daten dazu sind Bestandteil der Doktorarbeit von Florian Veit und sind zusätzlich im Ergebnisteil dieser Arbeit aufgeführt.

Vor der Bestimmung der hämodynamischen Parameter wurden die Ratten mit einer intraperitonealen Dosis von Ketamin[®] (9 mg/kg Körpergewicht) und Medetomidin (100 µg/kg Körpergewicht) anästhesiert. Eine sich daran anschließende intraperitoneale Injektion von Atropin (250 mg/kg Körpergewicht) diente dazu vasovagale Nebenwirkungen während der Präparation zu vermeiden. Mit Heparin (2,5 U/g

Körpergewicht) wurde die Ratten weiterhin antikoaguliert. Das sich nun anschließende Protokoll zur Erhebung der hämodynamischen Parameter ist in dieser Arbeit nicht aufgeführt. Nach der entsprechenden Messung wurden die Lungenflügel mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült, indem über eine kleine Öffnung im rechten Ventrikel ein Katheter zur Pulmonalarterie vorgeschoben wurde. Eine zweite Öffnung wurde in den linken Ventrikel als Abflussmöglichkeit gesetzt. Sobald die aus dem geöffneten linken Ventrikel abfließende Flüssigkeit frei von Blut war, wurde der rechte Lungenflügel für molekulare Studien bzw. die Zellisolation verwendet. Der linke Lungenflügel wurde abgebunden und für histologische Untersuchungen verwendet.

Zur Isolation der PASMC wurde die Pulmonalarterie mit Medium 199 (1x) + Earle's + L-Glutamin (100 mg/l) mit 1 % Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml Penicillin + 10 mg/ml Streptomycin), 0,5 % niedrig-schmelzender Agarose und 0,5 % Fe₃O₄-Kügelchen luftblasenfrei perfundiert. Aufgrund ihrer definierten Größe sammelten sich die Eisenkügelchen in den präkapillaren Gefäßen an. Nach der Entnahme der Lunge und dem Verdau mit 80 U/ml Kollagenase, wurden die Fe₃O₄-Kügelchen aus dem Homogenat mit Hilfe eines Magnetkonzentrierers entfernt. Die Fe₃O₄-Kügelchen mit den daran haftenden PASMC wurden in einer Zellkulturflasche ausgesät und in Medium 199 (1x) + Earle's + L-Glutamin mit 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für Experimente wurden PASMC in der Passage zwei verwendet.

Die Tier-Experimente an den Ratten wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.2.2.1 Hypoxie-Inkubation von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen

Kommerziell erworbene humane PASMC wurden in einem Wasser-gesättigten Gasmisch von 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂ bei 37°C für die angegebenen Zeitpunkte kultiviert. Für die Protein-Isolation wurden die Zellen in NP-40 Puffer lysiert; zur RNA-Extraktion wurde TRK-Puffer verwendet.

2.2.3 Die Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation ist eine Methode, mit deren Hilfe man Protein-Protein-Interaktionen untersuchen kann. Sie wurde angewendet, um die Ergebnisse aus der *Yeast two-Hybrid* Analyse zu überprüfen und gegebenenfalls zu bestätigen.

Native humane PASMCM oder mikrovaskuläre PASMCM aus der Maus wurden in NP-40 Puffer lysiert, 30 min auf Eis inkubiert und dann bei $14\,000 \times g$ für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Protein-Konzentration des Überstandes wurde mit einem kommerziell erhältlichen spektrophotometrischen Assay (BCA Assay) bestimmt. Gleiche Proteinmengen wurden über Nacht bei 4°C mit $2\ \mu\text{g}$ Maus anti-Paxillin oder Ziege anti-Fhl-1 Antikörper, bzw. einer IgG Kontrolle inkubiert. Die Proben wurden in Reaktionsgefäße, welche Protein A-Sepharose™ CL-4B Kügelchen enthielten, überführt. Nach einer zweistündigen Inkubation wurden die Immunopräzipitate mehrmals mit Lyse-Puffer gewaschen, gekocht in 2x Laemmli Proben-Puffer, getrennt mittels reduzierender SDS-PAGE und auf eine PVDF Membran transferiert. Die Immunoblots wurden mit einem Kaninchen anti-Paxillin oder Kaninchen anti-Fhl-1 Antikörper analysiert.

2.2.4 Humanes Lungengewebe

Proben von humanen Lungen stammten von 8 Donoren (durchschnittliches Alter, 48 ± 17 Jahre; 4 Frauen, 4 Männer) und 8 IPAH Patienten (durchschnittliches Alter, 34 ± 13 Jahre; 5 Frauen, 3 Männer) nach Lungentransplantation. Die Proben wurden entweder in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren oder binnen 30 min nach der Lungenentnahme in 4 %iges (w/v) Paraformaldehyd gelegt. Das Protokoll wurde von der Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität genehmigt (AZ 31/93 und 10/06).

2.2.5 Die Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie in der Maus

C57BL/6J Wildtyp-Mäuse (20 – 22 g; Charles River Laboratories; n=5) wurden in einer ventilerten Kammer mit normobarischer Normoxie [inspiratorische O_2 Fraktion (FiO_2) 0,21] oder normobarischer Hypoxie [FiO_2 0,10] gehalten. Nach 21 Tagen wurden die

Mäuse von einer technischen Assistentin der Arbeitsgruppe (Karin Quanz) mit Heparin (1000 U/kg) antikoaguliert und mit einer letalen Ketamin[®]- (125 µg/g Körpergewicht) und Xylocain[®]-Dosis (25 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal euthanasiert. Mittels Tracheostomie wurde eine Kanüle in die Trachea eingeführt, der Thorax eröffnet und die Lungen über einen Katheter in der Pulmonalarterie mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gespült. Während der Perfusion konnte die Kochsalzlösung durch eine Öffnung im linken Ventrikel abfließen. Sobald das Perfusat frei von Blut war, wurde ca. 50°C warmes TissueTek[®] über die Trachea-Kanüle in die Lunge instilliert. Nach Ligation der Trachea wurde die Lungen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Die Tier-Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

Zur Entnahme der Aorta und der *Arteria carotis* wurden C57BL/6J Wildtyp-Mäuse (20 – 22 g; Charles River Laboratories; n=5) in einer ventilierten Kammer mit normobarischer Normoxie [FiO₂ 0,21] oder normobarischer Hypoxie [FiO₂ 0,10] gehalten. Nach einem, sieben bzw. 21 Tagen wurden die Mäuse von einer technischen Assistentin der Arbeitsgruppe (Karin Quanz) mit Heparin (1000 U/kg) antikoaguliert und mit einer letalen Ketamin[®] (125 µg/g Körpergewicht) und Xylocain[®]-Dosis (25 µg/g Körpergewicht) intraperitoneal euthanasiert. Das Herz wurde in Höhe des Aortenbogens von der Aorta getrennt, die Aorta von der anhaftenden Adventitia befreit und in sterilem, eiskaltem PBS blutfrei gespült und sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Zur Isolation der *Arteria carotis* wurde am Hals der Maus ein Schnitt gesetzt, die Karotisarterien mitsamt der Bifurkation von *Arteria carotis interna* und *externa* freipräpariert, entnommen und in sterilem, eiskaltem PBS blutfrei gespült und sofort in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Die Tier-Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt.

2.2.6 Laser-unterstützte Mikrodisektion

Um die Gen-Expression speziell in den pulmonalen Gefäßen zu untersuchen, wurden von in TissueTek[®] eingebetteten Mauslungen mit Hilfe eines Kryostaten 10 µm dicke Gefrier-Schnitte auf Glas-Objekträgern angefertigt. Nach 45 s Hämalaun-Färbung wurden die Schnitte in Wasser, 70 %iges, 96 %iges und schließlich in 100 %iges Ethanol getaucht und bis zur Mikrodisektion dort gelagert. Um diese Zeit so kurz wie möglich zu halten, wurden nicht mehr als 10 Gefrierschnitte gleichzeitig angefertigt.

Intrapulmonale Arterien mit einem Durchmesser von $< 100 \mu\text{m}$ wurden selektiert und unter optischer Kontrolle mit einer Microlance 3 Kanüle mikrodiseziert. Verwendet wurde dazu ein Laser Microbeam System. Kanülen mit adhärennten Gefäßen wurden in ein Reaktionsgefäß mit $200 \mu\text{l}$ GTC-RNA-Lyse-Puffer überführt. Pro Maus-Lunge wurden 50 Gefäße separiert und mikrodiseziert.

2.2.7 RNA Isolation

RNA aus lasermikrodisezierten Gefäßen wurde mit dem RNeasy[®] Micro Kit isoliert, mit dem WT-Ovation[™] Pico RNA Amplifikations-System amplifiziert und schließlich mit dem QIAquick[®] PCR Purifikation Kit aufgereinigt. Alle Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet.

RNA aus Lungengewebe von Mäusen (Haltung für 21 Tage in Normoxie/Hypoxie) oder von humanen Lungen-Proben (Donor/IPAH) wurde mit einer Kombination aus PeqGOLD TriFast[™] und dem RNeasy[®] Miniprep Kit isoliert. Zunächst wurden pro Lunge ca. 50 Kryoschnitte (entsprechend 50-100 mg Gewebe-Homogenat) angefertigt und in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Die Gewebeschnitte wurden mit $500 \mu\text{l}$ TriFast[™] und einer 18 g Kanüle auf Eis homogenisiert. Während einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde das Homogenat immer wieder gevortext. Nach Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Chloroform/ml TriFast[™] wurde das Homogenat 15 s geschüttelt, gevortext und schließlich 10 min bei 4°C inkubiert. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 4°C und $14\,000 \times g$ wurde die obere Phase abgenommen, mit einer äquivalenten Menge 70 %igem Ethanol in einem neuen Reaktionsgefäß gemischt und auf eine RNeasy[®] spin Säule transferiert. Das weitere Protokoll entspricht den Angaben im RNeasy[®] Mini-Handbuch.

Zur RNA-Isolation aus humanen oder Ratten PASMC wurde das PeqGOLD[®] Total RNA Kit nach Hersteller-Protokoll eingesetzt.

Aus der Aorta der und *Arteria carotis* der Maus wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy[®] Micro Kits nach den Angaben im Handbuch isoliert.

Die RNA-Konzentrationen aller Proben wurden mittels NanoDrop ermittelt und bei Bedarf wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.8 cDNA Synthese und *Real-Time* PCR

200 ng/ μ l RNA wurden mit Hilfe des iScript cDNA Synthese Kits nach Herstellerprotokoll durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Folgende Reaktionsbedingungen wurden für die cDNA-Synthese im TPersonal Thermocycler gewählt: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C und 5 min bei 85°C.

Zur Untersuchung der Genexpression wurde anschließend eine *Real-Time* PCR durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte in dem ABI 7900HT Sequence Detection System. Für die PCR-Reaktionen wurde der Platinum[®]SYBR[®]Green qPCR SuperMix UDG nach Herstellerangaben verwendet. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze war wie folgt:

Platinum [®] SYBR [®] Green qPCR SuperMix	13,0	μ l
Ampuwa [®]	8,0	μ l
50 mM MgCl ₂	1,0	μ l
<i>forward</i> Primer (10 pmol/ μ l)	0,5	μ l
<i>reverse</i> Primer (10 pmol/ μ l)	0,5	μ l
cDNA (<i>template</i>)	2,0	μ l
	25,0	μ l

Als Negativkontrolle wurde pro amplifiziertes Gen eine *non-template* Kontrolle (Mastermix ohne die Zugabe von cDNA) angesetzt und amplifiziert. Folgendes Temperaturprofil wurde verwendet: 6 min bei 95°C, [5 s bei 96°C, 5 s bei 59°C, und 10 s bei 72°C] x 45. Aufgrund der unselektiven Bindung des SYBR[®]Green I Farbstoffs an die doppelsträngige DNA wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Länge der amplifizierten Fragmente und damit die Spezifität bestimmt werden konnte. Um sicher zu stellen, dass nur das gewünschte PCR-Produkt vervielfältigt wurde, wurden die PCR-Produkte durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und visualisiert. Die Δ Ct Werte für jedes Ziel-Gen wurden wie folgt berechnet:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{housekeeping Gen}} - \text{Ct}_{\text{Ziel-Gen}}$$

Die in **Tabelle 2** aufgeführten Primer (angegeben von 5' nach 3') wurden für die *Real-Time* PCR verwendet. Die Primer wurden Intron-überspannend konstruiert und bei Metabion International AG (Martinsried) bestellt.

Tabelle 2: Sequenzen der für die *Real-Time* PCR verwendeten Primer.

Spezies	Gen	Primersequenz (von 5' nach 3')
Human	PBGD	FP: CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT
	(<i>housekeeping</i> -Gen)	RP: TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG
	Paxillin	FP: TGG ACA GCC CTA CTG TGA AA
		RP: AGA AGT GTT CAG GGT GCC A
	Fibronektin	FP: CCG ACC AGA AGT TTG GGT TCT
		RP: CAA TGC GGT ACA TGA CCC CT
Maus	PBGD	FP: GGT ACA AGG CTT TCA GCA TCG C
	(<i>housekeeping</i> -Gen)	RP: ATG TCC GGT AAC GGC GGC
	B2M	FP: AGC CCA AGA CCG TCT ACT GG
	(<i>housekeeping</i> -Gen)	RP: TTC TTT CTG CGT GCA TAA ATT
	Paxillin	FP: AAT TCC AGT GCC TCC AAC AC
		RP: GAG CTC ATG ACG GTA GGT GA
Ratte	PBGD	FP: CAA GGT TTT CAG CAT CGC TAC CA
	(<i>housekeeping</i> -Gen)	RP: ATG TCC GGT AAC GGC GGC
	Paxillin	FP: TGA GCT GGA GAA CTC TGT GC
	RP: TGA GAT TCT GGT CTG CTG CT	

FP: *forward* Primer (Vorwärtsprimer); RP: *reverse* Primer (Rückwärtsprimer)

2.2.9 siRNA-Transfektion von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen

Die siRNA-Transfektion von Zellen ist eine Methode mit deren Hilfe man gezielt die Expression eines Gen vermindern kann (im Folgenden auch als *knockdown* bezeichnet), um die Funktion des von ihm codierten Proteins aufzuschlüsseln.

Humane PASCs wurden mit 100 nM *small-interfering RNA* (kleine interferierende RNA - siRNA) transfiziert. Als Transfektions-Reagenz wurde 1 µl/cm² X-tremeGENE benutzt. Die Zielsequenz der siRNA war in der kodierenden Sequenz des humanen Paxillin (ON-TARGETplus, Thermo Scientific, Bonn), Fhl-1 (Eurogentec, Seraing, Belgien) FAK (BioSpring, Frankfurt a. M.) oder HIF-1α (Biospring, Frankfurt) Gens lokalisiert. Die Kontroll-siRNA (siR) wurde von Ambion (Foster City, CA) bezogen. Die Sequenzen der siRNAs sind in **Tabelle 3** angegeben.

Tabelle 3: Sequenzen der für die Transfektion verwendeten siRNAs.

siRNA	Sequenz
Fhl-1	5'-CCA GUA UUA CUG CGU GGA U dTdT-3'
FAK	5'-CUU AAA GCU CAG CUC AGC A55 XUG CUG AGC UGA GCU UUA AG5 5-3'
HIF-1 α	5'- UGU GAG UUC GCA UCU UGA Uddtd-3'

Fhl-1: *four and a half LIM domains*; FAK: *focal adhesion kinase*; HIF-1 α : *hypoxia inducible factor-1 α* ;
C: Cytosin; A: Adenin; G: Guanin; U: Uracil; dT bzw. 5: Deoxythymidin.

2.2.10 Der Adhäsions-, Proliferations- und Apoptose-Assay

Um den Einfluss von Paxillin auf das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer siRNA gegen Paxillin (siPxn) transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert und auf eine mit 2 μ g/ml bovinem Serum Albumin (BSA) oder 2 μ g/ml Fibronectin beschichtete 96-Well Platte ausgesät. Nach einer ca. 45minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente PASMC zu entfernen. Adhärenente, lebende Zellen wurden zunächst fotografiert. Schließlich wurden die Zellen mit einem Methanol/Aceton-Gemisch (Verhältnis 1:1) für 15 min fixiert, mit Kristallviolett für 15 min gefärbt und dann mit 100 μ l Entfärbelösung pro Well entfärbt. Die Absorption wurde bei 550 nm in einem VERSA_{max} *lunable microplate reader* gemessen.

Um zu untersuchen, ob Paxillin das Proliferations-Verhalten von humanen PASMC beeinflusst, wurde 72 Stunden post siRNA-Transfektion die Zellzahl durch Zellzählung in einem Hämazytometer bestimmt, des Weiteren wurden Immunofluoreszenz-Färbungen von humanen PASMC mit dem Proliferationsmarker Ki67 angefertigt.

72 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde in einem weiteren Assay der Einfluss von Paxillin auf das Apoptose-Verhalten von humanen PASMC bestimmt. Es wurde dazu der CaspACE Assay verwendet und nach Hersteller-Protokoll vorgegangen. Als Positiv-Kontrolle wurden die Zellen für vier Stunden mit 1 μ M Staurosporin inkubiert.

2.2.11 Kultivierung von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen auf Fibronektin

Um zu untersuchen, ob die Phosphorylierung von Paxillin durch Proteine der extrazellulären Matrix beeinflusst wird, wurden 6-Well Platten mit 5 µg/ml Fibronektin für 1 Stunde bei Raumtemperatur beschichtet. Das verbleibende Fibronektin wurde abgenommen. Die PASMC wurden auf den beschichteten Platten ausgesät, für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert und in NP-40 Puffer für die Isolation der Proteine lysiert.

2.2.12 Protein-Isolation und Western Blot Analyse

Zur Proteinisolation wurden Lungenproben durch Zermahlen in flüssigem Stickstoff zerkleinert und in 150 µl NP-40 Lyse-Puffer, welcher 2 mM Na₃VO₄ (pH 10) und 1 x Complete enthielt, aufgenommen. Die PASMC wurden unter Zugabe von 150 µl NP-40 Lyse-Puffer (incl. 2 mM Na₃VO₄ (pH 10) und 1 x Complete) mit einem Zellschaber auf Eis lysiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 14 000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Überstands wurde mit einem kommerziell erhältlichen spektrophotometrischen Assay (BCA Assay) bestimmt. Für die Western Blot Analysen wurden 20 µg/µl des Protein-enthaltenen Überstands eingesetzt, mit 10 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min auf 96°C erhitzt. Die Proteinproben wurden schließlich in einem 12 %igen SDS Polyacrylamid-Gel bei 120 V aufgetrennt (Dauer ca. 1 Stunde), gefolgt von einem 60minütigen Elektrotransfer (100 V) auf eine 0,45 µm PVDF Membran. Die Membran wurde mit 5 %iger Magermilch (w/v) in PBS-T Puffer (*Phosphate Buffer Saline* mit 0,1 % Tween20) für 1 Stunde geblockt, bevor sie über Nacht bei 4°C mit einem der folgenden Antikörper inkubiert wurde: anti-Paxillin; anti-phospho-Paxillin (Tyrosin 31, Tyrosin 118); anti-phospho-FAK (Tyrosin 397, Tyrosin 576); anti-FAK; anti-phospho-Akt (Serin 473); anti-Akt; anti-phospho-Erk1/2 (Threonin 202/Tyrosin 204); anti-Erk1/2 (alle 1:1000 verdünnt) und anti-β-Aktin (1:3000 verdünnt). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-T Puffer wurde die Membran für 1 Stunde mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem, sekundärem Antikörper (Verdünnung 1:3000) inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 15 min gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem Amersham ECL Plus *Western Blotting Detektion System*. Zur

Inkubation mit einem neuen Primärantikörper wurde der an die Membran gebundene Antikörperkomplex nach der Filmentwicklung durch die 30minütige Inkubation mit *Stripping*-Puffer entfernt.

2.2.13 Promotoranalyse

Der *sense* und *antisense*-Strang des humanen Paxillin-Promotors wurde 1500 bp vor und nach dem Paxillin-Gen nach potenziellen *hypoxia response elements* (HRE) – Bindestellen für den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF), durchsucht. Die Konsensussequenz **gcgtg** wurde sowohl für die Suche im *sense* als auch im *antisense*-Strang verwendet.

2.2.14 Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay*

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) ist eine *in vitro* Methode um DNA-Protein-Interaktionen zu charakterisieren. Mit Hilfe des EMSA ist es möglich Aussagen über die Regulation von Genen auf Transkriptionsebene zu treffen.

2.2.14.1 Sonden

Die für den EMSA verwendeten Oligonukleotid-Sonden umfassten die HRE Konsensus-Sequenz im humanen Paxillin-Promotor. Die in **Tabelle 4** angegebenen Sonden wurden konstruiert und von Metabion International AG (Martinsried) bezogen.

Tabelle 4: Sequenzen der für den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* verwendeten Sonden.

Transkriptions- faktorbindestelle	Sequenzen der Sonden (von 5' nach 3')
HRE 1	S - markiert: GCTGGAAAACCACGCAATAGAGTGT-Biotin S - unmarkiert: GCTGGAAAACCACGCAATAGAGTGT AS: ACACTCTATTGCGTGGTTTTCCAGC
HRE 2	S - markiert: GGCGGGACCAGCGTGCGCAGGGGGC-Biotin S - unmarkiert: GGCGGGACCAGCGTGCGCAGGGGGC AS: GCCCCCTGCGCACGCTGGTCCCGCC
HRE 3	S - markiert: GGCGGGGCGCGCGTGACAGGGGGC-Biotin S - unmarkiert: GGCGGGGCGCGCGTGACAGGGGGC AS: GCCCCCTGTGCACGCGCGCCCCGCC

HRE: *hypoxia response element*; S: *sense*; AS: *antisense*

Die Sonden (Biotin-markiert oder unmarkiert) wurden für 5 min bei 95°C in einem Heizblock *annealt*, das heißt aneinander gelagert und dort bis zum Erreichen der Raumtemperatur inkubiert. Die Lagerung der *annealten* Sonden erfolgte bei -20°C:

2.2.14.2 Extraktion der nukleären Proteine

Die Kultivierung der humanen PASMCM für den (EMSA) erfolgte auf 10 cm Kulturplatten. Die konfluenten Platten wurden für 2 Stunden unter Normoxie (21 % O₂) bzw. Hypoxie (1 % O₂) inkubiert, bevor die Zellen in 500 µl PBS mit 2 mM Na₃VO₄ (pH 10) und 1 x Complete auf Eis mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgeschabt wurden. Die nukleären Proteine wurden unter Verwendung des NE-PER[®] *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kits* nach Herstellerprotokoll isoliert und die Proteinkonzentration mit einem kommerziell erhältlichen spektrophotometrischen Assay (BCA Assay) bestimmt.

2.2.14.3 Assay-Durchführung

Für die Bindereaktion wurden 20 µg Nuklearextrakt mit EMSA-Puffer (1x *Binding-Puffer*, 50 ng/µl Poly(dI-dC), 2,5 % Glycerol, 0,05 % NP-40, 5 mM MgCl₂, 50 mM KCl) für 10 min bei Raumtemperatur prä-inkubiert. Nach der Zugabe von 4 pmol unmarkierter Sonde (*cold competitor*) folgte eine 20minütige Inkubation. Schließlich wurden 20 fmol der Biotin-markierten Sonde hinzugegeben, nach einer erneuten Inkubation von 20 min, wurden die Proben incl. Ladepuffer in einem 5% igen TBE-Polyacrylamidgel aufgetrennt (100 V, ca. 45 min). Das Gel wurde mittels Elektrotransfer (100 V, 45 min) auf eine Nylon-Membran geblottet, welche anschließend 10 min bei 254 nm *gexcrosslinked* wurde, das heißt der Komplex aus Sonde und Protein wurde schließlich mit der Membran vernetzt. Nach dem Blockieren und Waschen der Membran erfolgte die Detektion der Biotin-markierten DNA unter Verwendung des *Chemiluminscent Nucleic Acid Detection Modules*.

2.2.15 Immunohistochemie

Um bestimmte Proteine im Lungengewebe zu detektieren und damit zu lokalisieren, wurde die Methode der Immunohistochemie verwendet.

Die Färbungen wurden auf 3 µm dicken Paraffin-Lungengewebs-Schnitten durchgeführt. Die Entparaffinierung erfolgte dreimal für 10 min in Xylol. Die Schnitte wurden in 100 %igem Ethanol für zweimal 5 min, in 95 %igem Ethanol für einmal 5 min, in 70 %igem Ethanol für einmal 5 min, und in PBS für zweimal 5 min rehydriert. Die Antigen-Freilegung erfolgte mit 0,05 % Trypsin für 15 min bei 37°C. Das Gewebe wurde für 1 Stunde mit 10 %igem BSA (w/v) in PBS geblockt, bevor es auf humanen Schnitten mit Kaninchen anti-Paxillin (1:100) und Maus anti-*smooth muscle actin* (Aktin der glatten Muskelzellen - SMA; 1:1000), verdünnt in 10 % BSA inkubiert wurde. Auf Maus-Schnitten wurde Kaninchen anti-Paxillin (1:150) und Kaninchen α-SMA (1:350) benutzt; auf Ratten-Schnitten Maus anti-Paxillin (1:250) und Maus α-SMA (1:750). Nach viermal fünfminütigem Waschen mit PBS erfolgte die Detektion mit dem ImmPRESS Anti-Kaninchen Ig Polymer Detektions-Kit (human und Maus) bzw. dem VECTOR VIP Peroxidase Substrate Kit (Ratte). Die Schnitte wurden mit Methylgrün für 3 min bei 60°C gegengefärbt und mit Pertex eingedeckt. Als

Negativkontrolle wurde die Färbung mit einer dem Antikörper-Isotyp entsprechenden IgG-Kontrolle durchgeführt.

2.2.16 Immunofluoreszenz

Für die Immunocytochemie wurden die Zellen auf *8-Well Chamber Slides* kultiviert. Nach einer 20minütigen Fixierung mit 4 %igem Paraformaldehyd wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 1 Stunde mit 5 %igem BSA in PBS geblockt und dann über Nacht bei 4°C mit anti-Paxillin (1:100), anti phospho-Paxillin (Tyrosin 31, Tyrosin 118; beide 1:100), anti-Fhl-1 (1:100), anti-FAK (1:100) oder anti-Ki67 (1:50) Antikörpern inkubiert. Um F-Aktin anzufärben, wurde Alexa Fluor[®] 568 Phalloidin (1 U/ml) verwendet. Schließlich wurden die Zellen 5mal mit 0,1 %igem BSA (w/v) in PBS gewaschen und mit dem korrespondierenden sekundären Antikörper (Alexa 555 - rot, Alexa 488 - grün) inkubiert. Die Färbungen wurden in Fluoreszenz Vectashield Eindeckmedium, welches DAPI beinhaltet, eingedeckt. Für die Negativkontrolle wurde die Färbung mit einer dem Antikörper-Isotyp entsprechenden IgG-Kontrolle durchgeführt.

Für die Immunofluoreszenz-Analyse von humanem oder Maus Lungengewebe wurden 3 µm dicke Paraffin-Lungengewebs-Schnitte verwendet. Die Entparaffinierung erfolgte für dreimal 10 min in Xylol. Die Schnitte wurden in 100%igem Ethanol für zweimal 5 min, in 95 %igem Ethanol für einmal 5 min, in 70 % Ethanol für einmal 5 min, und in PBS für zweimal 5 min rehydriert. Die Antigen-Freilegung erfolgte mit 0,05 % Trypsin für 10 min bei 37°C. Das Gewebe wurde für 1 Stunde mit 10 %igem BSA (w/v) geblockt, bevor es mit Kaninchen anti-Paxillin (1:100), Ziege anti-Fhl-1 (1:100), Kaninchen anti-Fibronektin (1:50) oder Maus α-SMA (1:100) Antikörpern für 1 Stunde inkubiert wurde. Nach viermal fünfminütigem Waschen mit 0,1 %igem BSA (w/v) in PBS wurden die Schnitte mit Alexa 488 und Alexa 555 Antikörpern für 1 Stunde inkubiert. Das Gewebe wurde für 10 min mit 4 %igem Paraformaldehyd fixiert und mit Fluoreszenz Vectashield Eindeckmedium, welches DAPI beinhaltet, eingedeckt. Die Spezifität der Färbung wurde bestimmt, indem Kontrollschnitte mit einer dem Antikörper-Isotyp entsprechenden IgG-Kontrolle gefärbt wurden.

Um Immunofluoreszenz-gefärbte Zellen und Gewebeschnitte zu fotografieren, wurde ein Leica DMR Mikroskop mit den folgenden Filtern benutzt: AL 380–420 nm (DAPI), I3 420–512 nm (Alexa 488) und N 2.1. 500–590 nm (Alexa 555) (alle von Leica).

Von gefärbten Zellen wurden zudem Bilder mit einem *laser-scanning* Konfokal-Mikroskop gemacht. Es wurden folgende Ex/Em Einstellungen benutzt: 405/BP420–480 nm (DAPI); 543/LP560 nm (Alexa Fluor[®] 555). Die Bilder hatten eine Auflösung von 1024 x 1024 Pixel und wurden mit einem Zeiss 63 x Öl-Immersionsobjektiv mit 1,4 n.A. (numerische Apertur) aufgenommen. Um die Zellen dreidimensional (3D) darzustellen, wurden im Abstand von 0,7 µm Aufnahmen in der Z-Ebene der Zelle gemacht. Pro Zelle wurden dabei 15 bis 20 Schnitte pro Zelle aufgenommen. Diese Bilder wurden mit der Software des Mikroskops schließlich zu einem 3D Bild zusammengefügt.

2.2.17 Statistische Analyse und Datenverarbeitung

Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test nach Student bestimmt. Wurden mehrere Gruppen zu einer Kontrollgruppe verglichen, wurde eine Varianzanalyse in eine Richtung (ANOVA) mit dem Dunnett's PostHoc Test angewendet. Für die Auswertungen wurde EXCEL (Windows USA, 2003) bzw. PRISM Graph Pad (5.0, Graph Pad Software, San Diego, USA) verwendet. Werte für das Adhäsions-Verhalten von Zellen wurden aufgrund der unterschiedlichen Zellzahlen von Experiment zu Experiment von normalisierten Werten berechnet. Die Normalisierung erfolgte nach folgender Formel: $(x_{i, \text{Behandlung}} - x_{i, \text{Kontrolle}}) / (x_{i, \text{Kontrolle}})$; wobei x_i der gemessene Wert des Experiments i ist. Die Signifikanz ist als p-Wert über den Graphen angegeben. Ein p-Wert ≤ 0.05 wurde dabei als statistisch signifikant angesehen.

2.3 Puffer, Lösungen und Gele

In dieser Arbeit benutzte Puffer und Lösungen, sowie deren Zusammensetzungen und Verwendung sind in **Tabelle 6** angegeben.

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer (Verwendung)	Substanz	Menge
NP-40 Lyse-Puffer (Protein-Isolation)	TRIS Base	20 mM; pH 7,6
	NaCl	100 mM
	EDTA	2 mM
	Glycerol	10 % (v/v)
	NP-40	1 % (v/v)
10x Laemmli Proben-Puffer (Western Blotting)	TRIS-HCl	0,5 M
	SDS	20 % (w/v)
	Bromphenolblau	1 % (w/v)
	Glycerol	50 % (w/v)
1x Elektrophorese-Puffer (Western Blotting)	β -Mercaptoethanol	1 M
	TRIS-Base	3,02 g
	Glycin	18,8 g
	SDS (w/v)	10 %
	H ₂ O	1000 ml
Blotting-Puffer (Western Blotting)	Methanol	200 ml
	TRIS-Base	20 mM
	Glycin	150 mM
	H ₂ O	1000 ml
Stripping-Puffer (Western Blotting)	Glycin 1 M	5 ml
	H ₂ O	10 ml
	25 %ige HCl	0,750 ml
1x PBS; pH 7,4 (Western Blotting, Immunohistochemie)	NaCl	8,0 g
	KCl	0,2 g
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g
	KH ₂ PO ₄	0,24 g
	H ₂ O	1000 ml

TRK-Puffer (RNA-Extraktion)	von Peqlab bezogen	
GTC-RNA-Lyse-Puffer (RNA-Extraktion)	Guanidinthiocyanat	4 M
	Na ₃ Citrat	0,025 M
	Sarcosyl	0.5 %
	β-Mercaptoethanol	0.72 %
1x TBE-Puffer pH 8,2 (<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>)	TRIS-Base	89 mM
	EDTA	2 mM
	Borsäure	89 mM
Entfärbelösung (Adhäsions-Assay)	Eisessig	10 %
	Methanol	20 %
	H ₂ O	70 %

Abkürzungsverzeichnis siehe Anhang.

In dieser Arbeit verwendete Gele, sowie deren Zusammensetzung sind in **Tabelle 7** aufgeführt.

Tabelle 7: Für die Western Blot Analyse und den *Electrophoretic Mobility Shift Assay* verwendete Gele.

Gel (Verwendung)	Substanz	Menge
12 %iges SDS Polyacrylamid-Gel (Western Blot)	Trenngel 12 %	
	H ₂ O	5,6 ml
	TRIS 1,5 M; pH 8,8	4,2 ml
	30 %iges Acrylamid	6,6 ml
	10 %iges SDS	0,165 ml
	TEMED	0,022 ml
	25 %iges APS	0,022 ml
	Sammelgel 5 %	
	H ₂ O	5,8 ml
	TRIS 0,5 M; pH 6,8	2,5 ml
	30 %iges Acrylamid	1,7 ml
	10 %iges SDS	0,1 ml

	TEMED	0,02 ml
	25 %iges APS	0,02 ml
5 %iges Polyacrylamidgel	H ₂ O	19,5 ml
<i>(Electrophoretic Mobility Shift Assay)</i>	10x TBE	1,25 ml
	30 %iges Polyacrylamid	4,2 ml
	10 %iges APS	0,2 ml
	TEMED	0,05 ml

Abkürzungsverzeichnis siehe Anhang.

3 Ergebnisse

In einer vorherigen Studie konnte von Kwapiszewska et al. (Kwapiszewska et al, 2008) das zytoskeletale Protein *four and a half LIM domains* (Fhl-1) als ein neues, mögliches Schlüsselprotein in der pulmonalen Hypertonie identifiziert werden. Um den Einfluss zytoskeletaler Proteine und speziell Fhl-1 an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie besser verstehen zu können, galt es in dieser Arbeit neue, bisher nicht bekannte, Interaktionspartner von Fhl-1 zu identifizieren und deren Beteiligung am pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess zu untersuchen und zu charakterisieren.

3.1 Suche nach neuen Fhl-1 Interaktionspartnern

Mit dem Ziel, neue Interaktionspartner-Kandidaten von Fhl-1 zu identifizieren, wurde eine *Yeast two-Hybrid* Analyse in Kooperation von der Dualsystems Biotech AG (Schlieren, Schweiz) durchgeführt. Die komplette Fhl-1-Sequenz aus der Maus wurde bei diesem *screening* als *bait* eingesetzt, um eine cDNA Bibliothek aus der Mauslunge zu untersuchen. Es wurden drei unabhängige Paxillin Klone, die mit der LIM-Domänen-Region des Proteins übereinstimmten (**Abbildung 5**, unten), als Interaktionspartner-Kandidaten identifiziert; sowohl wenn man N- (pFhl-1-LexA; p = Plasmid) als auch C-terminale (pLexA-Fhl-1) Fhl-1-*bait*-Konstrukte für das *screening* verwendete. Zwei Kontroll-*bait*-Proteine, der Transkriptionsfaktor p53 und das Glykoprotein Lamin C, banden nicht an Fhl-1 - ein Beweis für die Spezifität der Paxillin-Fhl-1 Bindung (**Abbildung 5**, oben).

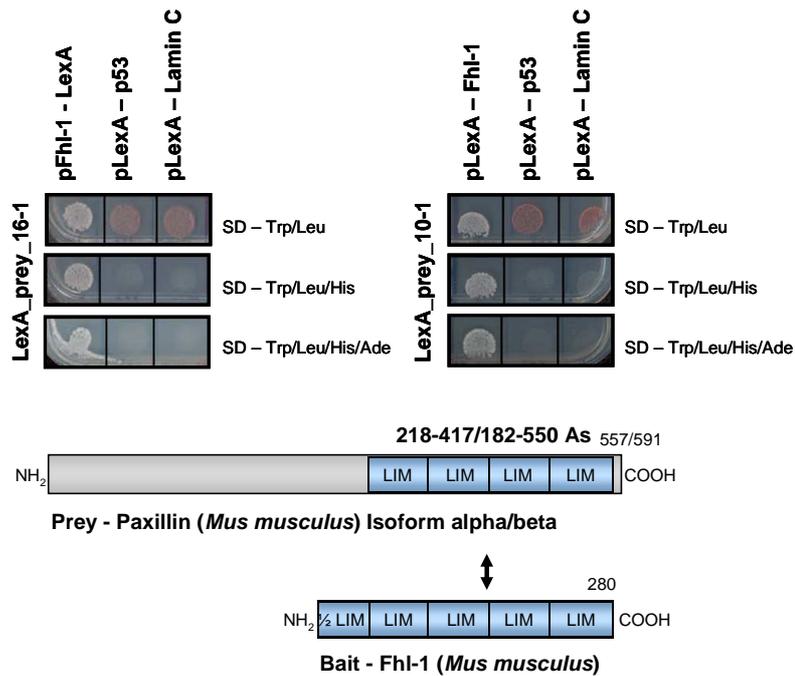


Abbildung 5: Identifikation von Paxillin als neuer Fhl-1-Interaktionspartner.

Identifikation von Paxillin als Fhl-1-Interaktionspartner, untersucht mit Hilfe der *Yeast two-Hybrid* Analyse, unter Verwendung von N- und C-terminalen Fhl-1-Klonen (linke bzw. rechte Seite der Abbildung; oberer Teil). p53 und Lamin C dienen als Spezifitäts-Kontrollen. SD = Selektivmedium (Medium ohne die Aminosäuren Tryptophan – Trp, Leucin – Leu, Histidin – His, bzw. Adenin – Ade). Schematische Repräsentation der Paxillin- (*prey*) und Fhl-1- (*bait*) Proteine (unterer Teil der Abbildung). As = Aminosäuren; LIM = LIM-Domäne; NH₂ = N-Terminus; COOH = C-Terminus.

Die aus der Analyse von Dualsystems Biotech AG mögliche Interaktion zwischen Paxillin und Fhl-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Ko-Immunpräzipitations-Versuchen in mikrovaskulären PASCs der Maus bestätigt werden. Es wurde hierzu endogenes Paxillin für die Präzipitation eingesetzt. Eine Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG) zeigte keine Interaktion mit Fhl-1 - eine erneute Bestätigung für die Spezifität der Bindung (**Abbildung 6 A**). Neben der Interaktion in den PASCs der Maus konnte gezeigt werden, dass die beiden Proteine auch in humanen PASCs interagierten (**Abbildung 6 B**).

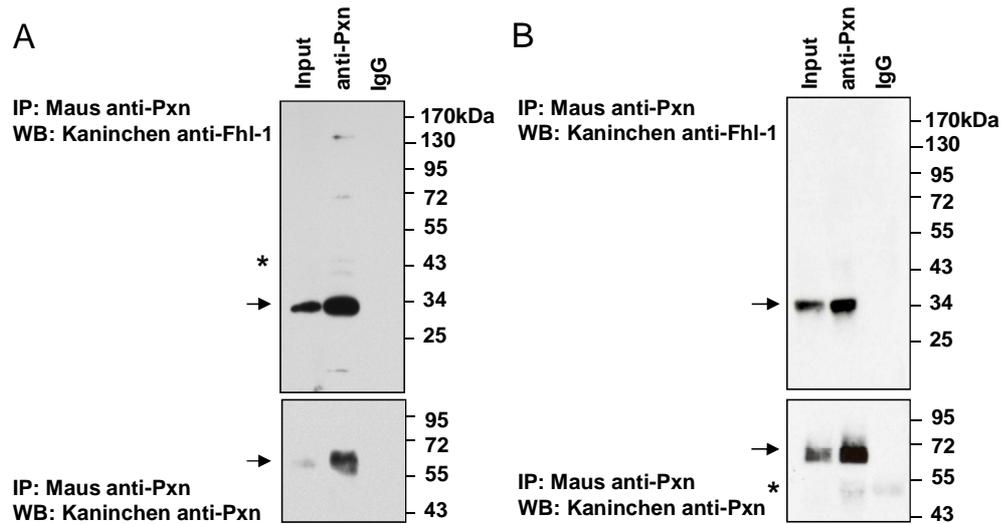


Abbildung 6: Ko-Immunopräzipitation von Fhl-1 mit Paxillin.

Immunopräzipitation (IP) von endogenem Paxillin aus (A) mikrovaskulären PASMC der Maus oder (B) humanen PASMC mit einem anti-Paxillin (Pxn) Antikörper. Dargestellt sind die Western Blot Analysen (WB) der Immunopräzipitate mit einem anti-Fhl-1 oder anti-Paxillin Antikörper. Eine Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG) wurde als Kontrolle eingesetzt, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Pfeil = Fhl-1 (30 kDa) oder Paxillin (68 kDa); * = schwere Kette des Antikörpers; kDa = Kilodalton.

Um die Interaktion von Paxillin und Fhl-1 weiter zu verifizieren, wurde die Expression und Lokalisation der beiden Proteine *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für die *in vitro* Versuche wurden Immunofluoreszenz-Färbungen von mikrovaskulären PASMC der Maus (Abbildung 7, linke Seite) und humanen PASMC (Abbildung 7, rechte Seite) angefertigt. Diese Färbungen ergaben, dass sowohl Paxillin als auch Fhl-1 im Zytoplasma der PASMC exprimiert werden und dort ko-lokalisieren. In mikrovaskulären PASMC der Maus ist Paxillin in rot und Fhl-1 in grün dargestellt. In humanen PASMC ist Paxillin in grün und Fhl-1 in rot angefärbt. Der Zellkern ist jeweils in blau zu erkennen. Die Ko-Lokalisation der beiden Proteine ergibt die Farbe gelb.

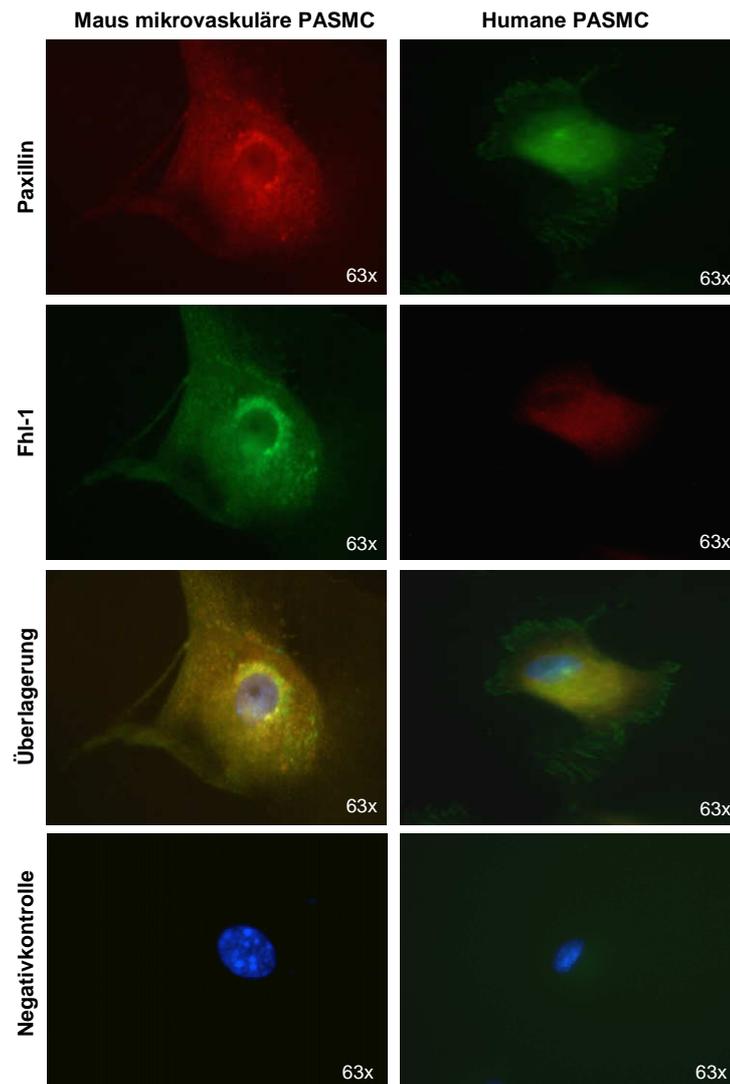


Abbildung 7: Paxillin ko-lokalisiert mit Fhl-1 im Zytoplasma von PASMC.

Ko-Lokalisation von Paxillin und Fhl-1 in mikrovaskulären PASMC der Maus (linke Seite der Abbildung) bzw. humanen PASMC (rechte Seite der Abbildung). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG).

Für die *in vivo* Experimente wurde Lungengewebe der Maus und des Menschen mit Hilfe der Immunofluoreszenz-Technik gefärbt. In beiden Spezies ko-lokalisierten Paxillin und Fhl-1 in den pulmonalen Gefäßwänden (**Abbildung 8**).

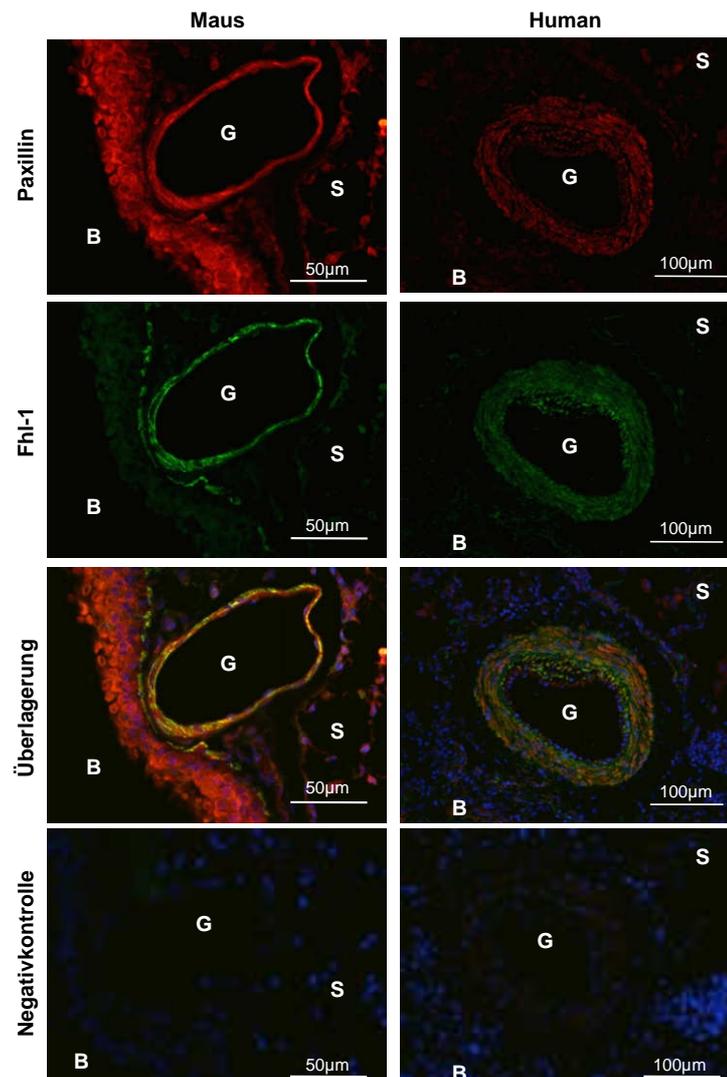


Abbildung 8: Ko-Lokalisation von Paxillin und Fhl-1 in den pulmonalen Gefäßwänden.

Ko-Lokalisation (in gelb) von Paxillin (rot) und Fhl-1 (grün) im Lungengewebe der Maus (linke Seite der Abbildung) und des Menschen (rechte Seite der Abbildung). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). G = Gefäß (Lumen); S = Septen; B = Bronchus (Lumen).

Sowohl Paxillin als auch Fhl-1 werden in PAMSC exprimiert und interagierten miteinander. Um zu untersuchen, ob zwischen Paxillin und Fhl-1 eine funktionelle Abhängigkeit besteht, wurden spezifische siRNA *knockdown*-Experimente in humanen PAMSC durchgeführt. Das *silencing*, d.h. die Herunterregulation der Paxillin- (siPxn) bzw. Fhl-1-Expression (siFhl-1), verursachte eine signifikant inhibierte Paxillin bzw. Fhl-1 Protein-Expression im Vergleich zur Kontrolle (siR; **Abbildung 9 A, B**; Mittelwert \pm SEM für Paxillin: 100 ± 0 und $58,1 \pm 13,6$ %; Mittelwert \pm SEM für Fhl-1: 100 ± 0 und $75,0 \pm 14,4$ %). Interessanterweise induzierte der Paxillin *knockdown* neben

der verminderten Paxillin Expression auch eine signifikant verringerte Fhl-1 Protein-Expression (**Abbildung 9 A, B**; Mittelwert \pm SEM: 100 ± 0 und $57,1 \pm 12,0$ %).

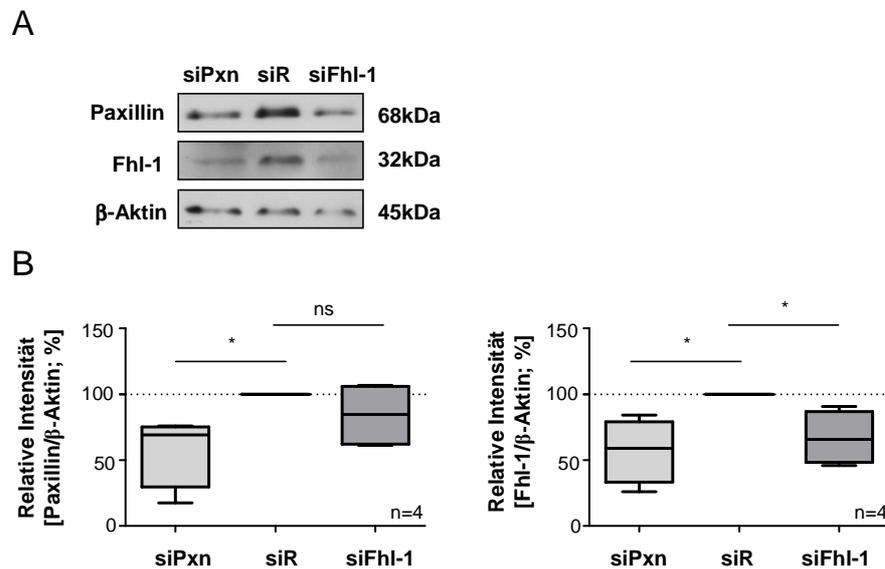


Abbildung 9: Die Fhl-1-Expression ist von der Paxillin Expression abhängig.

A. Repräsentativer Western Blot 48h nach dem *knockdown* der Paxillin oder Fhl-1 Protein-Expression mittels siRNA Transfektion (siPxn; siFhl-1) im Vergleich zur Kontrolle (siR). **B.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen von A (n=4). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem * dargestellt. ns = nicht signifikant.

Aufgrund der Lokalisation von Paxillin in den pulmonalen Gefäßen und der bekannten Rolle von Fhl-1 an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie, ergab sich die Frage, ob Paxillin eine veränderte Expression in der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie (IPAH) oder in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen aufweist.

3.2 Paxillin-Expression in Lungen von Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie

Im vorherigen Abschnitt konnte Paxillin in den pulmonalen Gefäßwänden detektiert werden. Kwapiszewska et al. (Kwapiszewska et al, 2008) zeigten in ihrer Studie die erhöhte Expression von Fhl-1 in Lungenproben von Patienten mit idiopathischer

pulmonalerterieller Hypertonie (IPAH) auf. In dieser vorliegenden Arbeit war es demnach von besonderem Interesse die Regulation von Paxillin in der IPAH zu untersuchen.

Ebenso wie Fhl-1, so zeigte auch der Fhl-1-Interaktionspartner Paxillin in IPAH-Patienten eine signifikant erhöhte Expression im Vergleich zur Donor-Kontrolle, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (**Abbildung 10 A-C**).

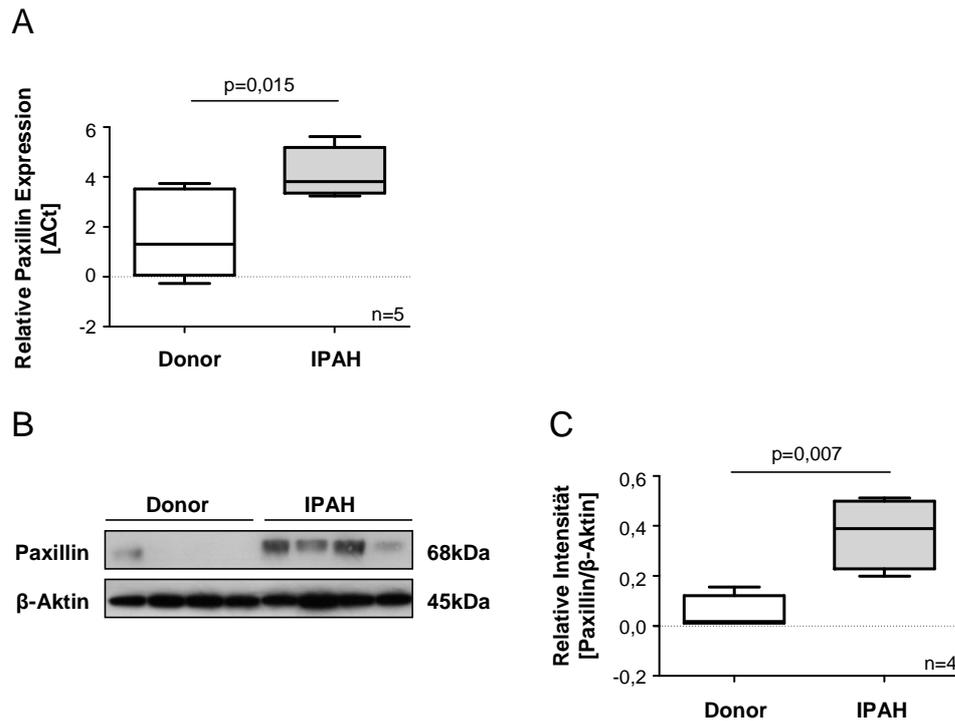


Abbildung 10: Erhöhte Paxillin-Expression in Lungen von IPAH-Patienten.

A. *Real-Time* PCR der Paxillin-Expression in Donor- (Kontrolle) und IPAH-Lungenhomogenaten (n=5, pro Gruppe). **B.** Western Blot der Paxillin-Protein-Expression in Donor- und IPAH-Lungenhomogenaten. **C.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse von B (n=4, pro Gruppe).

Mittels immunohistochemischen Färbungen konnte Paxillin hauptsächlich in den PASMC lokalisiert werden. Die Färbung von α -SMA (*smooth muscle actin* - Aktin der glatten Muskelzellen) diente hierbei als Marker für die PASMC (**Abbildung 11**).

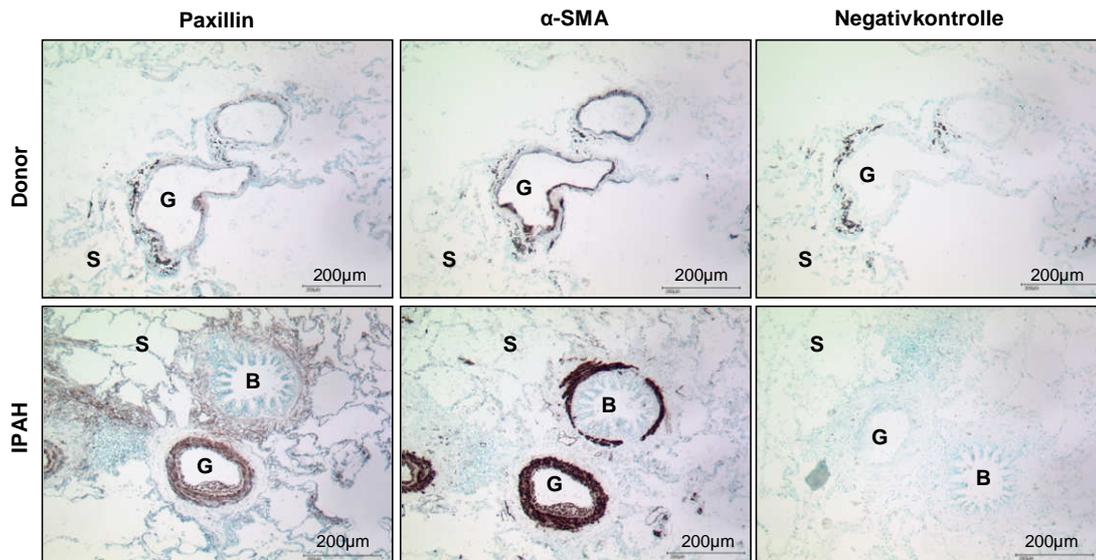


Abbildung 11: Lokalisation von Paxillin in humanem Lungengewebe.

Immunohistochemische Färbungen von Paxillin (braun) und α -smooth muscle actin (α -SMA; dunkelbraun) in Donor- (Kontrolle) und IPAH-Lungen. Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). G = Gefäß (Lumen); S = Septen; B = Bronchus (Lumen).

Zusammenfassend zeigt sich also eine erhöhte Paxillin-Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene in IPAH-Proben. Weiterhin gibt die Lokalisation von Paxillin in den PASMC einen möglichen Hinweis auf die Beteiligung von Paxillin an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie.

3.3 Regulation von Paxillin in Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie

Um den Einfluss von Paxillin auf die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie weiter zu verifizieren, wurde die Regulation der Paxillin-Expression in zwei unterschiedlichen Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie untersucht. Zum Einen handelte es sich dabei um das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus und zum Anderen um das Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie in der Ratte. Beides sind sehr geläufige Tier-Modelle der pulmonalen Hypertonie (Stenmark et al, 2009).

3.3.1 Paxillin-Expression in der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus

Die chronisch hypoxische Haltung von Mäusen führt innerhalb von drei Wochen zu einer pulmonalen Hypertonie mit Rechtsherzhypertrophie und einer erhöhten Muskularisierung intra-acinarer Gefäße (Roth et al, 2009; Weissmann et al, 2005).

In Lungenhomogenaten von Mäusen, die für 21 Tage in Normoxie (N; 21 % O₂) oder chronischer Hypoxie (H; 10 % O₂) gehalten wurden, konnte weder auf mRNA noch auf Protein-Ebene eine Regulation der Paxillin-Expression beobachtet werden (Abbildung 12 A-C).

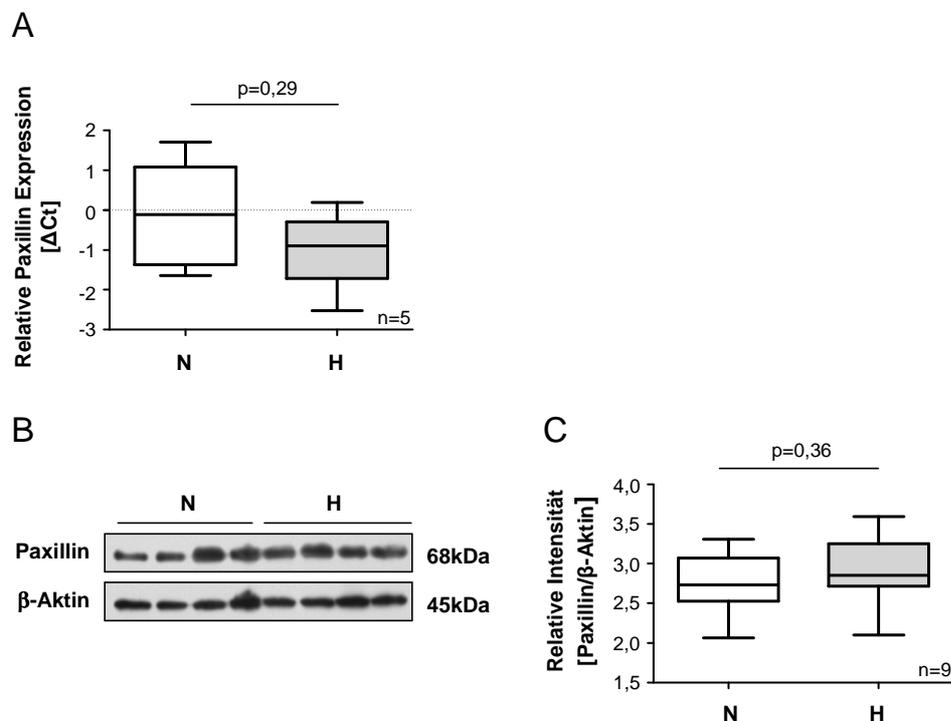


Abbildung 12: Regulation der Paxillin-Expression in Lungenhomogenaten von Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie.

A., B. Paxillin-Expression in Lungenhomogenaten von Mäusen, die für 21 Tage unter Normoxie (N; 21 % O₂) oder chronischer Hypoxie (H; 10 % O₂) gehalten wurden; **A.** *Real-Time* PCR (n=5, pro Gruppe); **B.** Repräsentative Western Blot Analyse. **C.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen von B (n=9, pro Gruppe).

Mit Hilfe von immunohistochemischen Färbungen konnte Paxillin in den glatten Muskelzellen der pulmonalen Gefäßwände der Maus lokalisiert werden

(**Abbildung 13 A**). Im Folgenden wurde sich daher auf die spezifische Regulation von Paxillin in diesem Kompartiment konzentriert. Im Gegensatz zu den Untersuchungen an Lungenhomogenaten, ergaben *Real-Time* PCR Daten von lasermikrodissezierten intrapulmonalen Gefäßen eine signifikant erhöhte Paxillin-mRNA-Expression in pulmonalen Gefäßen von chronisch hypoxischen Mäusen im Vergleich zur normoxischen Kontrolle (**Abbildung 13 B**).

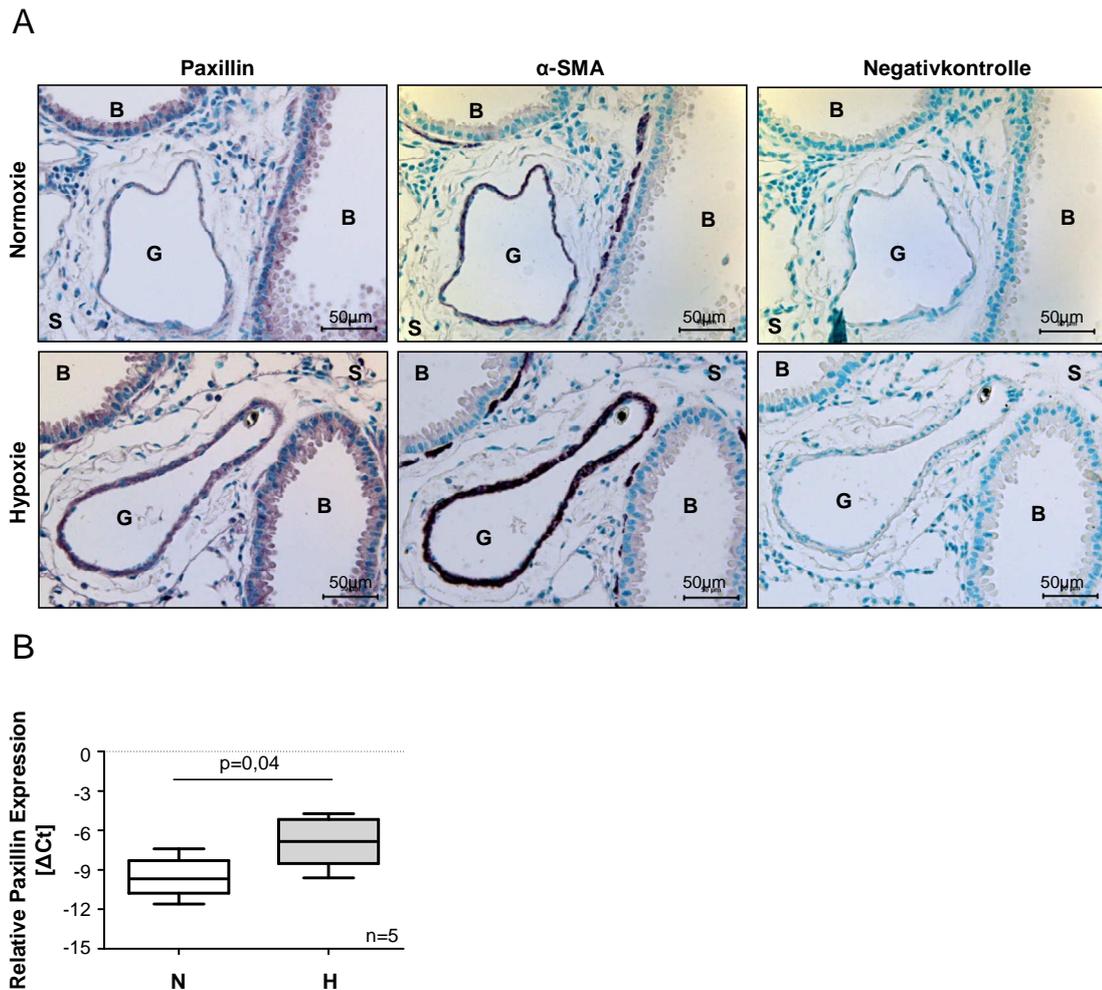


Abbildung 13: Lokalisation und Regulation der Paxillin-Expression in den pulmonalen Gefäßen von Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie.

A. Immunohistochemische Färbungen von Paxillin (braun) und *α-smooth muscle actin* (α -SMA; dunkelbraun) in normoxischen und chronisch hypoxischen Lungen der Maus. Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). G = Gefäß (Lumen); S = Septen; B = Bronchus (Lumen). **B.** Paxillin-mRNA-Expression in lasermikrodissezierten Lungengefäßen der Maus (äußerer Durchmesser der lasermikrodissezierten Gefäße < 100 μ m, n=5, pro Gruppe) untersucht mittels *Real-Time* PCR. N = Normoxie (21 Tage; 21 % O₂); H = Hypoxie (21 Tage; 10 % O₂).

Im Unterschied zum pulmonalen Gefäßsystem, zeigte Paxillin in den systemischen Gefäßen (Aorta und *Arteria carotis*) in Folge der Hypoxie-Haltung der Mäuse keine Veränderung in der Regulation (**Abbildung 14 A, B**).

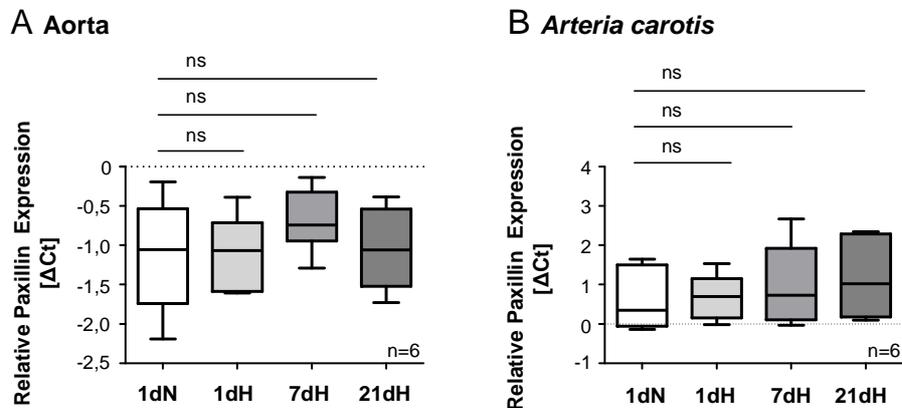


Abbildung 14: Systemische Regulation der Paxillin-Expression in Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie.

A., B. Paxillin-mRNA-Expression in aus der Maus isolierten (**A**) Aorten oder (**B**) *Arteriae carotis* untersucht mittels *Real-Time* PCR. Die Mäuse wurden einen Tag in Normoxie (21 % O₂; 1dN) oder 1, 7, bzw. 21 Tage in Hypoxie (10 % O₂; 1dH, 7dH, und 21dH; n=6, pro Gruppe) gehalten. ns = nicht signifikant.

Insgesamt scheint Paxillin nur in den pulmonalen Gefäßen im Maus-Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie reguliert zu sein; weder in Homogenaten der Lunge noch in der systemischen Vaskulatur konnte eine Regulation detektiert werden.

3.3.2 Paxillin-Expression im Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie in der Ratte

In PASMIC isoliert aus Monocrotalin-behandelten Ratten ergab sich die Tendenz einer erhöhten Paxillin-Expression im Vergleich zur Kontrolle (PASMIC isoliert aus Kontroll-behandelten Ratten), sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene (**Abbildung 15 A-C**). Eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht erreicht werden. Mittels immunohistochemischen Färbungen konnte Paxillin auch in der Monocrotalin-

induzierten pulmonalen Hypertonie in der glatten Muskelzell-Schicht der Gefäßwand lokalisiert werden (**Abbildung 15 D**).

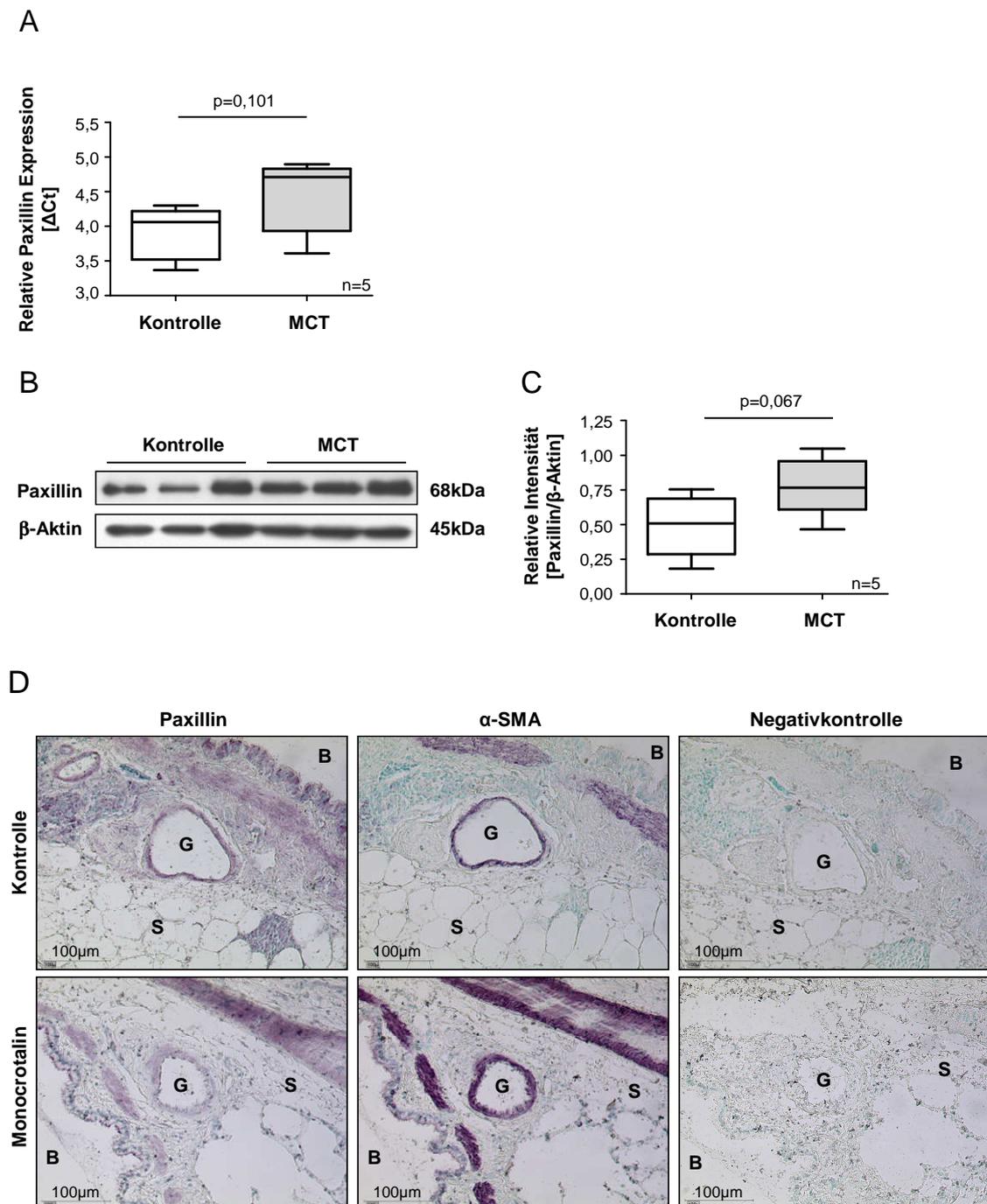


Abbildung 15: Paxillin-Expression in PASMCS isoliert aus Monocrotalin (MCT)-behandelten Ratten.

A. Paxillin mRNA-Expression in PASMCS isoliert aus Kontroll- oder MCT-behandelten Ratten (n=5, pro Gruppe) untersucht mittels *Real-Time* PCR. **B.** Repräsentative Western Blot Analyse der Paxillin-Expression in PASMCS aus Kontroll- und MCT-behandelten Ratten. **C.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen von B (n=5, pro Gruppe). **D.** Lokalisation von Paxillin (violett) und α -smooth

muscle actin (α -SMA; dunkelviolet) in Kontroll- und Monocrotalin-behandelten Ratten. Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). G = Gefäß (Lumen); S = Septen; B = Bronchus (Lumen).

Entgegen der signifikanten Hochregulation von Paxillin in den pulmonalen Gefäßen im Maus-Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie, konnte die Paxillin-Expression im Ratten Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie in den pulmonalen Gefäßen nur als tendenziell erhöht detektiert werden.

Entsprechende Daten über den Krankheitszustand der Ratten mit Monocrotalin-induzierter pulmonaler Hypertonie (Bestimmung des rechtsventrikulären systolischen Drucks und der Rechtsherzhypertrophie) wurden von Florian Veit erhoben und sind Bestandteil seiner Doktorarbeit. Bei der Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie ergaben sich die folgenden Mittelwerte \pm SEM: bei den Kontrollen $0,22 \pm 0,01$, bei den Monocrotalin-behandelten Ratten $0,47 \pm 0,03$. Die Gruppengröße betrug $n=6$ und der p-Wert $0,03$. Der rechtsventrikuläre systolische Druck \pm SEM wurde wie folgt gemessen: bei den Kontrollen $28,1 \pm 1,2$ mmHg, bei den Monocrotalin-behandelten Ratten $72,8 \pm 2,7$ mmHg. Die Gruppengröße betrug $n=18$ und der p-Wert $0,001$.

3.4 Regulation der Fibronektin-Expression in Lungen von Patienten mit idiopathischer pulmonaler arterieller Hypertonie

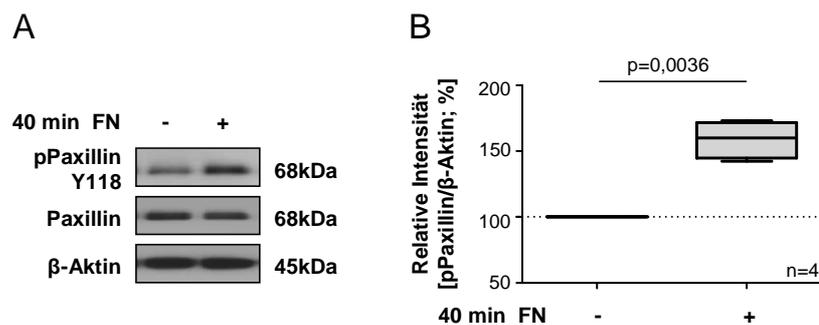
Das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin ist ein wichtiger Bestandteil/Faktor in Paxillin Signaltransduktionswegen, unter anderem in verschiedenen Tumor-Zelllinien (Tanaka et al; Turner, 2000b). Neben der erhöhten Paxillin Expression in IPAH-Patienten war es daher von Interesse die Expression von Fibronektin in diesen Patienten zu untersuchen, um so eventuell Stimuli für die Paxillin-Aktivierung/Phosphorylierung identifizieren zu können.

In Lungenhomogenaten von IPAH-Patienten konnte eine signifikant erhöhte Fibronektin-mRNA-Expression im Vergleich zur Donor-Kontrolle nachgewiesen werden (**Abbildung 16 A**). Immunfluoreszenz-Färbungen von humanen Lungenschnitten bestätigten die *Real-Time* PCR Daten. Auch auf Proteinebene konnte

Neben der erhöhten Paxillin-Expression in Patienten mit IPAH zeigte sich auch eine potenzierte Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronektin in diesen Patienten.

3.5 Einfluss von Fibronektin auf die Phosphorylierung von Paxillin

Wie bereits in **Abschnitt 3.4** angedeutet, könnte das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin auch in humanen PASMC einen Einfluss auf Paxillin Signaltransduktionswege und damit auf die Paxillin-Aktivierung haben. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden humane PASMC auf Fibronektin-beschichteten Platten kultiviert. Diese „Stimulation“ der Zellen resultierte in einer erhöhten Paxillin Tyrosin 118 Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle (Kultivierung von Zellen auf unbeschichteten Platten; **Abbildung 17 A, B**). Die Paxillin-Expression selbst wurde durch die 40minütige Kultivierung von humanen PASMC auf Fibronektin-beschichteten Platten nicht beeinflusst. Interessanterweise verstärkte Fibronektin aber die Interaktion zwischen Paxillin und Fhl-1, was durch Ko-Immunopräzipitations-Versuche gezeigt werden konnte (**Abbildung 17 C**).



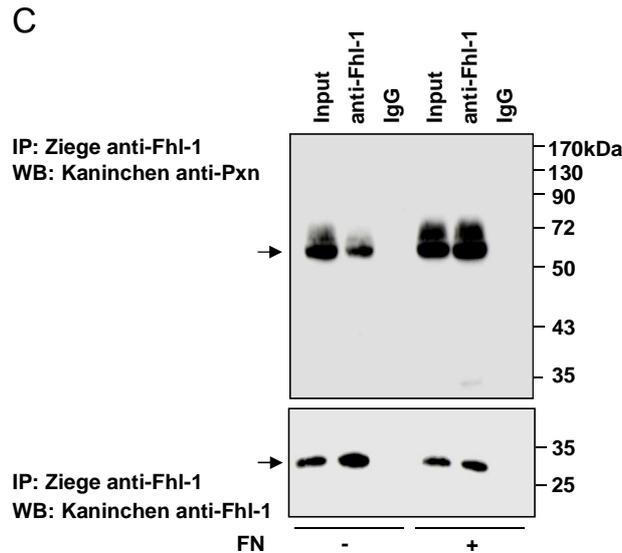


Abbildung 17: Fibronektin-abhängige Paxillin-Phosphorylierung.

A. Repräsentative Western Blot Analyse der Paxillin Tyrosin (Y) 118 Phosphorylierung und totalen Paxillin-Expression nach Kultivierung von humanen PASMC auf Fibronektin-beschichteten oder unbeschichteten (+/- FN) Platten für den angegebenen Zeitpunkt (40 min). **B.** Quantifizierung der Western Blot Analysen von A mittels Densitometrie (n=4). Die Protein-Expression wurde zu β -Aktin normalisiert. **C.** Ko-Immunopräzipitation von Paxillin mit Fhl-1 von Zell-Lysaten aus humanen PASMC, kultiviert auf Fibronektin-beschichteten oder unbeschichteten (+/- FN) Platten. Die Immunopräzipitate wurden mit einem anti-Paxillin (Pxn) oder anti-Fhl-1 Antikörper detektiert. Eine Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG) wurde als Kontrolle eingesetzt, um unspezifische Interaktionen auszuschließen. Pfeil: Paxillin (68 kDa) oder Fhl-1 (30 kDa); IP = Immunopräzipitation; WB = Western Blot; kDa = Kilodalton.

Zusammenfassend konnte Fibronektin in diesem Abschnitt zum Einen als Stimulus für die Paxillin Phosphorylierung in humanen PASMC detektiert werden. Zum Anderen begünstigte diese Fibronektin-induzierte Phosphorylierung die Interaktion von Paxillin und Fhl-1.

3.6 Rolle von Fibronektin und/oder Paxillin auf das Adhäsions-Verhalten humaner pulmonaler arterieller glatter Muskelzellen

Die Adhäsion von Zellen über Integrine an die extrazelluläre Matrix ist von enormer Bedeutung für die Physiologie der Zellen. Im Folgenden wurde daher zunächst der Einfluss von Fibronektin auf das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC

untersucht. Immunofluoreszenz-Färbungen von Paxillin und Aktin-Filamenten (angefärbt durch Phalloidin) in PASMC verdeutlichten, dass Fibronectin die Zelladhäsion begünstigte. Die Zellen wiesen in Folge der Kultivierung auf Fibronectin-beschichteten Platten einen mehr ausgestreckten und flächigeren Phänotyp auf. Wurden sie hingegen auf unbeschichteten Platten kultiviert, waren sie deutlich abgerundeter und kleiner (**Abbildung 17 A**). Neben dem Einfluss auf die Zelladhäsion induzierte die Fibronectin-Beschichtung auch eine erhöhte Lokalisation von Paxillin in den fokalen Adhäsionskomplexen. Die Paxillin-reichen fokalen Adhäsionskomplexe stellen in sich als Striche an den Anheftungspunkten der Zelle an den Untergrund dar (**Abbildung 17 B**).

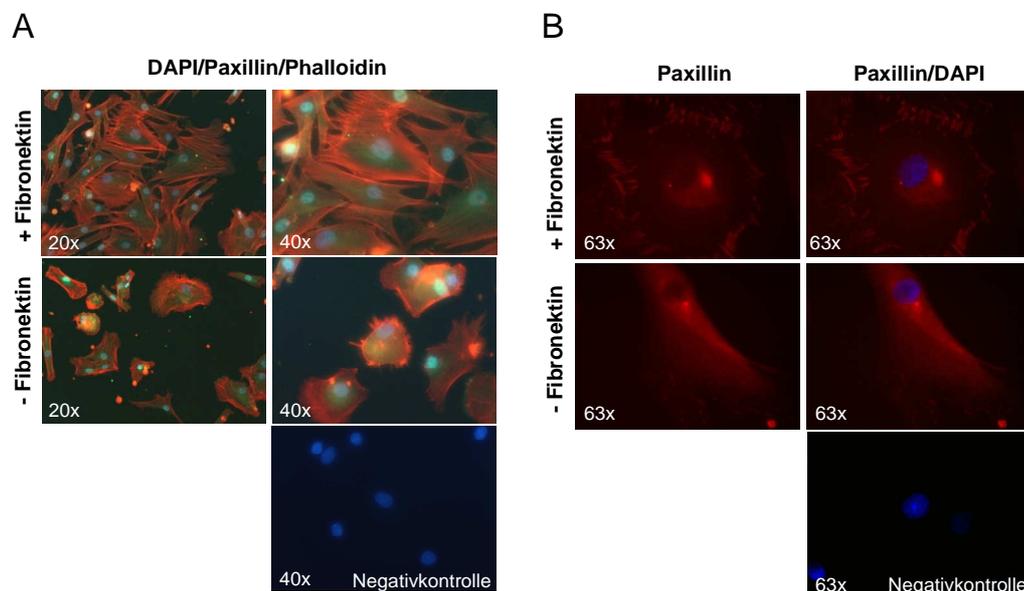
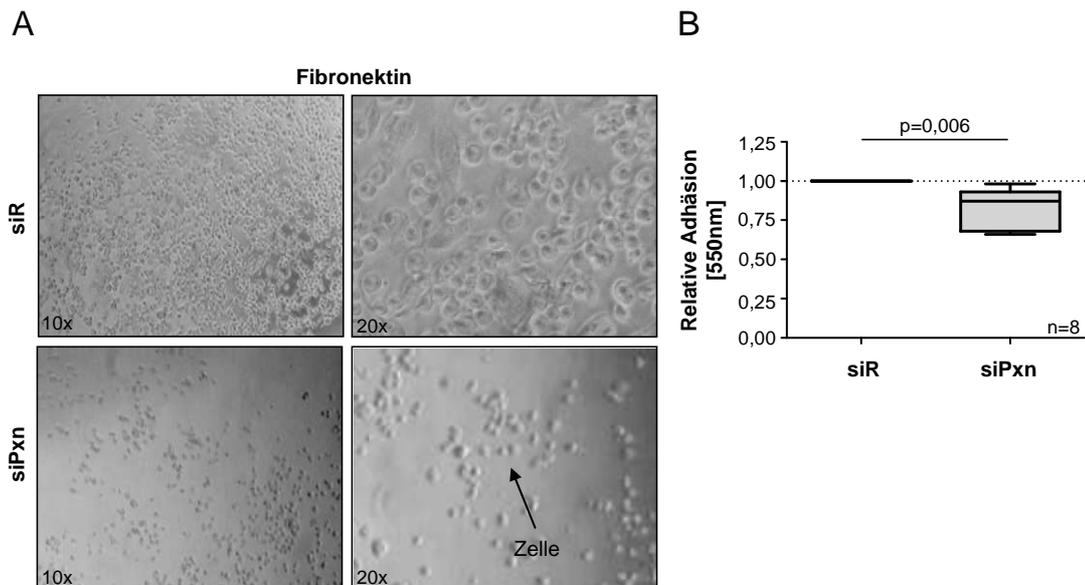


Abbildung 18: Einfluss von Fibronectin auf das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC und die intrazelluläre Lokalisation von Paxillin.

A. Einfluss der Fibronectin-Beschichtung (+/- Fibronectin) auf die Adhäsion von humanen PASMC, untersucht mittels Immunofluoreszenz-Färbungen gegen Phalloidin (rot) und Paxillin (grün). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). **B.** Fibronectin-induzierte Veränderungen in der Paxillin-Lokalisation in PASMC, untersucht mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Färbungen gegen Paxillin (rot). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG).

Um zu untersuchen, ob Paxillin auch selbst das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC beeinflussen kann, wurden die Zellen mit einer siRNA gegen die Paxillin-

mRNA (siPxn) transfiziert und schließlich Adhäsions-Assays durchgeführt. Lichtmikroskopische Bilder und Adhäsions-Assays nach der siRNA-Transfektion ergaben, dass die Adhäsion von PASMC neben Fibronectin auch abhängig von der Paxillin-Expression selbst ist. In Folge der verminderten Paxillin Expression waren deutlich weniger Zellen in der Lage sich an die Fibronectin-beschichtete Kulturplatten anzuheften. Sie wiesen weiterhin einen kleineren, runderen Phänotyp auf (**Abbildung 19 A**). Die Quantifizierung des Adhäsions-Assays bestätigte die Beobachtung. In Folge des Paxillin *knockdowns* war die Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle (siR) inhibiert (Mittelwert \pm SEM: $0,82 \pm 0,05$; **Abbildung 19 B**). Immunofluoreszenz-Färbungen von Phalloidin machten deutlich, dass der Paxillin *knockdown* von einem Integritätsverlust des Aktin-Zytoskeletts begleitet war. War Paxillin vermindert exprimiert, so konnte sich das Zytoskelett der humanen PASMC (angefärbt mit Phalloidin) nur noch ungenügend ausbilden (**Abbildung 19 C**).



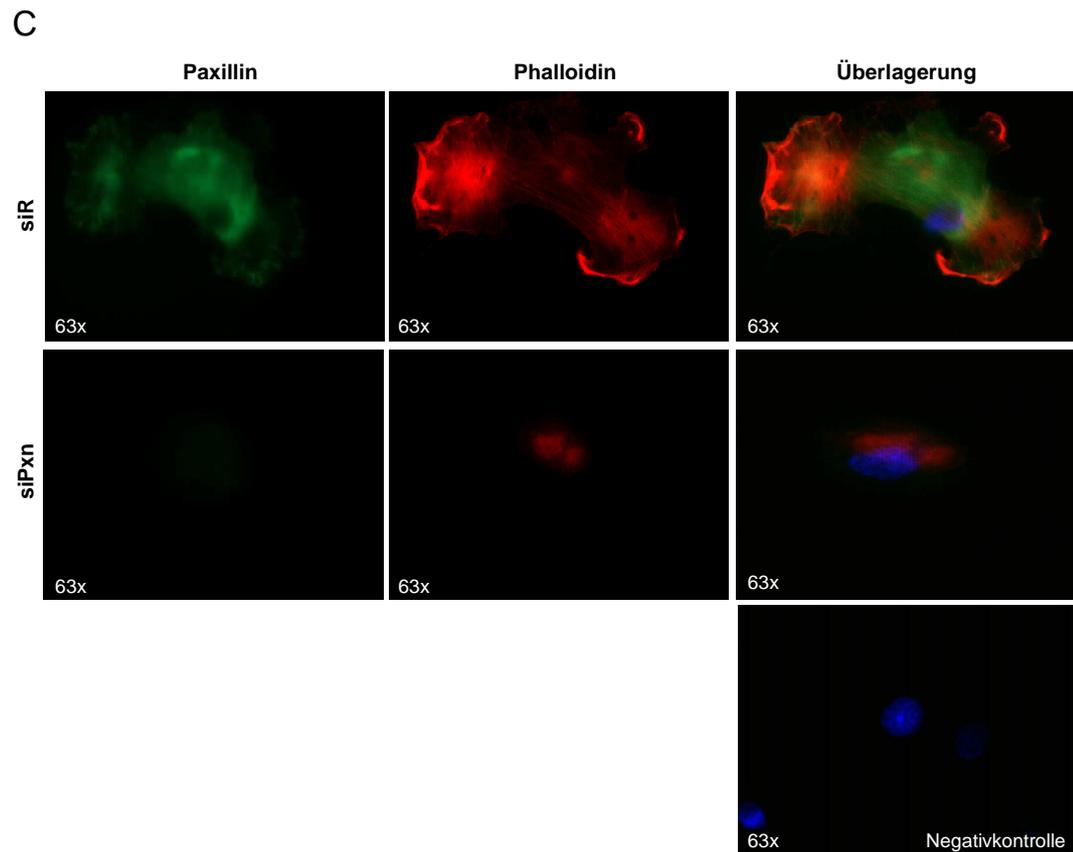


Abbildung 19: Einfluss von Paxillin auf das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC.

A. Lichtmikroskopische Bilder vom Adhäsions-Verhalten humaner PASMC auf Fibronectin-beschichteten Platten nach siRNA-Transfektion gegen Paxillin (siPxn) im Vergleich zur Kontrolle (siR). **B.** Einfluss des Paxillin *knockdowns* (siPxn) auf das Adhäsions-Verhalten humaner PASMC auf Fibronectin-beschichteten Platten, quantifiziert durch Kristallviolett-Färbung (n=8) im Vergleich zur Kontrolle (siR). **C.** Immunofluoreszenz-Färbung von Paxillin (grün) und Phalloidin (rot) nach verminderter Paxillin-Expression (siPxn) im Vergleich zur Kontrolle (siR). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG).

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass sowohl ohne Fibronectin-Beschichtung der Kulturplatten, als auch mit Paxillin *knockdown* das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC negativ beeinflusst wurde.

3.7 Einfluss der reziproken Paxillin oder *focal adhesion kinase* Expression auf die Phosphorylierung der Proteine

Das Paxillin-bindende Protein *focal adhesion kinase* (FAK) wird durch Integrin-vermittelte Zell-Adhäsion autophosphoryliert und damit aktiviert (Guan, 1997). Die folgenden Immunfluoreszenz-Färbungen zeigten, dass Paxillin und FAK in den fokalen Adhäsionskomplexen humaner PASMC ko-lokalisierten (**Abbildung 20**).

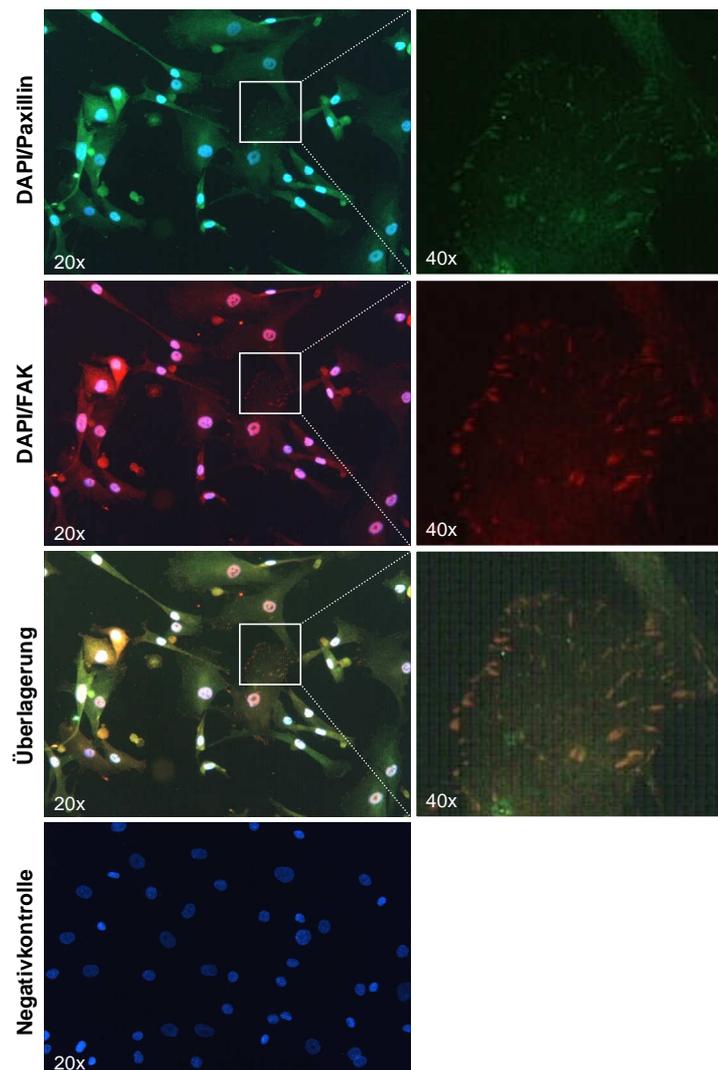


Abbildung 20: Lokalisation von Paxillin und der *focal adhesion kinase* (FAK) in humanen PASMC.

A. Ko-Lokalisation von Paxillin (grün) und der *focal adhesion kinase* (FAK; rot) in den fokalen Adhäsionskomplexen humaner PASMC untersucht mit Hilfe von Immunfluoreszenz-Färbungen. Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG).

Um zu untersuchen, ob FAK einen Einfluss auf die Paxillin-Phosphorylierung in humanen PASMC hat, wurden die Zellen mit einer siRNA gegen FAK (siFAK) transfiziert. Ein *knockdown* der FAK-Expression hatte eine im Vergleich zur Kontrolle (siR) inhibierte Paxillin Tyrosin (Y) 118 Phosphorylierung und Paxillin-Protein-Expression zur Folge (**Abbildung 21 A, B**).

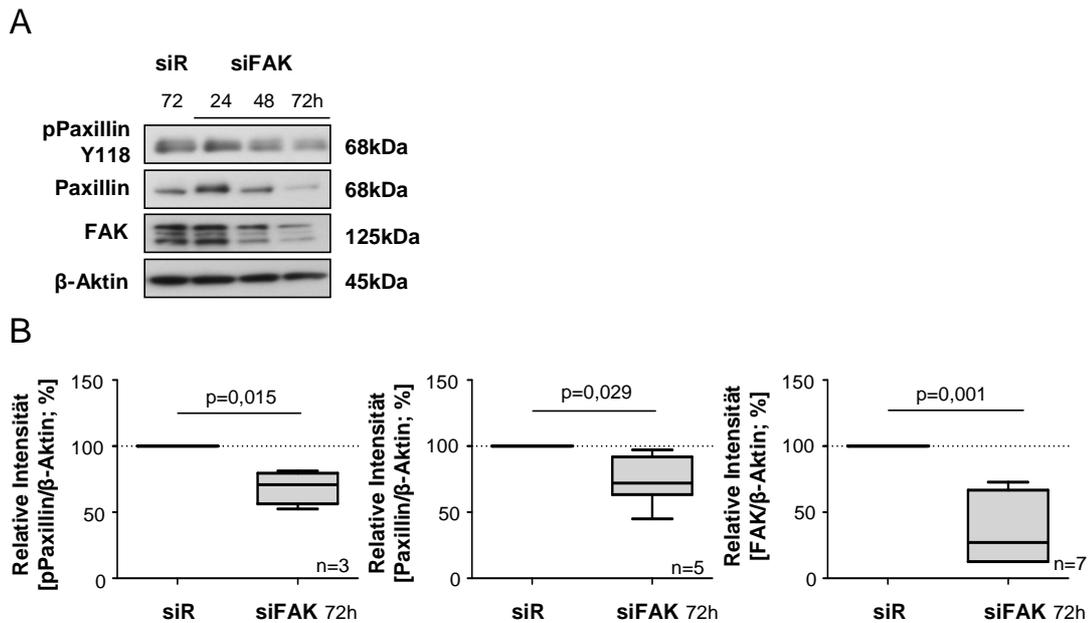


Abbildung 21: Die Phosphorylierung von Paxillin ist abhängig vom Expressions-Niveau der *focal adhesion kinase* (FAK).

A. Repräsentative Western Blots von FAK, der Paxillin Tyrosin (Y) 118 Phosphorylierung und Paxillin-Protein-Expression nach verminderter FAK-Expression (siFAK) für die angegebenen Zeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle (siR). **B.** Zeitpunkt 72 Stunden (h) der Western Blot Analysen von A quantifiziert mittels Densitometrie (n=3-7). Die Protein-Phosphorylierung wurde zu β -Aktin normalisiert.

Wenn man hingegen die Paxillin-Expression mittels siRNA-Transfektion (siPxn) inhibierte, konnte eine verminderte FAK Tyrosin (Y) 397 und 576 Phosphorylierung beobachtet werden. Die FAK-Expression selbst wurde nicht beeinflusst (**Abbildung 22 A, B**).

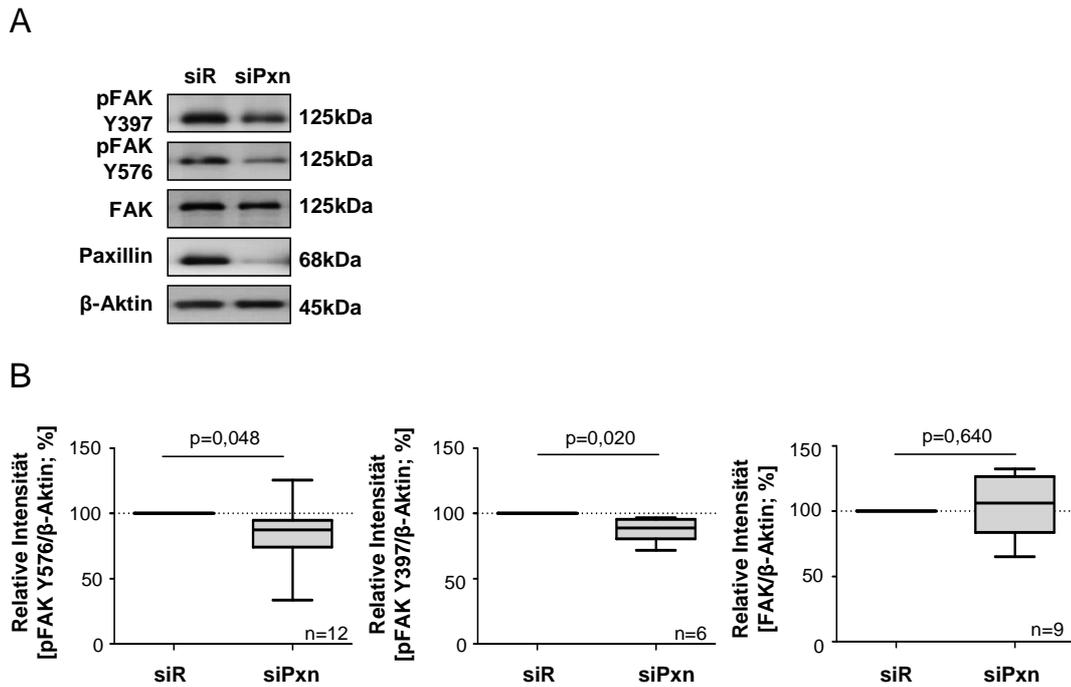


Abbildung 22: Die Phosphorylierung der *focal adhesion kinase* (FAK) ist abhängig vom Paxillin-Expressions-Niveau.

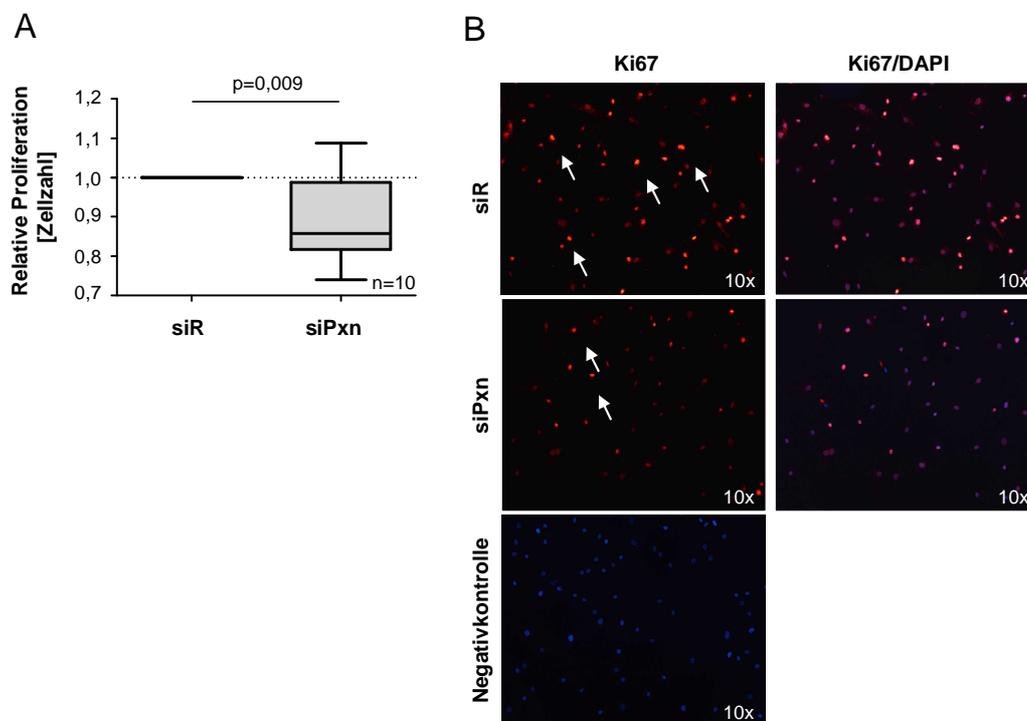
A. Repräsentative Western Blots der FAK Tyrosin (Y) 397 oder Tyrosin (Y) 576 Phosphorylierung, FAK und Paxillin-Protein-Expression 72 Stunden nach verminderter Paxillin-Expression (siPxn) im Vergleich zur Kontrolle (siR). **B.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen von A (n=6-12). Die Protein-Phosphorylierung wurde zu β -Aktin normalisiert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Phosphorylierung von Paxillin in Verbindung zum Expressions-Niveau der FAK steht; gleiches gilt auch für die Phosphorylierung von FAK. Hier zeigt sich ein Einfluss des Paxillin Expressions-Niveaus auf die Phosphorylierung von FAK.

3.8 Einfluss von Paxillin auf die Proliferation und Apoptose von humanen pulmonalerteriellen glatten Muskelzellen

Im vorherigen Abschnitt wurde die Rolle von Paxillin am Adhäsions-Verhalten humaner PASMCMC dargelegt. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob Paxillin auch Einfluss auf weitere zelluläre Prozesse, wie das Proliferations- und Apoptose-Verhalten hat. Sowohl bei Proliferations- als auch bei Apoptose-Vorgängen handelt es sich um

zelluläre Prozesse, deren Dysregulation/Fehlregulation maßgeblich zur Pathogenese der pulmonalen Hypertonie beiträgt (Humbert et al, 2004). In der Tat führte eine verminderte Paxillin-Expression, induziert durch die Transfektion einer siRNA gegen Paxillin, zu einer reduzierten Proliferation, bestimmt durch Zellzählung und Immunofluoreszenz-Färbungen mit dem Proliferationsmarker Ki67 (**Abbildung 23 A, B**). In Folge des Paxillin *silencings* konnte bei diesen Färbungen eine deutlich reduzierte Anzahl Ki67-positiver humaner PASMC beobachtet werden. Die verminderte Proliferation war von einem gesteigerten Apoptose-Verhalten der PASMC begleitet, indem die Caspase-3 Aktivität nach dem Paxillin *knockdown* bestimmt wurde (**Abbildung 23 C**).



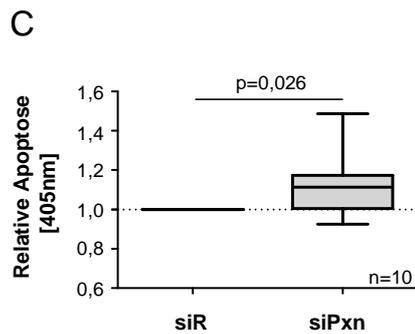


Abbildung 23: Einfluss des Paxillin *knockdowns* auf das Proliferations- und Apoptose-Verhalten von humanen PSMC.

A. Proliferation von humanen PSMC untersucht mittels Zellzählung nach siRNA-Transfektion gegen Paxillin (siPxn) im Vergleich zur Kontrolle (siR; n=10). **B.** Immunofluoreszenz-Färbung von humanen PSMC nach dem Paxillin *silencing* (siPxn) mit dem Proliferationsmarker Ki67 (rot) im Vergleich zur Kontrolle (siR). Exemplarisch sind Ki67-positive und damit proliferierende Zellen mit einem Pfeil markiert. Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). **C.** Apoptose humaner PSMC durch Bestimmung der Caspase-3 Aktivität nach dem Paxillin *knockdown* (siPxn) im Vergleich zur Kontrolle (siR; n=10).

Zusammenfassend zeigt sich ein Einfluss der Paxillin-Expression auf die Proliferation und die Apoptose und damit auf die Homöostase der PSMC.

Die Protein-Kinasen Akt und Erk1/2 spielen Schlüsselrollen in vielen zellulären Prozessen, zum Beispiel in der Regulation von Proliferations- und Apoptose-Vorgängen (Keshet & Seger; Mebratu & Tesfaigzi, 2009). Im Folgenden wurde demnach der Einfluss von Paxillin auf die Aktivierung (Phosphorylierung) der Kinasen Akt und Erk1/2 in humanen PSMC untersucht. Western Blot Analysen von Zellextrakten nach siRNA Transfektion gegen Paxillin (siPxn) ergaben eine verminderte Phosphorylierung der beiden Kinasen, Akt und Erk1/2, im Vergleich zur Kontrolle (siR) (**Abbildung 24 A, B**).

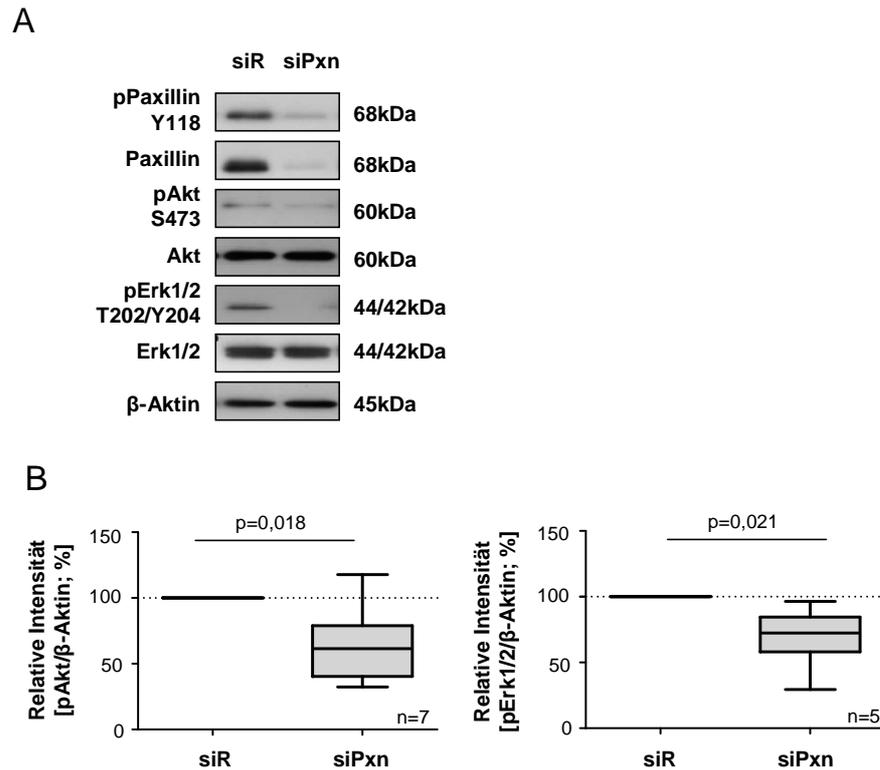


Abbildung 24: Einfluss des Paxillin knockdowns auf intrazelluläre Signaltransduktionswege.

A. Repräsentative Western Blots der Paxillin Tyrosin (Y) 118, Akt Serin (S) 473 oder Erk1/2 Threonin/Tyrosin (T/Y) 202/204 Phosphorylierung nach siRNA-Transfektion gegen Paxillin (siPxn) im Vergleich zur Kontrolle (siR). **B.** Western Blot Analysen von C quantifiziert mittels Densitometrie (Akt: n=7; Erk 1/2: n=5). Die Protein-Phosphorylierung wurde zu β -Aktin normalisiert.

Insgesamt konnte hier der Einfluss von Paxillin auf die Aktivierung der Kinasen Akt und Erk1/2 dargelegt werden.

3.9 Wirkung von Hypoxie auf die Regulation der Paxillin-Expression

Nach der nun untersuchten Bedeutung von Paxillin an zellulären Prozessen war es jetzt von besonderem Interesse Stimuli/Faktoren zu identifizieren, die die Expression von Paxillin regulieren. Die erhöhte *in vivo* Expression von Paxillin in pulmonalen Gefäßen von chronisch hypoxisch gehaltenen Mäusen im Vergleich zu normoxischen Tieren könnte darauf hindeuten, dass die Paxillin-Expression in den glatten Muskelzellen Hypoxie-abhängig reguliert wird. Um diesem nachzugehen, wurden *in vitro* Versuche

auf Zellebene durchgeführt und humane PASMC für 24 Stunden unter normoxischen (21 % O₂) bzw. hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) inkubiert. Sowohl auf mRNA (**Abbildung 25 A**) als auch auf Proteinebene konnte unter Hypoxie eine signifikant erhöhte Paxillin-Expression beobachtet werden (**Abbildung 25 B-D**).

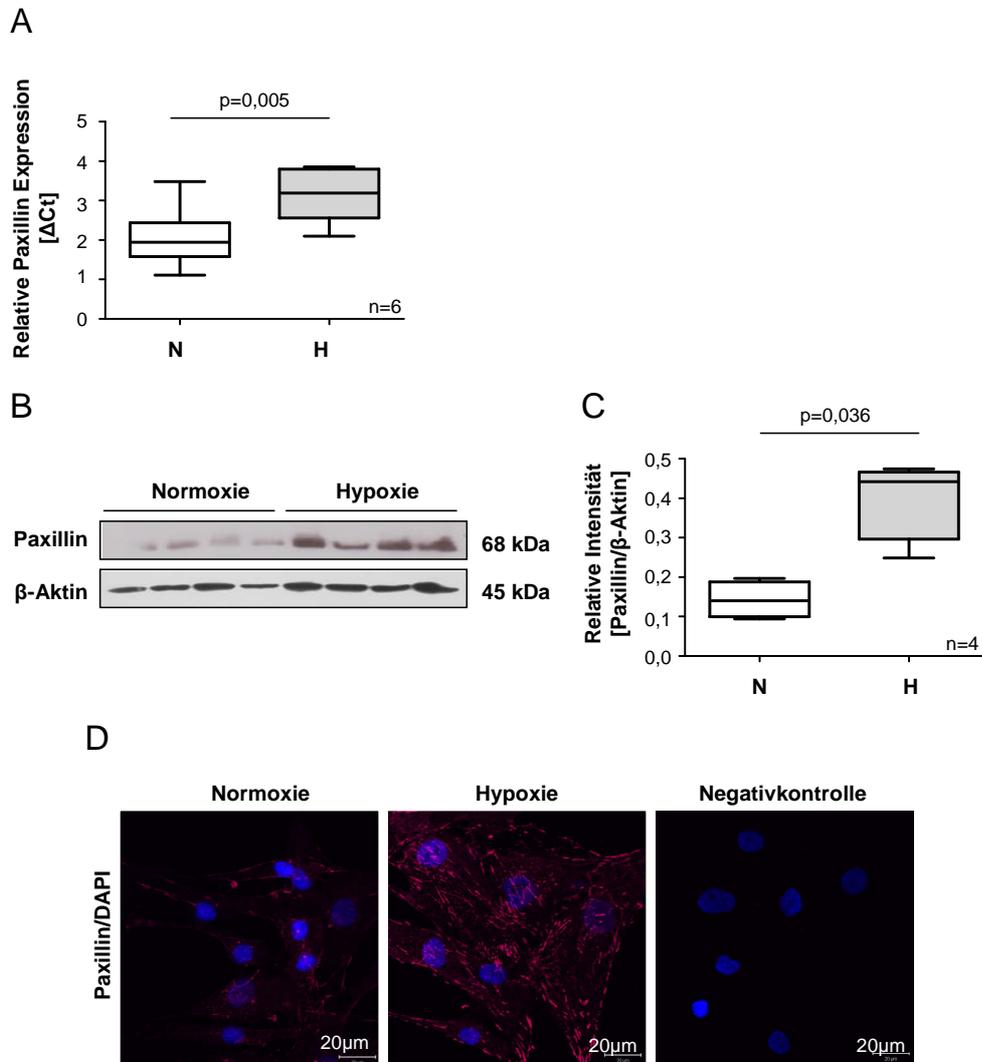


Abbildung 25: Hypoxie-abhängige Regulation der Paxillin-Expression in humanen PASMC.

A., B. Paxillin-Expression in humanen PASMC, inkubiert für 24 Stunden unter Normoxie (N; 21 % O₂) oder Hypoxie (H; 1 % O₂). **A.** *Real-Time* PCR (n=6, pro Gruppe). **B.** Western Blot Analyse. **C.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analyse von B (n=4, pro Gruppe). **D.** Immunofluoreszenz-Färbung von Paxillin (rot) in humanen PASMC nach 24 Stunden Normoxie- (21 % O₂) oder Hypoxie- (1 % O₂) Inkubation. Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG).

Insgesamt konnte hier die Hypoxie-abhängige Regulation der Paxillin-Expression in humanen PASMC aufgezeigt werden.

3.10 Molekulare Mechanismen der Paxillin-Expression unter Hypoxie

Die Hypoxie-abhängige Regulation lässt vermuten, dass die Paxillin-Expression durch den konservierten HIF-1- (*hypoxia inducible factor* – Hypoxie-abhängiger Transkriptionsfaktor) abhängigen Signaltransduktionsweg reguliert wird.

Der *knockdown* der HIF-1 α -Expression in humanen PASMC induzierte eine signifikant inhibierte Paxillin-mRNA-Expression unter hypoxischen Bedingungen (**Abbildung 26 A**). Die Paxillin-Promotor-Analyse ergab zudem drei potenzielle HIF-Bindestellen, die auch als HRE (*hypoxia response element*) bezeichnet werden und hier der Transkriptionsstartstelle des Paxillin-Gens vorgeschaltet sind. Die drei HREs konnten bei -1208, -154 und -99 bp lokalisiert werden (**Abbildung 26 B**). Die 1500 bp Sequenz des Paxillin Promotors ist in **Tabelle 8** im Anhang aufgeführt.

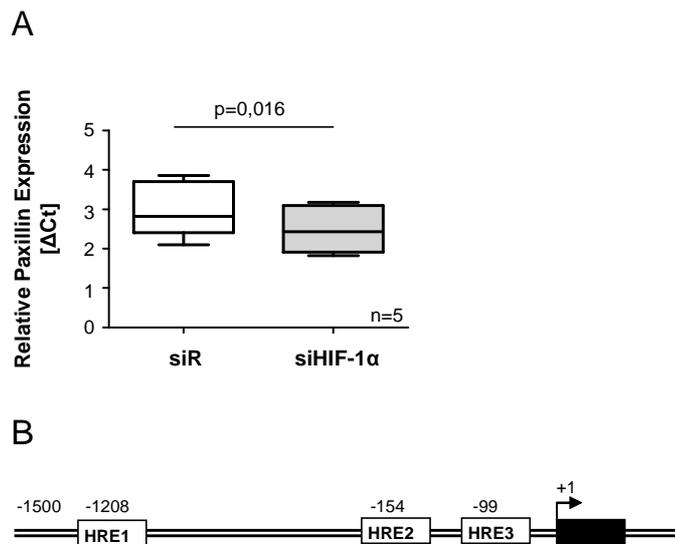


Abbildung 26: HIF-1 α -abhängige Regulation der Paxillin-Expression in PASMC.

A. Paxillin-mRNA-Expression nach Hypoxie-Inkubation (24 Stunden; 1% O₂) von siHIF-1 α transfizierten PASMC im Vergleich zur Kontrolle (siR) (n=5, pro Gruppe). **B.** Schematische Abbildung des Paxillin-Promotors (1500bp) mit potenziellen *hypoxia response elements* (HRE), dargestellt als Boxen. Die Transkriptionsstartstelle des Paxillin-Gens ist mit +1 gekennzeichnet.

Um die Funktionalität der drei potenziellen HREs zu überprüfen, wurden *Electrophoretic Mobility Shift Assays* (EMSA) durchgeführt. Es wurden dazu drei Sonden verwendet, die jeweils eines der drei HREs und die flankierende Sequenzen im Paxillin-Promotor umfassten. Wie an **Abbildung 27** ersichtlich, zeigte sich, dass

Proteine aus nukleären Extrakten von sowohl normoxischen als auch hypoxischen PASMCM an alle drei HREs banden. Die Binding an die HRE war des Weiteren unter Verwendung der hypoxischen Extrakte potenziert.

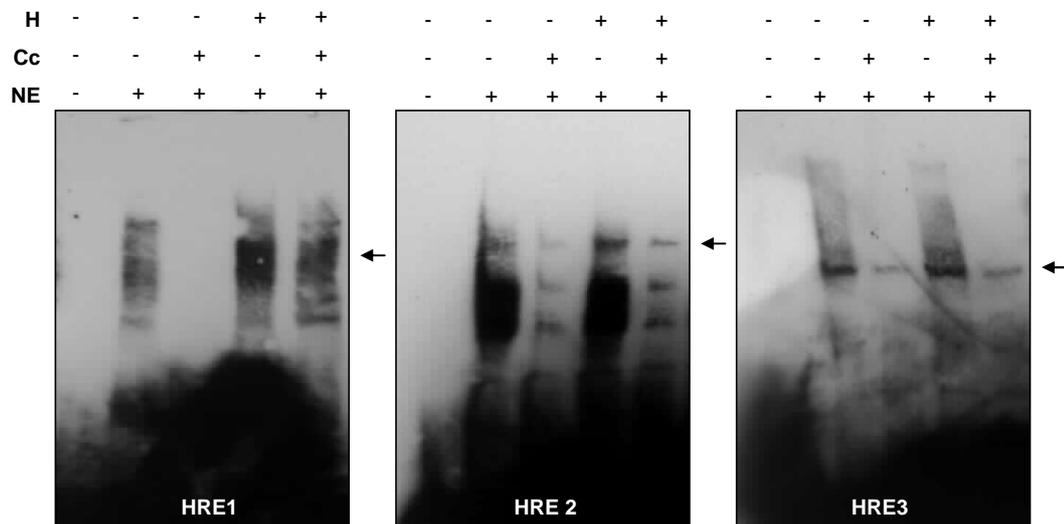


Abbildung 27: Hypoxie-induzierte Aktivierung der Paxillin-Expression in humanen PASMCM.

Repräsentative *Electrophoretic Mobility Shift* Assay Analyse des HRE1, HRE2 und HRE3 mit nukleären Extrakten (NE) aus normoxischen (2 Stunden; 21 % O₂) oder hypoxischen (H; 2 Stunden; 1 % O₂) humanen PASMCM und Biotin-markierten Oligonukleotid-Sonden, die mit den möglichen HREs im Paxillin-Promotor korrespondierten (n=3 pro HRE). Pfeil = *shift*-Komplex; Cc = *cold competitor* (unmarkierte Sonde).

Zusammenfassend konnte der Transkriptionsfaktor HIF-1 α als molekularer Mechanismus der Paxillin-Expression detektiert werden. Über seine Bindung an die drei HREs im Paxillin-Promoter potenziert er dabei die Expression des Paxillin Gens.

3.11 Einfluss von Hypoxie auf die Paxillin Tyrosin Phosphorylierung

Um den möglichen Einfluss von Hypoxie auf die Paxillin-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden humane PASMCM unter Normoxie bzw. Hypoxie für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Sowohl die Paxillin Tyrosin (Y) 31 als auch die Tyrosin (Y) 118 Phosphorylierung war in Folge der vierstündigen Hypoxie-Inkubation

signifikant potenziert, während die Paxillin-Expression erst nach 24 Stunden signifikant erhöht war **Abbildung 29 A, B)** – eine Bestätigung der Ergebnisse von **Abschnitt 3.9**.

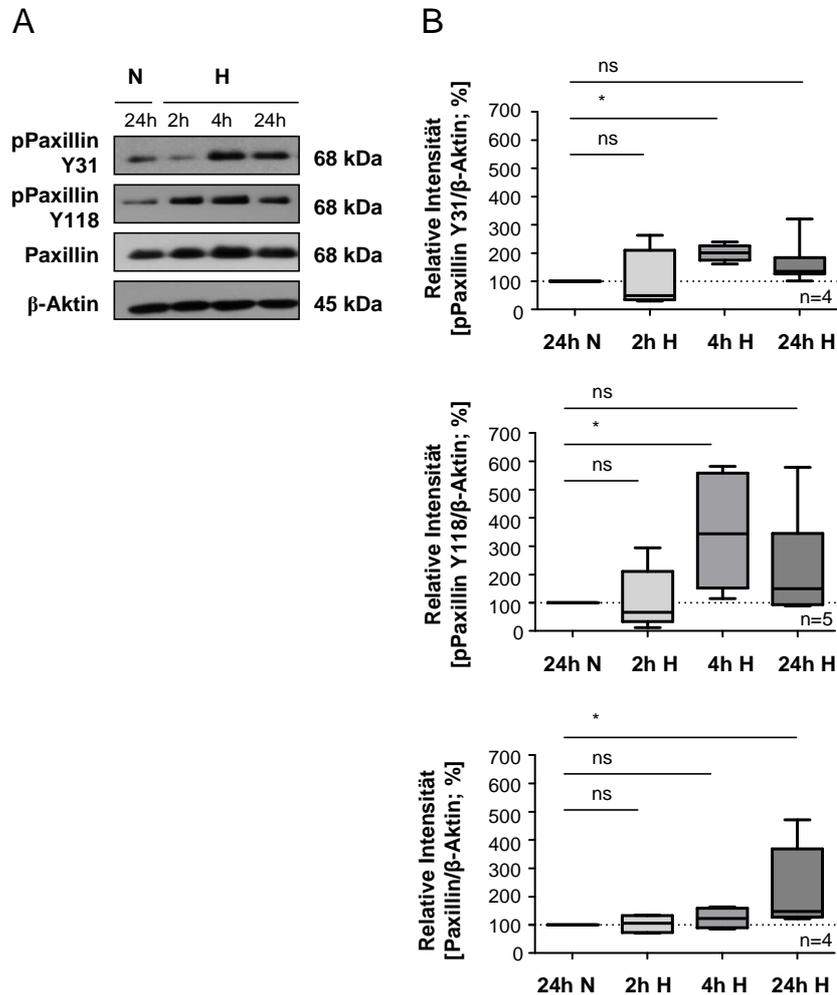
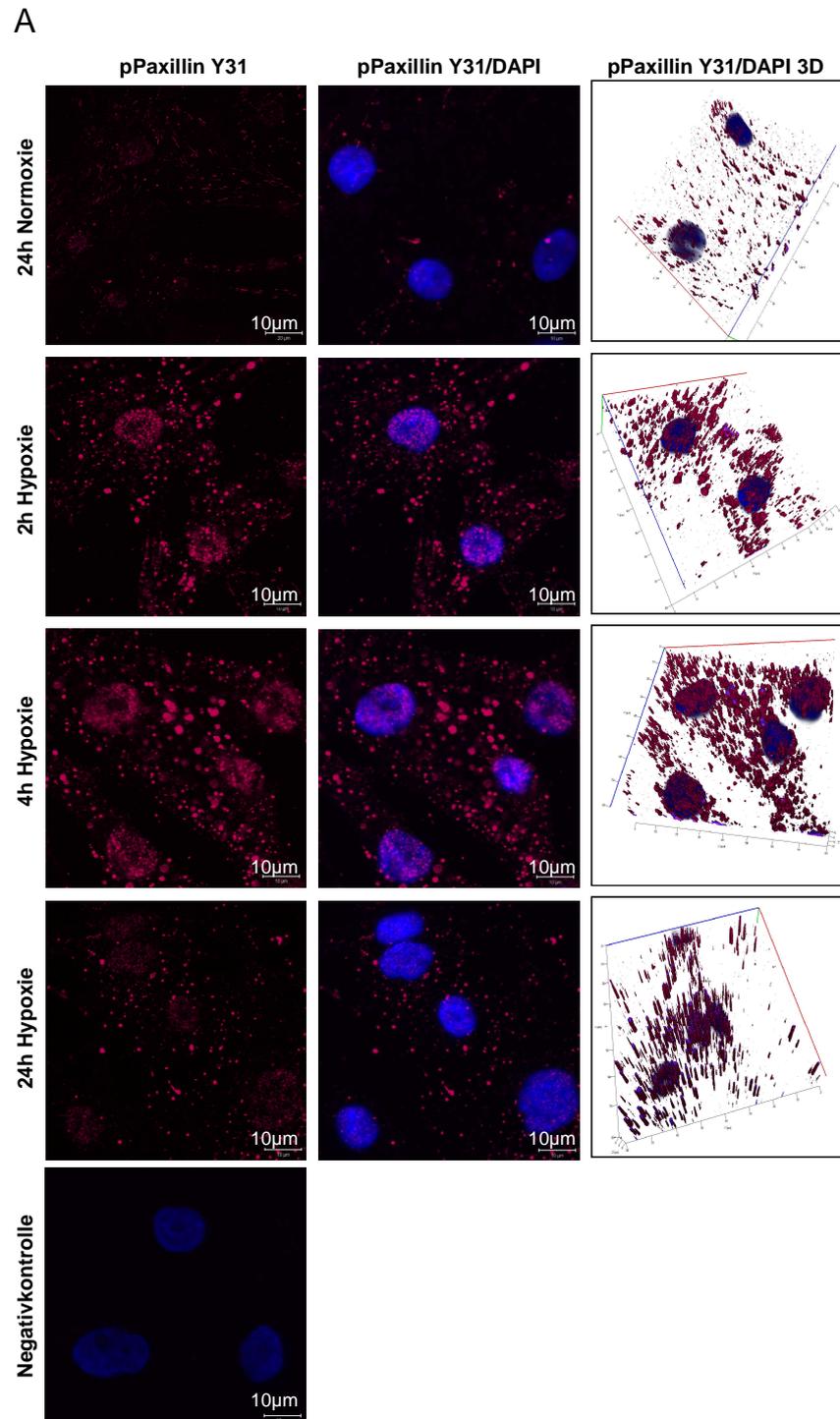


Abbildung 29: Hypoxie-induzierte Paxillin Phosphorylierung in humanen PASMC.

A. Repräsentative Western Blot Analysen der Paxillin Tyrosin (Y) 31 und 118 Phosphorylierung nach 24 Stunden normoxischer (24h N; 21 % O₂), oder 2, 4 bzw. 24 Stunden hypoxischer (2h H, 4h H, 24h H; 1 % O₂) Inkubation von humanen PASMC. **B.** Densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen von A (n=4-5, pro Gruppe). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem * dargestellt. ns = nicht signifikant.

Immunofluoreszenz-Färbungen von humanen PASMC ergaben eine Lokalisation von Paxillin Tyrosin (Y) 31 im Zytoplasma. Interessanterweise konnte es in Folge der Hypoxie-Inkubation der Zellen schließlich sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma detektiert werden (**Abbildung 30 A**). Im Gegensatz dazu konnte Paxillin Tyrosin (Y)

118 unter Hypoxie vermehrt in den fokalen Adhäsionskomplexen der humanen PASMC detektiert werden (**Abbildung 30 B**).



B

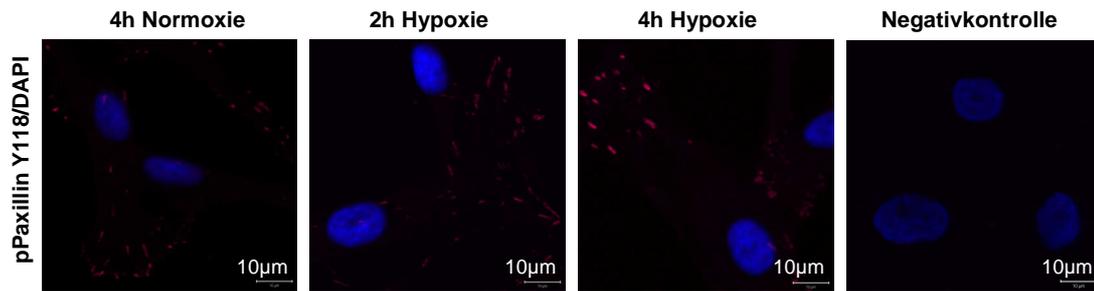


Abbildung 30: Einfluss von Hypoxie auf die Lokalisation von Paxillin Y31 und Y118 in humanen PASMCS.

A. Immunofluoreszenz-Färbung von Paxillin Tyrosin (Y) 31 (rot) in humanen PASMCS, inkubiert für 24 Stunden (h) unter Normoxie (21 % O₂) oder 2,4 bzw. 24 Stunden unter Hypoxie (1 % O₂). Eine 3D-Darstellung ist zusätzlich gezeigt (rechte Seite der Abbildung). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG). **B.** Immunofluoreszenz-Färbung von Paxillin Tyrosin (Y) 118 (rot) in humanen PASMCS, inkubiert für 4 Stunden (h) unter Normoxie (21 % O₂), bzw. 2 oder 4 Stunden unter Hypoxie (1 % O₂). Die Negativkontrolle entspricht der Färbung mit einer Antikörper-Isotyp-Kontrolle (IgG).

Hypoxie konnte neben dem Einfluss auf die Paxillin-Expression in diesem Abschnitt auch als Stimulus für die Paxillin Tyrosin 31 und 118 Phosphorylierung identifiziert werden. Des Weiteren konnte eine Hypoxie-abhängige Translokation von Tyrosin 31 phosphoryliertem Paxillin in den Zellkern dargelegt werden.

4 Diskussion

Prozesse wie die Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen sind bedeutende Voraussetzungen für den Umbauprozess der Blutgefäße, welches ein Charakteristikum der pulmonalen Hypertonie darstellt (Davies & Morrell, 2008). In jüngster Zeit mehren sich die Befunde einer Beteiligung von speziell zytoskeletalen Proteinen an diesen zellulären Prozessen (Parsons et al; Vuori, 1998; Wary et al). Dennoch ist über die Bedeutung dieser Proteine an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie selbst bislang nur sehr wenig bekannt.

In einer früheren Studie konnte von Kwapiszewska et al. (Kwapiszewska et al, 2008) das zytoskeletale Protein Fhl-1 als eines der am stärksten herauf regulierten Proteine in der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus identifiziert werden. Auch in Patienten mit idiopathisch pulmonaler arterieller Hypertonie (IPAH) bestätigte sich die Beteiligung von Fhl-1 an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie. Fhl-1 zeigte eine im Vergleich zur Kontrolle (gesunde Lunge) vermehrte Expression in Lungenhomogenaten von IPAH-Patienten. Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen der Expression von Fhl-1 und dem Proliferations- und Migrations-Verhalten von humanen pulmonaler arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) aufgezeigt (Kwapiszewska et al, 2008).

In der Literatur finden sich darüber hinaus Publikationen, die auf eine Beteiligung von Fhl-1 an der Muskel- und Linksherz-Hypertrophie der Maus schließen lassen (Chu et al, 2000; Schessl et al, 2008; Sheikh et al, 2008). Fhl-1 ist hier, wie bereits in der Einleitung erwähnt, Teil eines Sarkomer-Komplexes in den Kardiomyozyten, der biomechanische Reize wahrnimmt und über eine *scaffold* Eigenschaft Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAPK, speziell die *extracellular signal-regulated* Kinase, Erk und die Serin/Threonin Protein-Kinase Akt) zu diesem Komplex rekrutiert. Über das MAPK *signalling* kommt es schließlich zur Aktivierung von Genen, die in die hypertrophe Antwort des Muskels und damit auch in die Pathogenese der Linksherzhypertrophie involviert sind (Sheikh et al, 2008). Mäusen hingegen, denen das Fhl-1 Protein fehlt (Fhl-1 *knockout* Mäuse), zeigen ein vermindertes MAPK *signalling* und eine abgeschwächte hypertrophe Antwort des Herzens (Sheikh et al, 2008).

Um die pathophysiologische Rolle von Fhl-1 im Gefäßumbauprozess besser verstehen zu können, wurde für diese Arbeit in Kooperation mit Dualsystem Biotech AG (Schlieren, Schweiz) eine cDNA Bibliothek aus der Mauslunge nach neuen Fhl-1 Interaktionspartner-Kandidaten mit Hilfe des *Yeast two-Hybrid* Systems durchsucht. Diese Analyse identifizierte das fokale Adhäsionsprotein Paxillin als ein neues, mögliches Fhl-1-bindendes Protein.

Auf Grund der Möglichkeit, dass bei *Yeast two-Hybrid* Analysen auch falsch positive Interaktionspartner identifiziert werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die potenzielle Bindung zwischen Paxillin und Fhl-1 verifiziert. Es wurden hierzu Ko-Immunopräzipitations-Versuche durchgeführt, die das Ergebnis der *Yeast two-Hybrid* Analyse bestätigten. Die Interaktion der beiden Proteine konnte dabei sowohl in mikrovaskulären PASMCM der Maus, als auch in humanen PASMCM detektiert werden, was darauf hindeutet, dass Paxillin und Fhl-1 nicht Spezies-spezifisch aneinander binden.

Interessanterweise wurde in der Studie von Kwapiszewska et al (Kwapiszewska et al, 2008) das zytoskeletale Protein Talin1, ein bekannter Interaktionspartner von Paxillin in myeloiden Zelllinien (Salgia et al, 1995), als ein anderes Fhl-1 bindendes Protein identifiziert.

Ebenso wie Fhl-1 und Talin1 gehört auch Paxillin zu der Familie der LIM-Proteine. Paxillin weist vier LIM-Domänen und fünf Leucin-reiche LD Regionen auf (**Abbildung 31**), welche von entscheidender Bedeutung für Protein-Protein Interaktionen sind (Schaller, 2001).



Abbildung 31: Schematische Darstellung des Paxillin-Proteins.

Das Paxillin-Protein besteht aus 557 Aminosäuren, N-terminal sind 5 LD Motiven und C-terminal 4 LIM-Domänen lokalisiert. LD: Leucin-reiche Domäne; NH₂: N-Terminus; COOH: C-Terminus.

Zusammenfassend konnte Paxillin als neuer Fhl-1 Interaktionspartner identifiziert werden. Eine komplexe funktionelle Interaktion scheint dabei zwischen den drei Proteinen, Paxillin, Fhl-1 und Talin1, möglicherweise über die LIM-Domänen, denkbar. Auch eine gegenseitige Regulation in der Expression ist naheliegend, wie sie in dieser

Arbeit für Paxillin beobachtet werden konnte – der Paxillin *knockdown* zeigte einen negativen Einfluss auf die Fhl-1 Expression.

Paxillin ist ein bedeutendes *scaffold* und Phospho-Protein (Brown & Turner, 2004; Deakin & Turner, 2008; Turner, 1998), das diverse zelluläre Prozesse, wie die intrazelluläre Signaltransduktion (Tumbarello et al, 2002), die Motilität (Petit et al, 2000), die Adhäsion (Chen & Kroog, 2010), die Ausbreitung (*spreading*) (Chen & Kroog, 2010) und die Apoptose (Chay et al, 2002) von Zellen reguliert. Wird beispielsweise die extrazelluläre Matrix-induzierte Phosphorylierung des Tyrosin 31 und 118 Restes von Paxillin verhindert (z.B. durch die Überexpression von Paxillin Tyrosin 31 und Tyrosin 118 Mutanten), wirkt sich dieses nachteilig auf die Motilität von Krebszellen aus (Petit et al, 2000). In Leukozyten wird Paxillin darüber hinaus ein anti-apoptotischer Effekt zugewiesen. In Folge der Überexpression von Paxillin wird in diesen Zellen das Apoptose-Verhalten inhibiert (Chay et al, 2002). Des Weiteren inhibiert der Paxillin *knockdown* in Brustkrebszellen die Adhäsion und das *spreading* dieser Zellen.

Neben dem Einfluss auf die zuvor genannten zellulären Prozesse spielt Paxillin auch eine entscheidende Rolle in der Ontogenese, d.h. in der Entwicklung des Lebewesens. Dies ist neben den eben aufgeführten Prozessen, die durch Paxillin reguliert werden, der Grund warum Paxillin *knockout* Mäuse nicht lebensfähig sind. Embryonen dieser Mäuse sterben am Tag 9,5 (E 9,5 – *embryonic day 9.5*) auf Grund von Defekten im Amnion (Embryonalhülle), der Allantois (embryonaler Harnsack, ein wichtiger Ort der Vaskulogenese in der Maus), vermindertem Wachstum und abnormaler Herz- und Somiten (entwickeln sich später zur Haut, dem Skelettmuskel und der Wirbelsäule) - Entwicklung (Hagel et al, 2002).

Da bisher keine Paxillin-Inhibitoren für *in vivo* Studien erhältlich sind, konnten in dieser Arbeit nur Untersuchungen auf zellulärer Ebene und damit *in vitro* durchgeführt werden, um die funktionelle Rolle von Paxillin aufzuschlüsseln. Es bestand hierzu jedoch die Möglichkeit auf humane PSMC zurückgreifen zu können. In diesen Zellen konnte in Folge des Paxillin *knockdowns* (hervorgerufen durch die Transfektion einer siRNA gegen die Paxillin mRNA-Sequenz) eine inhibierte Adhäsion und Proliferation und eine erhöhte Apoptose-Rate von humanen PSMC detektiert werden. Die Regulation dieser Prozesse könnte über die Akt und Erk1/2 Signaltransduktionswege erfolgen, da das

Paxillin *silencing* eine erniedrigte Phosphorylierungs-Rate und damit herabgesetzte Aktivierung dieser Kinasen bedingte (**Abbildung 32**). Sowohl in den Akt- als auch in den Erk1/2-Signaltransduktionsweg münden mehrere Signaltransduktionswege, die an der Regulation der Zell-Proliferation und an der Progression von hyperplastischen Erkrankungen wie der pulmonalen Fibrose (Robledo & Mossman, 1999), Krebs (Keshet & Seger; Mebratu & Tesfaigzi, 2009) sowie der pulmonalen Hypertonie (Liu et al, 2004) involviert sind.

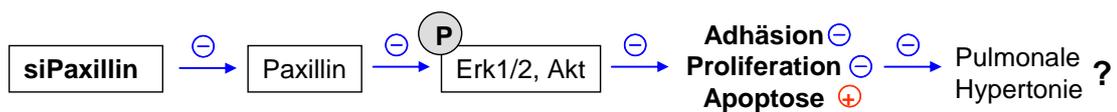


Abbildung 32: Modell vom Einfluss der Paxillin-Expression auf das Adhäsions-, Proliferations- und Apoptose-Verhalten von humanen PASMC und die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie.

Die Transfektion von humanen PASMC mit einer siRNA gegen Paxillin (siPaxillin) induziert eine verminderte Paxillin-Expression, die mit einer inhibierten Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Protein Kinasen Erk1/2 und Akt einher geht. Die reduzierte Aktivierung/Phosphorylierung dieser Kinasen könnte das Adhäsions- und Proliferations-Verhalten negativ und das Apoptose-Verhalten von humanen PASMC positiv beeinflussen haben. In Folge einer verminderten Paxillin-Expression könnte demnach möglicherweise eine abgeschwächte pulmonale Hypertonie resultieren.

Hyperplasie und Hypertrophie von PASMC zusammen mit der Deposition von extrazellulären Matrix-Proteinen sind Kennzeichen des vaskulären Gefäßumbaus, welcher zur pulmonalen Hypertonie führt (Davies & Morrell, 2008; Rabinovitch, 1996). Die Verbindung von pulmonaler Hypertonie mit der erhöhten Deposition der extrazellulären Matrix-Proteine lässt vermuten, dass Veränderungen in der extrazellulären Matrix zelluläre Signaltransduktionswege verändern und eventuell potenzieren. Möglicherweise können so Prozesse wie die Adhäsion, die Proliferation und die Apoptose von Zellen beeinflusst werden (Boudreau & Jones, 1999; Colognato et al, 2004; Kim et al, 2011). Entsprechend dieser Vermutungen konnte in dieser Arbeit eine erhöhte Fibronectin-Expression in Lungenproben von IPAH-Patienten im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Weitere Belege finden sich auch in der Literatur, wonach ein erhöhtes Expressions-Niveau von Fibronectin in Maus- und Kälber-Modellen der pulmonalen Hypertonie beobachtet werden konnte (Kwapiszewska et al, 2005) (Durmowicz et al, 1994; Rabinovitch, 2001).

Die erhöhte Fibronectin-Expression in Lungen von IPAH-Patienten könnte, wie bereits erwähnt, von großer Bedeutung für Signaltransduktionsprozesse in den PASMC sein. So ist bekannt, dass die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix ein Zusammenlagern der transmembranen Integrine (als Integrin *clustering* bezeichnet), ein Ausbilden und Umbilden von fokalen Adhäsionskomplexen, eine Aktivierung von intrazellulären Signaltransduktionswegen und eine Reorganisation des Zell-Zytoskeletts bewirkt. Zytoskeletale Veränderungen sind schließlich Voraussetzung für die Steuerung/Regulation diverser zellulärer Prozesse (Defilippi et al, 1999; Schlaepfer et al, 1999).

Anhand der *in vitro* Experimente dieser Arbeit wurde deutlich, dass durch Fibronectin tatsächlich alle Stufen der Paxillin-vermittelten Signalkaskade auf Zellebene potenziert wurden – die Adhäsion der glatten Muskelzellen wurde erleichtert, es bildeten sich mehr Paxillin-reiche fokale Adhäsionskomplexe aus und es konnte eine vermehrte Paxillin-Fhl-1 Interaktion in Anwesenheit von Fibronectin beobachtet werden. Darüber hinaus traten in PASMC, die auf Fibronectin-beschichteten Platten kultiviert wurden, eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Paxillin Tyrosin 118 Phosphorylierung auf. Diese Phosphorylierung könnte die Rekrutierung anderer Signalmoleküle zu den fokalen Adhäsionskomplexen bewirken, welches dann nachfolgende Prozesse, wie z.B. die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Kinasen, stimulieren/regulieren könnte (Bellis et al, 1995). All dieses deutet darauf hin, dass Fibronectin ein Schlüsselprotein für die Regulation der Paxillin-Funktion sein könnte.

Ein Fokus der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Fibronectin-induzierten Paxillin-vermittelten Signaltransduktion. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Proteine der extrazellulären Matrix wie zum Beispiel Laminin oder Kollagen die Paxillin-Phosphorylierung und damit die PASMC-Homöostase beeinflussen könnten.

Paxillin wird als ein Schlüsselprotein in den fokalen Adhäsionskomplexen beschrieben, da es die Kommunikation zwischen den Integrinen und den Aktin-Filamenten fördert (Turner, 2000a). Diese Rolle konnte durch die in dieser Arbeit gezeigten Immunofluoreszenz-Färbungen auch für PASMC und damit für das pulmonale System bestätigt werden. In Folge des Paxillin *knockdowns* traten deutliche Veränderungen und Defekte im Zytoskelett von humanen PASMC auf. Diese Veränderungen im Zytoskelett könnten auf einer reduzierten Interaktion von Proteinen, die die zytoskeletale

Architektur regulieren, beruhen, möglicherweise indem Integrin-aktivierte Signaltransduktionswege verändert sind. Als mögliches Beispiel für ein solches Protein ist die *focal adhesion kinase* (FAK) (Zouq et al, 2009).

Aus diesem Grunde wurde der Effekt des Paxillin *knockdowns* auf die Phosphorylierung von FAK in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Daten zeigten, dass das Paxillin *silencing* einen negativen Einfluss auf die FAK-Phosphorylierung aufweist, welche wiederum im Zusammenhang mit der Aktivierung von Mitogen-aktivierten Signaltransduktionswegen stehen könnte (Siesser & Hanks, 2006). Diese Experimente könnten somit die Rolle von Paxillin an der Regulation der FAK- und damit möglicherweise auch an der Erk1/2- und Akt-Aktivität unterstreichen. Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine reduzierte Paxillin-Phosphorylierung nach verminderter FAK-Expression beobachtet, welches ein Indiz dafür sein könnte, dass sich beide Proteine gegenseitig (bidirektional) regulieren.

Neben dem Einfluss von Paxillin auf zelluläre Prozesse und Signaltransduktionswege, die der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie zu Grunde liegen, konnte die Beteiligung von Paxillin an der pulmonalen Hypertonie in dieser Arbeit durch die folgenden Aspekte untermauert werden:

- Paxillin zeigte eine erhöhte Expression in Lungen von IPAH-Patienten.
- in lasermikrodissezierten intrapulmonalen Arterien von chronisch hypoxischen Mäusen, die eine pulmonalen Hypertonie entwickelt hatten, konnte eine gesteigerte Paxillin-Expression detektiert werden.
- Paxillin wies eine vorherrschende Expression in der Media von intrapulmonalen Gefäßen, einem Hauptkompartiment des Gefäßumbaus in verschiedenen Formen der pulmonalen Hypertonie (Jeffery & Wanstall, 2001; Weissmann et al, 2007), auf.

Die Interaktion von Paxillin mit anderen Molekülen wie RhoA, welches hyperaktiv in der pulmonalen Hypertonie ist (Barman et al, 2009; Ishikura et al, 2006; Laumanns et al, 2009) könnte die Rolle von Paxillin auf die Pathogenese dieser Erkrankung weiter bekräftigen. Neben der Aktivierung von ROCK (RhoA Kinase) aktiviert RhoA auch den Komplex aus FAK und Paxillin (Hirakawa et al, 2004), welches ein weiterer

Hinweis für den Einfluss auf den vaskulären Gefäßumbauprozess in der pulmonalen Hypertonie sein könnte.

Als ein Auslöser für eine erhöhte Paxillin-Expression konnte in Rahmen dieser Arbeit die Hypoxie identifiziert werden. Die Heraufregulation von Paxillin im Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie in der Maus konnten in humanen PASMC *in vitro* bestätigt werden. Die unter Hypoxie-Bedingungen stimulierte Paxillin mRNA- und Protein-Expression wird dabei über den Transkriptionsfaktor HIF-1 α reguliert. Eine verminderte Expression dieses Transkriptionsfaktors bedingte in Hypoxie-inkubierten humanen PASMC eine reduzierte Paxillin mRNA Expression. Neben dem hier, nach dem eigenen Kenntnisstand, zum ersten Mal beschriebenen Einfluss von HIF-1 α auf die Paxillin-Expression kann und darf aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Transkriptionsfaktoren an der erhöhten Paxillin-Expression in humanen PASMC involviert sind, indem sie möglicherweise synergistisch mit HIF-1 α wirken. Hinweise aus der Literatur deuten hier auf Mitglieder des *activator protein-1* (AP-1) Komplexes hin (Guller et al, 2009).

Die Funktionalität der drei potenziellen *hypoxia response elements* (HREs) im Paxillin-Promotor konnten durch EMSA-Experimente bestätigt werden. Da an alle drei HREs Proteine banden, deutet dieses darauf hin, dass alle drei HREs für die Hypoxie-Sensitivität des Promotors und damit für die Paxillin-Expression von Bedeutung sind. Weiter aufklären ließe sich dieses mit einem Luziferase-Reporter Assay, indem man ein oder mehrere HREs mutiert und dann die Promotor-Aktivität unter Hypoxie bestimmt.

Neben dem Einfluss auf die Paxillin-Expression, konnte Hypoxie auch als ein Stimulus für die Paxillin Tyrosin-Phosphorylierung (31 und 118) in humanen PASMC identifiziert werden. Interessanterweise zeigte die am Tyrosin-Rest 31 phosphorylierte Form von Paxillin eine Hypoxie- und Zeit-abhängige Translokation in den Zellkern der Zellen.

Die Eigenschaft, dass LIM-Proteine sich zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern hin und her bewegen können, wurde schon für Paxillin (Dong et al, 2009; Woods et al, 2005; Woods et al, 2002) und auch andere Mitglieder der Paxillin-Familie (Hic-5, Leupaxin) in anderen Zelltypen beobachtet (Shibanuma et al, 2003; Sundberg-Smith et al, 2008). Dass in dieser Arbeit die nukleäre Lokalisation von Paxillin für humane PASMC nicht bestätigt werden konnte, könnte möglicherweise auf dem Fehlen eines

geeigneten Stimulus für die nukleäre Translokation beruhen. Für Hic-5 wurde zum Beispiel H_2O_2 als Stimulus für den nukleären Import identifiziert (Shibanuma et al, 2003).

Wie kommt es jedoch zur Anreicherung der Tyrosin 31 phosphorylierten Form von Paxillin im Zellkern, obwohl Mitglieder der Paxillin-Familie keine klassische nukleäre Lokalisations-Sequenz (NLS) besitzen (Wang & Gilmore, 2003)? Diese Frage kann auch in dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Beim Eintritt in den Zellkern scheint aber eine Assoziation mit einem Protein, das eine NLS aufweist, denkbar (Wang & Gilmore, 2003).

Die Phosphorylierung des Paxillin Serin 272 Restes konnte so bereits als Ursache für die Akkumulation von Paxillin im Zellkern identifiziert werden (Dong et al, 2009). Möglicherweise gilt ähnliches auch für die Tyrosin 31 phosphorylierte Form von Paxillin.

Über die Bedeutung/Rolle der Tyrosin 31 phosphorylierten Form von Paxillin im Zellkern kann bisher nur spekuliert werden. Ein Einfluss auf die DNA-Synthese und das Proliferations-Verhalten von Zellen scheint denkbar und plausibel (Dong et al, 2009). Möglicherweise wirkt Paxillin Tyrosin 31 als Ko-Aktivator für Androgen oder Glucocorticoid-Rezeptoren und potenziert so die Genexpression. Gleiches wurde schon für Paxillin in Krebszelllinien aus der Prostata beschrieben (Kasai et al, 2003). Eine direkte Funktion als Transkriptionsfaktor scheint hingegen eher unwahrscheinlich, da die LIM-Domänen von Paxillin keine DNA-bindende-Aktivität aufweisen (Wang & Gilmore, 2003).

4.1 Kritische Betrachtung der verwendeten Modelle und Methoden

Die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie beruht auf dem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zelltypen (pulmonalarterielle glatte Muskelzellen – PASMC, Fibroblasten und Endothelzellen), sowie auf der Deposition von extrazellulären Matrixproteinen (Jeffery & Wanstall, 2001). Zur Aufschlüsselung dieser multifaktoriellen Pathogenese sind Tiermodelle der pulmonalen Hypertonie im Allgemeinen besser geeignet als Zellkulturmodelle; bei ersterem werden auch systemische, endokrine, metabolische und inflammatorische Einflüsse berücksichtigt.

Zellkulturmodelle mit der Co-Kultivierung mehrerer Zelltypen konnten bisher nicht etabliert werden. Auch würden in diesem Fall systemischen Einflüssen und endokrinen Faktoren keine Beachtung geschenkt werden.

Auch wenn man ein Tiermodell der pulmonalen Hypertonie wählt, muss man bedenken, dass diese Modelle nur Aufschluss über einige Aspekte der pulmonalen Hypertonie geben. Des Weiteren unterscheiden sich die auslösenden Faktoren der pulmonalen Hypertonie dieser Modelle oftmals (vgl. Hypoxie und Monocrotalin, die in dieser Arbeit Verwendung fanden) und können sich so auch in der unterschiedlichen Gen-Regulation manifestieren.

Bisher konnte kein Tiermodell der pulmonalen Hypertonie entwickelt werden, das die komplexen, pathologischen Veränderungen im Menschen, insbesondere das Auftreten von plexiformen Läsionen in allen Facetten rekapituliert (Humbert et al, 2004; Schermuly et al). In dieser Arbeit wurde sowohl auf das Modell der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus als auch auf das Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie in der Ratte zurück gegriffen. Beides sind Standard-Tiermodelle zur Untersuchung der pulmonalen Hypertonie (Stenmark et al, 2009).

Werden Mäuse unter chronischer Hypoxie gehalten, kommt es zum Anstieg des mittleren pulmonalarteriellen Drucks. Im Vergleich zu unter Hypoxie-gehaltenen Ratten oder Kälbern findet allerdings nur ein minimaler vaskulärer Gefäßumbau statt, welcher aber sehr reproduzierbar innerhalb eines Mausstamms ist (Stenmark et al, 2009). Folgende pathologische Veränderungen treten in den Mäusen auf: die Muskularisierung von vorher nicht-muskularisierten Gefäßen, eine minimale Verdickung der Media von muskularisierten Gefäßen, ein kurzzeitiger Anstieg in der Proliferation der glatten Muskelzellen und die Zunahme im Durchmesser von proximalen pulmonalen Arterien in Folge der Verdickung der Adventitia, Fibrose und Versteifung der Arterien (Stenmark et al, 2009).

Beim Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie hingegen handelt es sich um ein inflammatorisches Modell. Monocrotalin ist ein toxisches Pyrrolizidinalkaloid aus der Pflanze *Crotalaria spectabilis* (Stenmark et al, 2009). Es wird den Ratten mit einer einzelnen, subkutanen oder intraperitonealen Injektion verabreicht. In der Leber wird es zu Monocrotalin-Pyrrol metabolisiert, ins Blut abgegeben und gelangt so in die Lunge. Zunächst kommt es zu einer Endothel-Schädigung und einer massiven Infiltrierung von mononukleären Zellen in die Adventitia der Gefäße (Stenmark et al, 2009). Die Ratten entwickeln zwei bis drei Wochen nach der Monocrotalin-Injektion in Folge des

vaskulären Gefäßumbaus, welcher auch eine Verdickung der Intima (durch die Proliferation von PASMC) (Tanaka et al, 1996) beinhaltet, und der *de novo* Muskularisierung, eine schwere pulmonale Hypertonie mit erhöhtem pulmonalarteriellen Druck (Hessel et al, 2006). Ähnlich wie beim Menschen entwickeln auch die Ratten eine Hypertrophie des rechten Herzens.

Da wie bereits unter **Abschnitt 4** erwähnt, Paxillin-*knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind, und auch Inhibitoren für *in vivo* Studien nicht erhältlich sind, konnte der Einfluss von Paxillin auf die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie im Rahmen dieser Arbeit nicht im lebenden Tier untersucht werden. Aus diesem Grunde wurden neben den Regulationsdaten, die an Tiermodellen der pulmonalen Hypertonie und an humanem Material von Patienten mit pulmonaler Hypertonie erhoben wurden, funktionelle Untersuchungen an humanen, isolierten vaskulären Zellen vorgenommen. Hier lag der Fokus auf dem Einfluss von Paxillin auf die Funktion der PASMC in der pulmonalen Hypertonie. PASMC wurden als Zelltyp gewählt, da Paxillin hier mit Hilfe von immunohistochemischen Färbungen lokalisiert werden konnte (siehe unter anderem **Abbildung 8** und **Abbildung 11**). Ein solches Vorgehen entspricht dabei die übliche Methode, wenn entsprechende Tiermodelle für *in vivo* Untersuchungen nicht vorliegen (Rabinovitch, 1991).

Bei der Wahl der verwendeten Methoden wurde immer auch die Aussagekraft dieser Methode berücksichtigt. Bei der *Yeast two-Hybrid* Analyse handelt es sich beispielsweise um eine Technik, bei der man als Ergebnis auch falsch positive Interaktionspartner erhalten kann. Es wurde also in diesem Fall, um sicher zu gehen, das Ergebnis noch durch Co-Immunopräzipitations-Versuche abgesichert. Untermuert wurde dieses Resultat schließlich noch mittels Immunofluoreszenz-Färbungen. Umgekehrt kann man anhand der Ko-Lokalisationen zweier Proteine, detektiert mit Hilfe von Immunofluoreszenz-Färbungen, nicht darauf schließen, dass sie miteinander interagieren. Man kann lediglich eine Aussage über die Lokalisation der Proteine im Gewebe oder der Zelle treffen. Auch die Ergebnisse einer Promotor-Analyse geben lediglich Aufschluss über potenzielle Bindestellen von Transkriptionsfaktoren. Die Funktionalität der Bindestellen muss durch weitere Versuche, z.B. wie die hier in der Arbeit durchgeführten *Electrophoretic Mobility Shift* Assay (EMSA) Versuche, bestätigt werden.

Sonst wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Eignung der entsprechenden Untersuchungsmodelle/Protokolle kritisch hinterfragt und falls nötig und möglich noch über komplementäre, bzw. alternative Methoden abgesichert.

4.2 Fazit

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit Paxillin als neuer, kritischer Regulator der pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen identifiziert werden.

Paxillin zeigte eine erhöhte Expression in Lungen von IPAH-Patienten und in der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie der Maus. Des Weiteren konnte ein funktioneller Einfluss von Paxillin auf die Zelladhäsion, Proliferation und Apoptose, möglicherweise über die Akt und Erk1/2 Signaltransduktionswege nachgewiesen werden (**Abbildung 33**). Beides deutet auf eine wichtige Rolle von Paxillin im vaskulären Gefäßumbauprozess, der die pulmonale Hypertonie charakterisiert, hin. Unterstützt wurde dieses durch die Tatsache, dass Paxillin in dieser Arbeit als neuer Interaktionspartner von Fhl-1 identifiziert werden konnte. Letzteres wurde in einer früheren Studie als ein neues Schlüsselprotein in der pulmonalen Hypertonie charakterisiert. Insgesamt belegen diese Ergebnisse den kritischen Einfluss zytoskeletaler Proteine an der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie, indem Paxillin mit dem FAK und Talin *signalling* verbunden ist. Die potenzierte Expression dieser Proteine (Paxillin, Fhl-1) in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie könnte maßgeblich an der PASMC-Hyperplasie beteiligt sein und so möglicherweise einen Einfluss auf die Entstehung der pulmonalen Hypertonie haben.

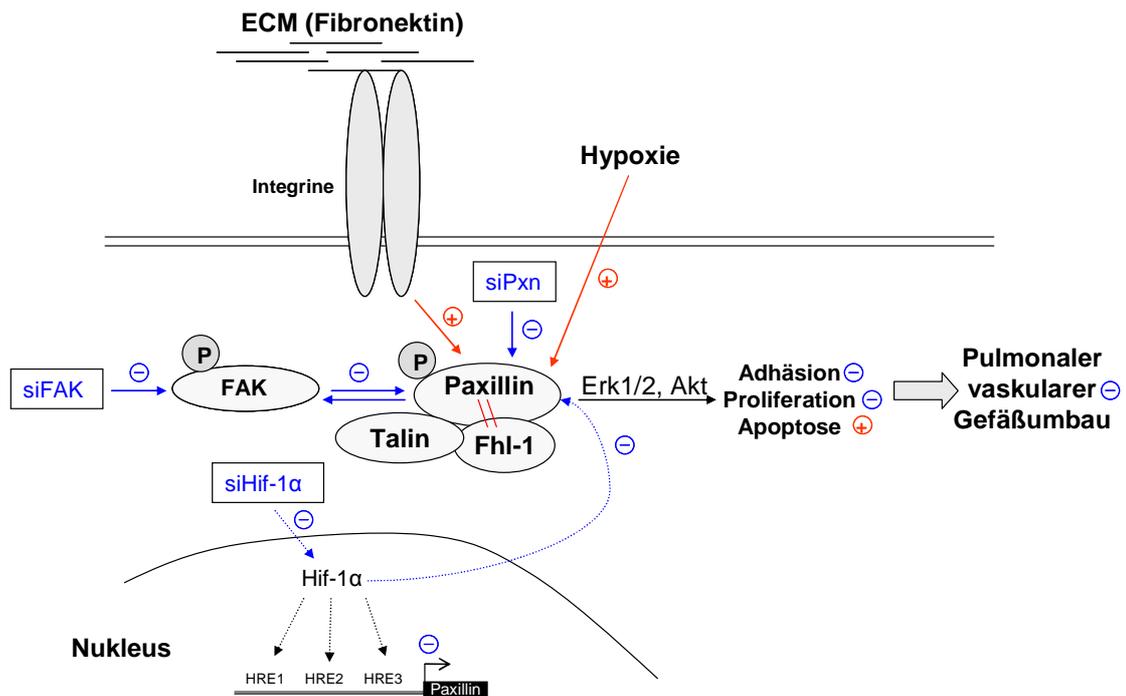


Abbildung 33: Modell des Paxillin *signallings* in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen – Einfluss auf den pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess.

Das vorliegende Modell wurde aus den Daten der eigenen Arbeit entwickelt. Es zeigt, dass das zytoskeletale Protein Paxillin in Folge der Adhäsion von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) an das extrazelluläre Matrixprotein Fibronektin phosphoryliert wird (kurzer roter Pfeil und Plus). Diese Phosphorylierung begünstigt die Interaktion von Paxillin und Fhl-1 (parallele rote Striche). Paxillin und sein Interaktionspartner, die *focal adhesion kinase* (FAK), regulieren sich in ihrer Phosphorylierung bidirektional. Der *knockdown* der Paxillin-Expression (siPxn; kurzer blauer Pfeil und Minus) induziert eine verminderte FAK-Phosphorylierung und umgekehrt (blauer Pfeil in beide Richtungen und Minus). Die Expression von Paxillin wird durch Hypoxie induziert (langer roter Pfeil und Plus), und HIF-1 α abhängig reguliert (gestrichelte blauer Pfeile und Minus), wobei alle drei *hypoxia response elements* (HRE) im Paxillin-Promotor funktionell sind. Veränderungen in der Paxillin-Expression stehen im Zusammenhang mit dysregulierten zellulären Prozessen (Adhäsion, Proliferation und Apoptose), welche möglicherweise über die Akt und Erk 1/2 Signalkaskaden reguliert werden und Mitauslöser für den Umbauprozess sind der pulmonalen Gefäße sind.

4.3 Ausblick

Obwohl jüngst effektive Therapien zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie entwickelt worden sind, gibt es bisher keine Therapie, die die Erkrankung heilen kann (O'Callaghan et al, 2010). Einzig die Behandlung mit Substanzen, die den PDGF-Signalweg unterdrücken, konnten bisher im Tiermodell Aussicht auf eine Behandlung zeigen (Dahal et al, 2011; Schermuly et al, 2005). Die Grundlagenforschung ist daher enorm wichtig, um die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie weiter aufzuschlüsseln.

Mit Paxillin konnte in dieser Arbeit ein neues Protein identifiziert werden, welches einen Einfluss auf die Physiologie der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie zeigt. Um zu bestätigen, dass Paxillin auch *in vivo* den Krankheitsverlauf beeinflusst, wäre es zum Einen wünschenswert, Studien mit Paxillin-Inhibitoren durchzuführen. Man könnte Mäusen im Rahmen dieser Studien Inhibitoren gegen Paxillin verabreichen und dann die pulmonale Hypertonie mittels Hypoxie-Haltung der Mäuse induzieren. Sollten sich bei den mit Inhibitor-behandelten Mäusen in den sich anschließenden physiologischen Untersuchungen Unterschiede zur Kontrollgruppe ergeben, z.B. ein verminderter rechtsventrikulärer Druck (RVP), so könnte man daraus gegebenenfalls schließen, dass die hier in dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten mit Bezug auf die Paxillin Funktion auch *in vivo* für die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie relevant sind. Als physiologische Untersuchungen kämen neben der Messung des RVP auch die Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie und der Grad des Gefäßumbauprozesses in Frage.

Analoge Studien könnten zum Anderen mit Gewebs- bzw. Zeit-spezifischen Paxillin *knockout* Mäusen durchgeführt werden. Man würde in diesem Fall Mäuse generieren, in denen Paxillin in den PASMC, bzw. in bestimmten Entwicklungsabschnitten (oder auch vor der Haltung unter hypoxischen Bedingungen) nicht exprimiert ist. Sollten sich auch hier eine verringerte oder ein Fehlen der pulmonalen Hypertonie zeigen, würde dies die hier im Wesentlichen *in vitro* erhobenen Daten bestätigen. Paxillin könnte dann als Ziel dienen, um neue Therapieansätze zu entwickeln.

In beiden Fällen muss man aber bedenken, dass Paxillin ein sehr wichtiges Protein für die normale Physiologie der Zellen ist. Nebeneffekte einer Paxillin-Suppression sind daher nicht auszuschließen.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie ist eine schwerwiegende Erkrankung, die durch einen pulmonalen Gefäßumbauprozess charakterisiert ist. Charakteristika des Umbauprozesses sind eine erhöhte Migration und Proliferation von pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC), eine vermehrte Deposition von Proteinen der extrazellulären Matrix, sowie eine Dysregulation von zytoskeletalen Proteinen. Die Rolle von zytoskeletalen Proteinen an der pulmonalen Hypertonie ist bisher nur unzureichend verstanden und untersucht worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach neuen Interaktionspartnern des zytoskeletalen Adapter-Proteins Fhl-1 gesucht, welches erst kürzlich als mögliches, neues Schlüsselprotein für die Entwicklung der pulmonalen Hypertonie identifiziert werden konnte. Schließlich galt es, die Beteiligung des neuen Fhl-1 Interaktionspartners am vaskulären Gefäßumbauprozess und die ihm zugrunde liegenden funktionellen Prozesse zu untersuchen.

Mittels *Yeast two-Hybrid* Untersuchungen konnte in Kooperation mit Dualsystems Biotech AG (Schweiz) Paxillin als neues Fhl-1 bindendes Kandidaten-Protein identifiziert werden. Die native Protein-Protein Bindung konnte durch Ko-Immunopräzipitations-Versuche in PASMC der Maus und des Menschen bestätigt werden. Beide Proteine zeigten zudem eine Ko-Lokalisation in PASMC, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. In Lungenproben von Patienten mit idiopathischer pulmonalarterieller Hypertonie (IPAH) konnte eine erhöhte Expression von Paxillin detektiert werden, sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene. In lasermikrodissezierten intrapulmonalen Arterien der Maus trat zudem eine vermehrte Paxillin-Expression in der Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie auf. In PASMC isoliert aus dem Monocrotalin-Modell der pulmonalen Hypertonie ergab sich die Tendenz einer gesteigerten Paxillin-Expression. Auf Zellebene wurde der Einfluss von Paxillin auf die Zell-Physiologie deutlich. Das Paxillin *silencing* inhibierte Adhäsions- und Proliferations-Vorgänge und erhöhte das Apoptose-Verhalten von humanen PASMC; reguliert werden diese Prozesse möglicherweise über die Kinasen Akt und Erk1/2. Neben der erhöhten Paxillin-Expression in IPAH konnte in den Lungen diesen Patienten auch eine gesteigerte Expression des extrazellulären Matrixproteins Fibronectin nachgewiesen werden. Fibronectin begünstigte das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC, welches wiederum in Folge des Paxillin *silencings* inhibiert wurde. Neben dem Einfluss auf das Adhäsions-Verhalten von PASMC induzierte Fibronectin eine

erhöhte Paxillin Tyrosin 118 Phosphorylierung. Schließlich konnte die Hypoxie als neuer Stimulus für die Paxillin-Expression in humanen PASMC identifiziert werden. Die Inkubation der Zellen unter hypoxischen Bedingungen (1 % O₂) bewirkte eine Zunahme sowohl der Paxillin-Expression als auch der Paxillin Tyrosin 31 und 118 Phosphorylierung. HIF-1 α *silencing* Experimente verdeutlichten, dass die Hypoxie-abhängige Expression von Paxillin durch HIF reguliert wird.

Zusammenfassend konnte Paxillin als neuer Fhl-1 Interaktionspartner identifiziert werden. Neben Fhl-1 kann auch Paxillin eine funktionelle Rolle in der Physiologie/Pathophysiologie der PASMC zugeordnet werden. Paxillin kann demnach als ein möglicher, neu identifizierter „Auslöser“ für pulmonalvaskuläre Gefäßumbauprozesse angesehen werden.

6 Summary

Pulmonary hypertension is a fatal disease characterised by increased pulmonary vascular remodelling processes such as increased migration and proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC), enhanced matrix deposition and deregulation of cytoskeletal proteins. However, the contribution of cytoskeletal proteins in pulmonary hypertension is still not fully understood and investigated. Therefore, a screening for new interacting partners of the cytoskeletal adaptor protein Fhl-1, which was recently identified as a possible key molecule for pulmonary hypertension development was performed, and their possible contribution to the vascular remodelling processes was assayed.

Using a yeast two-hybrid analysis in cooperation with Dualsystems Biotech AG (Switzerland) identified paxillin as a novel candidate for an interaction partner of Fhl-1. Native protein-protein binding was confirmed by co-immunoprecipitation studies in mouse and human PASMC. Both proteins co-localised in PASMC *in vitro* and *in vivo*. In lung samples from idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) patients paxillin expression was increased on mRNA and protein levels. Laser-microdissection of murine intrapulmonary arteries revealed elevated paxillin expression in hypoxia-induced pulmonary hypertension. PASMC isolated from the monocrotaline model of pulmonary hypertension revealed a tendency towards a not significant increase in paxillin expression. On single cell level silencing of paxillin expression led to decreased PASMC adhesion, proliferation, and increased apoptosis. Regulation of these processes occurred via Akt and Erk1/2 kinases. Next to the enhanced paxillin expression in IPAH elevated expression of the extracellular matrix protein fibronectin was observed in lungs of these patients. Fibronectin promoted adhesion of human PASMC, which was shown to be critically dependent on paxillin expression. Next to its role in cell adhesion fibronectin stimulated paxillin tyrosine 118 phosphorylation. Finally, hypoxia was identified as an additional stimulus of paxillin expression. Exposure of human PASMC under hypoxic conditions (1% O₂) caused a pronounced increase in paxillin expression as well as tyrosine 31 and 118 phosphorylation. HIF-1 α silencing experiments revealed that the hypoxia-induced increase in paxillin expression was HIF-dependent.

Taken together, paxillin was identified as a novel Fhl-1 binding partner and demonstrated a functional role of paxillin in PASMC physiology/pathophysiology which might be a novel trigger for pulmonary vascular remodelling processes.

7 Literaturverzeichnis

Archer SL, Weir EK, Wilkins MR (2010) Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* 121(18): 2045-2066

Bach I (2000) The LIM domain: regulation by association. *Mech Dev* 91(1-2): 5-17

Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, Hoepfer MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ, Torbicki A (2009) Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): S55-66

Barman SA, Zhu S, White RE (2009) RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag* 5: 663-671

Bellis SL, Miller JT, Turner CE (1995) Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 270(29): 17437-17441

Boudreau NJ, Jones PL (1999) Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339 (Pt 3): 481-488

Bristow MR, Zisman LS, Lowes BD, Abraham WT, Badesch DB, Groves BM, Voelkel NF, Lynch DM, Quaife RA (1998) The pressure-overloaded right ventricle in pulmonary hypertension. *Chest* 114(1 Suppl): 101S-106S

Brown MC, Turner CE (2004) Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84(4): 1315-1339

Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM (2004) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109(2): 159-165

Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996) Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12: 463-518

Chambell NA (2000) Biologie. *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*: 920

Chay KO, Park SS, Mushinski JF (2002) Linkage of caspase-mediated degradation of paxillin to apoptosis in Ba/F3 murine pro-B lymphocytes. *J Biol Chem* 277(17): 14521-14529

Chen PW, Kroog GS (2010) Leupaxin is similar to paxillin in focal adhesion targeting and tyrosine phosphorylation but has distinct roles in cell adhesion and spreading. *Cell Adh Migr* 4(4)

Chin KM, Rubin LJ (2008) Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 51(16): 1527-1538

Chu PH, Ruiz-Lozano P, Zhou Q, Cai C, Chen J (2000) Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech Dev* 95(1-2): 259-265

Colognato H, Ramachandrappa S, Olsen IM, ffrench-Constant C (2004) Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *J Cell Biol* 167(2): 365-375

Dahal BK, Heuchel R, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT (2011) Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor-beta. *Pulm Circ* 1(2): 259-268

Davies RJ, Morrell NW (2008) Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor. *Chest* 134(6): 1271-1277

Dawid IB, Breen JJ, Toyama R (1998) LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 14(4): 156-162

Deakin NO, Turner CE (2008) Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121(Pt 15): 2435-2444

Defilippi P, Olivo C, Venturino M, Dolce L, Silengo L, Tarone G (1999) Actin cytoskeleton organization in response to integrin-mediated adhesion. *Microsc Res Tech* 47(1): 67-78

Dong JM, Lau LS, Ng YW, Lim L, Manser E (2009) Paxillin nuclear-cytoplasmic localization is regulated by phosphorylation of the LD4 motif: evidence that nuclear paxillin promotes cell proliferation. *Biochem J* 418(1): 173-184

Durmowicz AG, Parks WC, Hyde DM, Mecham RP, Stenmark KR (1994) Persistence, re-expression, and induction of pulmonary arterial fibronectin, tropoelastin, and type I procollagen mRNA expression in neonatal hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 145(6): 1411-1420

Feuerstein R, Wang X, Song D, Cooke NE, Liebhaber SA (1994) The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22): 10655-10659

Gaine SP, Rubin LJ (1998) Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 352(9129): 719-725

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 (2009) 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) (2009). *Eur Heart J* 30(20): 2493-2537

Gehr P, Bachofen M, Weibel ER (1978) The normal human lung: ultrastructure and morphometric estimation of diffusion capacity. *Respir Physiol* 32(2): 121-140

Ghofrani HA, Osterloh IH, Grimminger F (2006) Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5(8): 689-702

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328(24): 1732-1739

Gietz RD, Woods RA (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* 30(4): 816-820, 822-816, 828 passim

Guan JL (1997) Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol* 16(4): 195-200

Guller MC, Andre J, Legrand A, Setterblad N, Mauviel A, Verrecchia F, Daniel F, Bernuau D (2009) c-Fos accelerates hepatocyte conversion to a fibroblastoid phenotype through ERK-mediated upregulation of paxillin-Serine178 phosphorylation. *Mol Carcinog* 48(6): 532-544

Gunst SJ, Tang DD, Opazo Saez A (2003) Cytoskeletal remodeling of the airway smooth muscle cell: a mechanism for adaptation to mechanical forces in the lung. *Respir Physiol Neurobiol* 137(2-3): 151-168

Hagel M, George EL, Kim A, Tamimi R, Opitz SL, Turner CE, Imamoto A, Thomas SM (2002) The adaptor protein paxillin is essential for normal development in the mouse and is a critical transducer of fibronectin signaling. *Mol Cell Biol* 22(3): 901-915

Hessel MH, Steendijk P, den Adel B, Schutte CI, van der Laarse A (2006) Characterization of right ventricular function after monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the intact rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(5): H2424-2430

Hirakawa M, Oike M, Karashima Y, Ito Y (2004) Sequential activation of RhoA and FAK/paxillin leads to ATP release and actin reorganization in human endothelium. *J Physiol* 558(Pt 2): 479-488

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S): 13S-24S

Hwang DM, Dempsey AA, Wang RX, Rezvani M, Barrans JD, Dai KS, Wang HY, Ma H, Cukerman E, Liu YQ, Gu JR, Zhang JH, Tsui SK, Waye MM, Fung KP, Lee CY, Liew CC (1997) A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation* 96(12): 4146-4203

Hynes RO (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6): 673-687

Isenberg BC, Tranquillo RT (2003) Long-term cyclic distention enhances the mechanical properties of collagen-based media-equivalents. *Ann Biomed Eng* 31(8): 937-949

Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N, Nakano T (2006) Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J* 70(2): 174-178

Jeffery TK, Morrell NW (2002) Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 45(3): 173-202

Jeffery TK, Wanstall JC (2001) Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 92(1): 1-20

Kasai M, Guerrero-Santoro J, Friedman R, Leman ES, Getzenberg RH, DeFranco DB (2003) The Group 3 LIM domain protein paxillin potentiates androgen receptor transactivation in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 63(16): 4927-4935

Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA (2004) Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem* 279(13): 12001-12004

Keshet Y, Seger R (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661: 3-38

Khurana T, Khurana B, Noegel AA (2002) LIM proteins: association with the actin cytoskeleton. *Protoplasma* 219(1-2): 1-12

Kim SH, Chegal W, Doh J, Cho HM, Moon DW (2011) Study of cell-matrix adhesion dynamics using surface plasmon resonance imaging ellipsometry. *Biophys J* 100(7): 1819-1828

Klinke R, Silbernagel S (1996) Lehrbuch der Physiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*: 241

Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(11): 827-837

Kolonin MG, Zhong J, Finley RL (2000) Interaction mating methods in two-hybrid systems. *Methods Enzymol* 328: 26-46

Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H (2009) Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur Respir J* 34(4): 888-894

Kwapiszewska G, Wilhelm J, Wolff S, Laumanns I, Koenig IR, Ziegler A, Seeger W, Bohle RM, Weissmann N, Fink L (2005) Expression profiling of laser-

microdissected intrapulmonary arteries in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 6: 109

Kwapiszewska G, Wygrecka M, Marsh LM, Schmitt S, Trosser R, Wilhelm J, Helmus K, Eul B, Zakrzewicz A, Ghofrani HA, Schermuly RT, Bohle RM, Grimminger F, Seeger W, Eickelberg O, Fink L, Weissmann N (2008) Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension. *Circulation* 118(11): 1183-1194

Laumanns IP, Fink L, Wilhelm J, Wolff JC, Mitnacht-Kraus R, Graef-Hoechst S, Stein MM, Bohle RM, Klepetko W, Hoda MA, Schermuly RT, Grimminger F, Seeger W, Voswinckel R (2009) The noncanonical WNT pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(6): 683-691

Lee SM, Tsui SK, Chan KK, Kotaka M, Li HY, Chim SS, Waye MM, Fung KP, Lee CY (1998) Chromosomal mapping of a skeletal muscle specific LIM-only protein FHL3 to the distal end of the short arm of human chromosome 1. *Somat Cell Mol Genet* 24(3): 197-202

Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL (2004) Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circ Res* 95(6): 579-586

Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX (2004) Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 68(2): 75-103

McGrath MJ, Cottle DL, Nguyen MA, Dyson JM, Coghill ID, Robinson PA, Holdsworth M, Cowling BS, Hardeman EC, Mitchell CA, Brown S (2006) Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem* 281(11): 7666-7683

McGrath MJ, Mitchell CA, Coghill ID, Robinson PA, Brown S (2003) Skeletal muscle LIM protein 1 (SLIM1/FHL1) induces alpha 5 beta 1-integrin-dependent myocyte elongation. *Am J Physiol Cell Physiol* 285(6): C1513-1526

Mebratu Y, Tesfaigzi Y (2009) How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle* 8(8): 1168-1175

Morgan MJ, Madgwick AJ (1999) The fourth member of the FHL family of LIM proteins is expressed exclusively in the testis. *Biochem Biophys Res Commun* 255(2): 251-255

O'Callaghan DS, Savale L, Jais X, Natali D, Montani D, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O (2010) Evidence for the use of combination targeted therapeutic approaches for the management of pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 104 Suppl 1: S74-80

Parsons JT, Horwitz AR, Schwartz MA (2010) Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(9): 633-643

Penzlin H (2005) Lehrbuch der Tierphysiologie. *Elsevier Spektrum Akademischer Verlag München*: 251

Petit V, Boyer B, Lentz D, Turner CE, Thiery JP, Valles AM (2000) Phosphorylation of tyrosine residues 31 and 118 on paxillin regulates cell migration through an association with CRK in NBT-II cells. *J Cell Biol* 148(5): 957-970

Rabinovitch M (1991) Investigational approaches to pulmonary hypertension. *Toxicol Pathol* 19(4 Pt 1): 458-469

Rabinovitch M (1996) Cell-extracellular matrix interactions in the ductus arteriosus and perinatal pulmonary circulation. *Semin Perinatol* 20(6): 531-541

Rabinovitch M (2001) Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clin Chest Med* 22(3): 433-449, viii

Rabinovitch M (2008) Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 118(7): 2372-2379

Robinson PA, Brown S, McGrath MJ, Coghill ID, Gurung R, Mitchell CA (2003) Skeletal muscle LIM protein 1 regulates integrin-mediated myoblast adhesion, spreading, and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 284(3): C681-695

Robledo R, Mossman B (1999) Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *J Cell Physiol* 180(2): 158-166

Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, Parajuli N, Quanz K, Schubert D, Dony E, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sausbier U, Rutschmann K, Wilhelm S, Seeger W, Ruth P, Grimminger F, Sausbier M, Weissmann N (2009) Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels: lung vascular effects of hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 180(4): 353-364

Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Lee JD, Wood K, Cool CD, Voelkel NF (2005) Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J* 19(9): 1178-1180

Salgia R, Brunkhorst B, Pisick E, Li JL, Lo SH, Chen LB, Griffin JD (1995) Increased tyrosine phosphorylation of focal adhesion proteins in myeloid cell lines expressing p210BCR/ABL. *Oncogene* 11(6): 1149-1155

Schaller MD (2001) Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene* 20(44): 6459-6472

Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F (2005) Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 115(10): 2811-2821

Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 8(8): 443-455

Schessler J, Zou Y, McGrath MJ, Cowling BS, Maiti B, Chin SS, Sewry C, Battini R, Hu Y, Cottle DL, Rosenblatt M, Spruce L, Ganguly A, Kirschner J, Judkins AR, Golden JA, Goebel HH, Muntoni F, Flanigan KM, Mitchell CA, Bonnemann CG

(2008) Proteomic identification of FHL1 as the protein mutated in human reducing body myopathy. *J Clin Invest* 118(3): 904-912

Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372(6508): 786-791

Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ (1999) Signaling through focal adhesion kinase. *Prog Biophys Mol Biol* 71(3-4): 435-478

Schwartz MA (2010) Integrins and extracellular matrix in mechanotransduction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(12): a005066

Sheikh F, Raskin A, Chu PH, Lange S, Domenighetti AA, Zheng M, Liang X, Zhang T, Yajima T, Gu Y, Dalton ND, Mahata SK, Dorn GW, 2nd, Heller-Brown J, Peterson KL, Omens JH, McCulloch AD, Chen J (2008) An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J Clin Invest* 118(12): 3870-3880

Sheppard D (2003) Functions of pulmonary epithelial integrins: from development to disease. *Physiol Rev* 83(3): 673-686

Shibanuma M, Kim-Kaneyama JR, Ishino K, Sakamoto N, Hishiki T, Yamaguchi K, Mori K, Mashimo J, Nose K (2003) Hic-5 communicates between focal adhesions and the nucleus through oxidant-sensitive nuclear export signal. *Mol Biol Cell* 14(3): 1158-1171

Shimoda LA, Semenza GL (2011) HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *Am J Respir Crit Care Med* 183(2): 152-156

Siesser PM, Hanks SK (2006) The signaling and biological implications of FAK overexpression in cancer. *Clin Cancer Res* 12(11 Pt 1): 3233-3237

Silbernagel S, Despopoulos A (2003) Taschenatlas der Physiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*: 106

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 (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl): S43-54

Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 99(7): 675-691

Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF (2009) Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6): L1013-1032

Sundberg-Smith LJ, DiMichele LA, Sayers RL, Mack CP, Taylor JM (2008) The LIM protein leupaxin is enriched in smooth muscle and functions as an serum response factor cofactor to induce smooth muscle cell gene transcription. *Circ Res* 102(12): 1502-1511

Tanaka T, Moriwaki K, Murata S, Miyasaka M (2009) LIM domain-containing adaptor, leupaxin, localizes in focal adhesion and suppresses the integrin-induced tyrosine phosphorylation of paxillin. *Cancer Sci* 101(2): 363-368

Tanaka Y, Schuster DP, Davis EC, Patterson GA, Botney MD (1996) The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest* 98(2): 434-442

Tozzi CA, Christiansen DL, Poiani GJ, Riley DJ (1994) Excess collagen in hypertensive pulmonary arteries decreases vascular distensibility. *Am J Respir Crit Care Med* 149(5): 1317-1326

Tuder RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I, Flores S (2007a) Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 28(1): 23-42, vii

Tuder RM, Yun JH, Bhunia A, Fijalkowska I (2007b) Hypoxia and chronic lung disease. *J Mol Med (Berl)* 85(12): 1317-1324

Tumbarello DA, Brown MC, Turner CE (2002) The paxillin LD motifs. *FEBS Lett* 513(1): 114-118

Turner CE (1998) Paxillin. *Int J Biochem Cell Biol* 30(9): 955-959

Turner CE (2000a) Paxillin and focal adhesion signalling. *Nat Cell Biol* 2(12): E231-236

Turner CE (2000b) Paxillin interactions. *J Cell Sci* 113 Pt 23: 4139-4140

Voelkel NF, Cool C (2004) Pathology of pulmonary hypertension. *Cardiol Clin* 22(343-351)

Von Euler U, Liljestrand G (1946) Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* 12: 301-320

Vuori K (1998) Integrin signaling: tyrosine phosphorylation events in focal adhesions. *J Membr Biol* 165(3): 191-199

Wang Y, Gilmore TD (2003) Zyxin and paxillin proteins: focal adhesion plaque LIM domain proteins go nuclear. *Biochim Biophys Acta* 1593(2-3): 115-120

Wary KK, Kohler EE, Chatterjee I (2011) Focal adhesion kinase regulation of neovascularization. *Microvasc Res* 83((1)): 64-70

Weissmann N, Gerigk B, Kocer O, Nollen M, Hackemack S, Ghofrani HA, Schermuly RT, Butrous G, Schulz A, Roth M, Seeger W, Grimminger F (2007) Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide. *Respir Med* 101(10): 2125-2132

Weissmann N, Grimminger F, Seeger W (2006) Hypoxia in lung vascular biology and disease. *Cardiovasc Res* 71(4): 618-619

Weissmann N, Manz D, Buchspies D, Keller S, Mehling T, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Gassmann M, Grimminger F (2005) Congenital erythropoietin over-expression causes "anti-pulmonary hypertensive" structural and functional changes in mice, both in normoxia and hypoxia. *Thromb Haemost* 94(3): 630-638

West JB (2003) Thoughts on the pulmonary blood-gas barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(3): L501-513

Woods AJ, Kantidakis T, Sabe H, Critchley DR, Norman JC (2005) Interaction of paxillin with poly(A)-binding protein 1 and its role in focal adhesion turnover and cell migration. *Mol Cell Biol* 25(9): 3763-3773

Woods AJ, Roberts MS, Choudhary J, Barry ST, Mazaki Y, Sabe H, Morley SJ, Critchley DR, Norman JC (2002) Paxillin associates with poly(A)-binding protein 1 at the dense endoplasmic reticulum and the leading edge of migrating cells. *J Biol Chem* 277(8): 6428-6437

Zouq NK, Keeble JA, Lindsay J, Valentijn AJ, Zhang L, Mills D, Turner CE, Streuli CH, Gilmore AP (2009) FAK engages multiple pathways to maintain survival of fibroblasts and epithelia: differential roles for paxillin and p130Cas. *J Cell Sci* 122(Pt 3): 357-367

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gasaustausch in den Lungenalveolen	2
Abbildung 2: Modell der Hypoxie-induzierten Vasokonstriktion – der Von Euler-Liljestrand-Mechanismus.....	3
Abbildung 3: Modell der endothelialen Dysfunktion in der pulmonalen Hypertonie und dem pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess.	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Integrin-vermittelten Signaltransduktion in Folge der Zell-Adhäsion.....	17
Abbildung 5: Identifikation von Paxillin als neuer Fhl-1-Interaktionspartner.....	46
Abbildung 6: Ko-Immunopräzipitation von Fhl-1 mit Paxillin.	47
Abbildung 7: Paxillin ko-lokalisiert mit Fhl-1 im Zytoplasma von PASMC.	48
Abbildung 8: Ko-Lokalisation von Paxillin und Fhl-1 in den pulmonalen Gefäßwänden.	49
Abbildung 9: Die Fhl-1-Expression ist von der Paxillin Expression abhängig.....	50
Abbildung 10: Erhöhte Paxillin-Expression in Lungen von IPAH-Patienten.....	51
Abbildung 11: Lokalisation von Paxillin in humanem Lungengewebe.	52
Abbildung 12: Regulation der Paxillin-Expression in Lungenhomogenaten von Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie.....	53
Abbildung 13: Lokalisation und Regulation der Paxillin-Expression in den pulmonalen Gefäßen von Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie. ...	54
Abbildung 14: Systemische Regulation der Paxillin-Expression in Mäusen mit Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie.	55
Abbildung 15: Paxillin-Expression in PASMC isoliert aus Monocrotalin (MCT)-behandelten Ratten.	56
Abbildung 16: Erhöhte Fibronektin-Expression in Patienten mit IPAH.....	58
Abbildung 17: Fibronektin-abhängige Paxillin-Phosphorylierung.	60
Abbildung 18: Einfluss von Fibronektin auf das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC und die intrazelluläre Lokalisation von Paxillin.....	61
Abbildung 19: Einfluss von Paxillin auf das Adhäsions-Verhalten von humanen PASMC.	63
Abbildung 20: Lokalisation von Paxillin und der <i>focal adhesion kinase</i> (FAK) in humanen PASMC.	64
Abbildung 21: Die Phosphorylierung von Paxillin ist abhängig vom	

Expressions-Niveau der <i>focal adhesion kinase</i> (FAK).....	65
Abbildung 22: Die Phosphorylierung der <i>focal adhesion kinase</i> (FAK) ist abhängig vom Paxillin-Expressions-Niveau.....	66
Abbildung 23: Einfluss des Paxillin <i>knockdowns</i> auf das Proliferations- und Apoptose-Verhalten von humanen PASMC.....	68
Abbildung 24: Einfluss des Paxillin <i>knockdowns</i> auf intrazelluläre Signaltransduktionswege.	69
Abbildung 25: Hypoxie-abhängige Regulation der Paxillin-Expression in humanen PASMC.	70
Abbildung 26: HIF-1 α -abhängige Regulation der Paxillin-Expression in PASMC.	71
Abbildung 27: Hypoxie-induzierte Aktivierung der Paxillin-Expression in humanen PASMC.	72
Abbildung 29: Hypoxie-induzierte Paxillin Phosphorylierung in humanen PASMC...	73
Abbildung 30: Einfluss von Hypoxie auf die Lokalisation von Paxillin Y31 und Y118 in humanen PASMC.....	75
Abbildung 31: Schematische Darstellung des Paxillin-Proteins.	77
Abbildung 32: Modell vom Einfluss der Paxillin-Expression auf das Adhäsions-, Proliferations- und Apoptose-Verhalten von humanen PASMC und die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie.	79
Abbildung 33: Modell des Paxillin <i>signallings</i> in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen – Einfluss auf den pulmonalvaskulären Gefäßumbauprozess.....	87

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie, nach Dana Point, 2008. (Modifiziert nach Simonneau et al, 2009).....	6
Tabelle 2: Sequenzen der für die <i>Real-Time</i> PCR verwendeten Primer.....	34
Tabelle 3: Sequenzen der für die Transfektion verwendeten siRNAs.....	35
Tabelle 4: Sequenzen der für den <i>Electrophoretic Mobility Shift</i> Assay verwendeten Sonden.	38
Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen.	42
Tabelle 7: Für die Western Blot Analyse und den <i>Electrophoretic Mobility Shift</i> Assay verwendete Gele.....	43
Tabelle 8: Paxillin-Promotor-Region mit einer Länge von 1500 bp.	113

10 Anhang

10.1 Abkürzungen

3D	dreidimensional
α -sma	<i>alpha smooth muscle actin</i> – alpha glattmuskuläres Aktin
Abb.	Abbildung
Akt	Serin/Threonin Protein-Kinase Akt
ALK1	<i>activin receptorlike kinase 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	<i>antisense</i> – Anti-Sinn
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β 2-Mikroglobulin
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> - basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BMPR2	<i>bone morphogenetic protein receptor, type 2</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
ca.	circa
cDNA	<i>complementary DNA</i> – komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
CO	Kohlenstoffmonoxid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Co-IP	Ko-Immunopräzipitation
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> – chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CTEPH	chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
C-Terminal	Carboxyl-Terminus eines Peptids
d	<i>day</i> – Tag

DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>dt</i>	<i>deoxy-thymidine</i> Überhang
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> – epidermaler Wachstumsfaktor
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> - elektrophoretischer Mobilität Gel-Shift Assay
Ex/Em	Extinktion/Emission
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated</i> Kinasen 1 und 2
et al.	<i>et alteri</i> - und andere
evtl.	eventuell
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> - fetales Kälberserum
Fhl-1	<i>four and a half LIM domain protein</i>
FiO ₂	inspiratorische O ₂ Fraktion
FP	<i>forward</i> Primer - Vorwärtsprimer
g	Gramm, Erdbeschleunigung, Gravitationskonstante
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunde
H	Hypoxie
HCl	Salzsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> – Hepatozyten- Wachstumsfaktor
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i> - Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> - humanes Immundefizienz-Virus
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRE	<i>hypoxia response element</i>
IgG	Immunglobulin G
ICH-P	Immunohistochemie auf Paraffin-Schnitten
IF	Immunofluoreszenz
IL 1 / IL6	Interleukin 1 bzw. 6
IPAH	idiopathische pulmonalerterielle Hypertonie

k	Kilo (10^3)
K ⁺	Kalium
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3
μ	Mikro (10^{-6})
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
m	Milli (10^{-3})
m ²	Quadratmeter
M	Molar (Mol pro Liter)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MCT	Monocrotalin
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	<i>mean pulmonary arterial pressure</i> – mittlerer pulmonalarterieller Druck
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	Nummer der Experimente
N	Normoxie
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	<i>di</i> Natriumhydrogenphosphat
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
N-Terminal	Amino-Terminus eines Peptids
O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAH	pulmonalarterielle Hypertonie

PASMC	<i>Pulmonary arterial smooth muscle cells</i> – pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
PBGD	Porphobilinogen Deaminase
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i> – Blutplättchen Wachstumsfaktor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Konzentration
PH	pulmonale Hypertonie
pmol	Pikomol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVR	<i>pulmonary vascular resistance</i> – pulmonalvaskulärer Widerstand
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i> - Radio-Immunopräzipitations-Assay Puffer
ROCK	Rho-Kinase
ROS	<i>reactive oxygen species</i> – reaktive Sauerstoffspezies
RP	<i>reverse</i> Primer - Rückwärtsprimer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> – Umdrehungen pro Minute
RVP	<i>right ventricular pressure</i> – rechtsventrikulärer Druck
S	<i>sense</i> - Sinn
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	<i>small-interfering</i> RNA – kleine interferierende RNA
SEM	<i>standard error of the mean</i> – Standardfehler des Mittelwerts
SMA	<i>smooth muscle actin</i> – glattmuskuläres Aktin
SMC	<i>smooth muscle cells</i> – glatte Muskelzellen
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS-T	<i>Tris Buffer Saline</i> mit 0,1% Tween20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGFβ	<i>transforming growth factor beta</i> - ransformierender Wachstumsfaktor beta

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> - vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor</i> Rezeptor 2 - vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
v/v	Volumen pro Volumen
Watt	Watt
WB	Western Blot
w/v	Gewicht pro Volumen

10.2 Sequenzen

Die für die Promotor-Analyse (**Abschnitt 2.2.13**) verwendete Promotor-Sequenz des Paxillin-Gens ist in **Tabelle 8** angegeben.

Tabelle 8: Paxillin-Promotor-Region mit einer Länge von 1500 bp.

```
CCAGGAGGCAGGAGATCACCTGAGATCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGCCA
ACATGGTGAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGCATGG
TGGTATGCGCCTGTAATCCAGCAGGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCTGG
GAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATTGCACCACTGCACTCCAACCTGGG
CGACAGATTGGGACTCCATCTCAAACAAAAACAAAAACACAAAACTAAA
ACAAAATAGAGGTATGTGCAAGATGCTGGAAAACCACGCAATAGAGTGTTT
GAGGAACAGTCTTTGGTCTTGAATTTATTATAGGAGAATGTGGCAGCCACA
GAAGCTGCTTGGATCTGCCTTTATAAAATGACTGAACATGGTGGGAGCATT
GGAACCCGGATACTTCTGCCCAAGGAGACTTCTCATTTTTTTTTGTCTGGAA
TTCCCTGATGGGTTGACCTGTTTGTGAGATCTGAGTCTCCTTGCCCAACCCTG
CTTATTTCCCCTTCTCTGTCACGGGCATTACCCCTAGCTTTATCTCAGCATCT
CATCTGCTTTCTGGAGGACCTGATCTGACCCAGAAGGCCTGGATTCTTGAGG
GACAAGGGGAACCTCGAAGCTGTACTTGCAGAGCAGTTTTTATATAAAATCCA
CAAACCTGCCATCACCCATCCCAACGGGTAGGGAAGTACCTCTAGGAGGATT
AATTTAGAGAATAGCTATATAGTGTCTGTCTATTCAGACACTCAATAAATGG
TAGTTGTTATTATTACCCAATTTCCGAGTGTGTGGGAGCACTGGGTGTGACT
TTCCTGTAGTTTTCCCTTTAATGTCTAATCTGGGGACCCCTCTGCCCCATGCA
GTTTTGGAAAAGTGTCTAGGGAGGGTGGCTGTGTGGAAGTAATATTAAGAG
AGATGGAACCACACAGGTATTGGGTTTGGGCCAGAAAGGGTGAACCTGCGAG
CTGCACTGCCATTGATCCAGAGGACGACCCAGGAAAGGTCAGCCACGGGC
TCCGGGCCTTGCTGGTACTGATTTATGGTCCTCCTGGGTGGTGACCTACAG
GTGACAGACGGACAGGTGGGCAAACTGACTGTCCAGTGGACAGGCATGTG
ATGACCCAGTGGCTGACGAATGCACAGACACATGGCTGACTGTGGACGGAT
TTGTCATCCGCAGGGTCAGGCAAGTGACTTTGAGAGGGACAGAAAGATGGA
TGGGAGTGGCTGGAGGCCTGGGAGCCGCCACCTGCCCCGCTTAGCCGCGAG
GGGGCGCCACCGCCCCGCCAGCGACGCCACTGCCCCGGGCTCTTGGCGGG
GGCGGGACCAGCGTGCGCAGGGGGCGGGGCCAGCAAGCTCGCGGGGGTGT
CCGGGGGCGGGGCGCGCGTGCACAGGGGGCGGCCGGGGGCGGGGCGCGCG
```

GCGGGCGCGGGCGCGGGCGCGCGGGCGGGCGGGCGCGTTCGTTCCGGGCCG
AGGCTCGCGGCGG**ATG**GACGACCTCGACGCCCT

Die *hypoxia response elements* (HREs) sind in grau unterlegt. Die Transkriptionsstartstelle (ATG) ist fett und hellgrau markiert

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

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

12 Veröffentlichungen und Beiträge

12.1 Eigene Veröffentlichungen

- Bogdan R, **Veith C**, Clauss W, Fronius M. *Impact of mechanical stress on ion transport in native lung epithelium (Xenopus laevis): short-term activation of Na⁺, Cl⁻ and K⁺ channels.* Pflugers Arch. 2008 Sep;456(6):1109-20.

12.2 Beiträge

12.2.1 Vorträge

- **Veith C**, Wygrecka M, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *The Fhl-1 interacting protein Paxillin is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension.*
American Thoracic Society (ATS), Annual Congress, Mai 2011, Denver, USA.
- **Veith C**, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *Das fokale Adhäsionsprotein Paxillin involviert in die Pathogenese der pulmonalen Hypertonie?*
Herbst-Tagung der Sektion Zellbiologie, November 2009, Borstel.

12.2.2 Poster/Posterdiskussion

- **Veith C**, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *Involvement of cytoskeletal protein Paxillin in the pathogenesis of pulmonary hypertension.*
European Thoracic Society (ERS), Annual Congress, September 2011, Amsterdam, Posterdiskussion.

-
- **Veith C**, Wygrecka M, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *The Fhl-1 interacting protein Paxillin is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension.*
Excellenzcluster Cardio-Pulmonales System (ECCPS) Minisymposium, Juni 2011, Bad Nauheim, Poster.
 - **Veith C**, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *The focal adhesion protein paxillin involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension?*
Excellenzcluster Cardio-Pulmonales System (ECCPS) Minisymposium, Mai 2010, Bad Nauheim, Poster.
 - **Veith C**, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *The focal adhesion protein paxillin involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension?*
Keystone Symposia Hypoxia: Molecular Mechanisms of Oxygen Sensing and Response Pathways, Januar 2010, Keystone, Colorado, USA, Poster.
 - **Veith C**, Schermuly RT, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *The cytoskeletal protein paxillin - a focal adhesion protein involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension?*
Excellenzcluster Cardio-Pulmonales System (ECCPS) Minisymposium, Juli 2009, Bad Nauheim, Poster.
 - **Veith C**, Seeger W, Weissmann N, Kwapiszewska G. *The cytoskeletal protein – paxillin is associated with pulmonary vascular remodelling.*
Jahrestagung der Deutschen Physiologische Gesellschaft (DPG), März 2009, Gießen, Poster.

13 Versicherung

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

Gießen, den 23. Januar 2012

Christine Veith

14 Danksagung

Mein Dank gilt ganz besonders denen, die mich auf meinem Weg zur Dissertation unterstützt haben und allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

- Mein persönlicher Dank geht an Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weissmann, der mir durch die Finanzierung und die Themenstellung die Anfertigung dieser Arbeit ermöglichte.
- Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Clauss danke ich besonders für die Betreuung im Fachbereich Biologie.
- Weiterhin möchte ich den beiden Prüfern Herrn Prof. Dr. rer. nat. Alfred Pingoud und Prof. Dr. rer. nat. Ralph T. Schermuly ganz herzlich danken.
- Ein ganz GROSSER DANK gilt ferner meiner Betreuerin Dr. Grażyna Kwapiszewska für ihre fachkompetente, aber auch kameradschaftliche Unterstützung im Laboralltag und für die wertvollen Anregungen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre! Auch an diverse gemeinsame Unternehmungen (unser Wanderwochenende in Lenggries, Klettern und so manche Spinning-Stunde) außerhalb des Laboralltags denke ich sehr gerne zurück. Ich hoffe der Kontakt nach Graz bleibt auch weiterhin bestehen!
- Małgorzata Wygrecka und Zoltan Balint und danke ich für ihre Hilfe bei den Ko-Immunopräzipitations-Versuchen und der Konfokalmikroskopie; Dualsystems Biotech AG danke ich für die Durchführung der *Yeast two-Hybrid* Analyse.
- Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Werner Seeger und Dr. Rory E. Morty für die Aufnahme in das Graduiertenprogramm „*Molecular Biology and Medicine of the Lung*“ (MBML) bedanken.
- Der Justus-Liebig Universität Gießen danke ich für die zweijährige finanzielle Unterstützung in Form eines Graduiertenstipendiums

-
- Meinen Zimmerkollegen Friederike Weisel, Florian Veit und Katrin Milger danke ich für ein wirklich tolles Arbeitsklima, die belebenden Diskussionen zu fachlichen aber vor allem auch nicht-fachlichen Themen.
 - Den Kolleginnen und Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe danke ich ebenfalls für eine Atmosphäre, die mich immer gerne zur Arbeit kommen ließ. Allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts danke ich für diverse Hilfestellungen in technischen und administrativen Dingen.
 - Mein herzlichster Dank gilt ferner meiner Familie; zum Einen meinen Eltern, von denen ich so viel gelernt habe und die mich immerwährend unterstützt haben und mir dadurch meinen Lebensweg ermöglicht haben; zum Anderen möchte ich Jens Berger ein riesengroßes „Dankeschön“ für seine Unterstützung, seine endlose Geduld und das Korrekturlesen dieser Arbeit aussprechen.