Untersuchung der Veränderungen des Lungenproteoms mittels *pulsed*-SILAC Markierung bei experimenteller Pulmonaler Hypertonie mit Tyrosinkinase-Inhibitor Therapie

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

> > vorgelegt von Svenja Lena Tiede aus Hannover

> > > Gießen 2014

Aus dem Exzellenz-Cluster Kardiopulmonales System Direktor: Prof. Dr. W. Seeger des Fachbereichs Medizin

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Theo Schermuly

2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Silke Meiners

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission: Prof. Dr. med. Katja Becker Prof. Dr. Martin Diener

> Tag der Disputation: 05.11.2014

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Svenja Lena Tiede Gießen, den 04.06.2014 Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim und am Exzellenzcluster Kardiopulmonales System des Lungenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen (UGMLC, *University of Giessen and Marburg Lung Center*) von Oktober 2009 bis Mai 2014 angefertigt. Das Thema und das Labor wurden von Prof. Dr. rer. nat. Ralph T. Schermuly bereitgestellt, unter dessen Betreuung diese Arbeit entstand. "In den Wissenschaften ist viel Gewisses, sobald man sich von den Ausnahmen nicht irre machen lässt und die Probleme zu ehren weiß."

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ······ 1
1.1. Einführung in das respiratorische System1
1.2. Aufbau der Gefäßwände 3
1.3. Definition und klinische Einteilung der Pulmonalen Hypertonie3
1.3. Pathophysiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie
1.3.1. Histologische Veränderungen ······7
1.3.2. Molekulare Mechanismen des vaskulären Gefäßumbaus9
1.3.3. Rechtsherzhypertrophie ······ 13
1.4. Therapie der Pulmonalen Hypertonie
1.4.1. Zugelassene Therapien ······ 15
1.4.2. Neue Therapieansätze ······ 17
1.5. Tiermodelle der Pulmonalen Hypertonie······ 18
1.5.1. Hypoxie-induzierte PH······ 18
1.5.2. Monocrotalin-induzierte PH ······ 19
1.6. Proteomik ······ 20
1.6.1. Massenspektrometrie 20
1.6.2. Metabolische Markierung mit stabilen Isotopen
1.7. Zielsetzung der Arbeit ······ 26
2. Material und Methoden ······ 28
2.1. Materialien ······ 28
2.1.1. Verbrauchsmaterialien 28
2.1.2. Chemikalien
2.1.3. Molekularbiologische Kits 30
2.1.4. Enzyme
2.1.5. Futter
2.1.6. Operationsbesteck ······ 31
2.1.7. Verwendete Geräte ······ 31

	2.1.8. Versuchstiere ······	32
	2.2. Methoden ·····	33
	2.2.1. Haltung der Tiere ······	33
	2.2.2. Monocrotalin-Behandlung ······	34
	2.2.3. Imatinib-Therapie ······	35
	2.2.4. Invasive hämodynamische Messung	36
	2.2.5. Messung der Rechtsherzhypertrophie	37
	2.2.6. Statistische Auswertung ·····	37
	2.3. Proteinbiochemische Methoden	37
	2.3.1. Aufbereitung von Proteinextrakten - Gewebehomogenisierung und Zell	yse 37
	2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels DC Protein Assay	38
	2.3.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
	2.3.4. Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	39
	2.3.5. Enzymatische Spaltung von Proteinen im Gel·····	39
	2.4. Massenspektrometrie ······	41
	2.4.1. Datenverarbeitung ······	42
	2.5. Molekularbiologische Methoden ······	43
	2.5.1. Western Blots ······	43
	Statistische Auswertung	45
	2.5.2. Immunhistochemie ······	45
3.	Ergebnisse ·····	48
	3.1. Gewichtszunahme der Tiere während des Versuchs	48
	3.2. MCT-Behandlung zur Ausbildung einer PH und Therapie mit Imatinib	49
	3.3. Massenspektrometrische Analyse der Lungenhomogenate	51
	3.3.1 ¹³ C ₆ -Lysin Inkorporation in das Lungenproteom der drei Gruppen	52
	3.4. Analyse der GO-Term Anreicherung	53
	3.4.1. Anreicherungen in der Placebo-Gruppe	54
	Zelluläre Komponenten	54

	Biologische Prozesse ······	56
	Molekulare Funktion	58
	3.4.2. Anreicherungen in der Imatinib-Gruppe	60
	3.5. Veränderte Inkorporationen des ¹³ C ₆ -Lysin ·····	64
	3.5.1. Placebo-Gruppe	65
	3.5.2. Imatinib-Gruppe ······	67
	3.5.3. Auswahl der weiter zu untersuchenden Proteine	68
	3.6. Nachweis der fünf Proteine mit Antikörper-basierten Methoden	70
	3.6.1. Dysferlin ·····	70
	3.6.2. Emilin-1	72
	3.6.3. HIP1 ·····	- 74
	3.6.4. Septin-7	- 76
	3.6.5. Villin	78
4.	Diskussion	80
	4.1. Auswahl des Tiermodells	80
	4.2. Pulsed-SILAC Markierung	83
	4.3. GO-Term Annotationen	84
	4.4. Auswahl der Kandidatenproteine	87
	4.4.1. Dysferlin ·····	88
	4.4.2. Emilin-1	90
	4.4.3. HIP1 ·····	92
	4.4.4. Septin-7	94
	4.4.5. Villin ·····	95
	4.5. Vergleich mit anderen Lungenproteom-Analysen	98
	4.6. Fazit und Ausblick	99
5.	Zusammenfassung ·····	101
6.	Summary	103
7.	Anhang	105
8.	Literatur	114

9. Abbildungsverzeichnis ·····	125
10. Tabellenverzeichnis ······	
11. Danksagung	
12. Lebenslauf ······	

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
hð	Mikrogramm
μl	Mikroliter
¹² C ₆ -Lysin	Lysin-0
¹³ C ₆ -Lysin	Lysin-6
5-HT	5-Hydroxytryptamin / Serotonin
$\Delta_{m/z}$	m/z-Differenz
Α	
AEC	Alveolare Epithelzelle
ALK1	Aktivin Rezeptor-like Kinase Typ 1
ANOVA	One-way analysis of variance
AP2	Adaptor protein 2
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
В	
BCA	Bicinchoninsäure
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor 2
BNP	Brain natriuretic peptide
BP	Biologische Prozesse (biological processes)
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
С	
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat (<i>cyclic adenosine monophosphate)</i>
CAV1	Caveolin-1
CC	Zelluläre Komponenten (cellular components)

cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (cyclic guanosine monophosphate)
CID	Kollisionsinduzierte Dissoziation (collision-induced dissociation)
CLIC4	Chloride intracellular channel protein 4
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive lung disease)
CTEPH	chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
Cu ²⁺	Kupfer
D	
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
Dysferlin	Dystrophy-associated fer-1-like protein
E	
EGFR	Epidermal-growth-factor receptor
EKG	Elektrokardiogramm
Emilin-1	Elastin microfibril interface-located protein 1
ENG	Endoglin
ERA	Endothelin-Rezeptor-Antagonist
ESI	Elektrospray Ionisierung
ET-1	Endothelin-1
ET _A / ET _B	Endothelin-Rezeptoren A/B
F	
FDR	False Discovery Rate
FGF	Fibroblast growth factor
G	
g	Gramm
GO	Gene Ontology
GOrilla	Gene Ontology enRIchement anaLysis and visualization
н	
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor (hypoxia-inducible factor)
HIP-1	Huntingtin-interacting protein 1

HPV	Hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
I	
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
IPAH	Idiopathische pulmonalarterielle Hypertonie
к	
K+	Kalium
KCNK3	Potassium channel super family k member-3
L	
LC	Flüssigchromatographie (liquid chromatography)
LGMD2B	Limb-girdle muscular dystrophy type 2B
LTQ	Lineare Ionenfalle (linear trap quadrupole)
LV+S	Linker Ventrikel mit Septum
м	
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix-assisted Laser-Desorption Ionization
MCT	Monocrotalin
MF	Molekulare Funktion (molecular function)
mg	Milligramm
min	Minute(n)
miRNA	Micro ribonucleic acid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (hydrargyrum)
MMPs	Matrixmetalloproteinasen (matrix metalloproteinases)
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie

Ν	
n	Stichprobenumfang
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
Ρ	
p.o.	Peroral, per os
PAH	Pulmonalarterielle Hypertonie
PAP	Pulmonalarterieller Druck (pulmonary arterial pressure)
PAWP	Pulmonalarterieller Verschlussdruck (pulmonary artery wedge pressure)
РСН	pulmonalkapillare Hämangiomatose (<i>pulmonary capillary hemangiomatosis</i>)
PDE	Phosphodiesterase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
PGI ₂	Prostaglandin I ₂
PH	Pulmonale Hypertonie
РІЗК	Phosphoinositid-3-Kinasen
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental growth factor
PVH	Pulmonalvenöse Hypertonie
PVOD	Pulmonale venookklusive Erkrankung (<i>pulmonary veno-occlusive disease</i>)
p-Wert	Signifikanzwert (p-value, probability value)
R	
RAP	Rechtsatrialer Druck (right atrial pressure)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase (reverse phase)

rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RTKs	Rezeptor-Tyrosinkinasen
RV	Rechter Ventrikel
RVEDP	Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (right ventricular enddiastolic pressure)
RVSP	Rechtsventrikulärer systolischer Druck
S	
S.C.	Subkutan
SAP	Systemischer arterieller Blutdruck
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS polyacrylamide gel electrophoresis)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (standard error of mean)
sGC	Lösliche Guanylatzylkase (solube guanylat cyclase)
SILAC	Stable isotope labeling of amino acids in cell culture
siRNA	Small interfering ribonucleic acid
SMAD9	Mothers against decapentaplegic 9
SNPs	Small-nucleotide polymorphisms
Std.	Stunde(n)
т	
TFA	Trifluoressigsäure
TGF-β	Transformierender Wachstumsfaktor (transforming growth factor)- β
TIMPs	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
TOF	Flugzeitanalysator (time of flight)
v	
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
w	
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

1.1. Einführung in das respiratorische System

Das respiratorische System dient dem Gasaustausch; der für den Zellstoffwechsel benötigte Sauerstoff (O₂) wird aus der Umgebungsluft aufgenommen und das Stoffwechsel-Endprodukt Kohlendioxid (CO₂) wird abgegeben. In der Lunge, genauer den Alveolen, findet der Gasaustausch statt. Das Blut transportiert O₂ aus der Lunge zu den Geweben und CO₂ von den Geweben zurück zur Lunge. Der Teil des Blutkreislaufs zwischen dem linken Ventrikel und dem rechten Atrium des Herzens führt durch viele Organe und wird als Körperkreislauf bezeichnet. Der Bereich vom rechten Ventrikel bis zum linken Atrium wird hingegen als Lungenkreislauf bezeichnet [1].

Der Aufbau des Respirationstrakts des Menschen ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Lunge (*Pulmo*) besteht aus einem rechten (*Pulmo dexter*) und einem linken Lungenflügel (*Pulmo sinister*). Die beiden Lungenflügel unterscheiden sich in der Anzahl der Lungenlappen und –segmente. Die rechte Lunge ist aus drei Lappen aufgebaut und untergliedert sich in zehn Segmente. Die linke Lunge ist in zwei Lappen aufgeteilt und gliedert sich weiter in acht bis zehn Segmente.



Abbildung 1: Aufbau des Respirationstrakts den Menschen [1].

Die Luft gelangt über die Luftröhre (*Trachea*) in den Bronchialbaum. Von der *Trachea* bis zu den Alveolen verästelt sich das Bronchialsystem nach dem Prinzip der dichotomen Teilung 23-mal. Von der Trachea, über die Hauptbronchien (*Bronchi principales*), die Lappen- und Segmentbronchien (*Bronchi lobares und Bronchi segmentales*), bis zu den Terminalbronchien (*Bronchioli terminales*) nach der 14. Aufzweigung findet kein Gasaustausch statt. Nach der 15. Aufzweigung treten Alveolen auf und die Verzweigungen führen über die respiratorischen Bronchien (*Bronchioli respiratorii*) in die Alveolargänge (*Ductus alveolares*) und Alveolarsäckchen (*Saccus alveolaris*) der Alveolen [2, 3].

Der Bronchialbaum wird von Aufzweigungen der Pulmonalarterie begleitet, während die Venen in den bindegewebigen Septen verlaufen. Die Alveolen bilden den Hauptanteil des Lungenparenchyms und besitzen eine besonders an den Gasaustausch angepasste dünne Zellwand aus Typ-I und Typ-II Epithelzellen. Die Typ-I-Pneumozyten sind für den Gasaustausch zuständig. die Typ-II-Pneumozyten sezernieren Surfactant, das die Oberflächenspannung herabsetzt und ein kollabieren der Alveolen verhindert. Abbildung 2 zeigt den Aufbau eines Interalveolarseptums, die Pfeile deuten den Gasaustausch an. Die gezeigte Blut-Luft-Schranke an der der Gasaustausch stattfindet ist im Mittel 2,2 µm dick [4].



Abbildung 2: Aufbau eines Interalveolarseptums. Die Basallaminae (rot) von Kapillarendothel und Alveolarepithel können zu einer gemeinsamen Basallamina verschmelzen. Die roten Pfeile zeigen den Gasaustausch [4].

1.2. Aufbau der Gefäßwände

Arterien, Kapillaren und Venen werden von einer inneren Schicht, dem Endothel ausgekleidet. Bei den Kapillaren besteht diese nur aus einer einlagigen Zellschicht. Größere Gefäße bestehen aus drei Schichten, der inneren Endothelschicht mit Bindegewebsfasern (*Tunica intima*) die bei der Blutgerinnung und bei Adhäsionsvorgängen eine Rolle spielt, der muskulären Mittelschicht (*Tunica media*) und der fibrinösen Mantelschicht (*Tunica externa/adventitia*), dargestellt in Abbildung 3.



Abbildung 3: Aufbau der Gefäßwände von Arterien und Venen [1].

Arterien weisen eine dickere, aus glatten Muskelzellen und Kollagenfasern bestehende *Tunica media* auf als Venen. Die glatten Muskelzellen können kontrahieren und darüber die Verengung des Gefäßlumens regulieren.

Bei größeren Gefäßen tritt das Vasa vasorum auf, das als Kapillarnetz in die *Tunica adventitia* und *media* eindringt und das Gefäß mit Nährstoffen versorgt [1].

1.3. Definition und klinische Einteilung der Pulmonalen Hypertonie

Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine progressiv verlaufende Erkrankung, von der weltweit etwa 100 Millionen Menschen betroffen sind [5]. Charakteristisch für PH ist der erhöhte pulmonalarterielle Druck (*pulmonary arterial pressure*, PAP), der

mittels Rechtsherzkatheter in der Pulmonalarterie gemessen wird. Laut Definition liegt bei einem PAP \geq 25 mmHg in Ruhe eine manifeste PH vor, Werte < 21 mmHg gelten als normal [6]. Die Patienten zeigen unspezifische Symptome wie Dyspnoe unter Belastung, Müdigkeit oder Abgeschlagenheit, Thoraxschmerzen, Synkopen und periphere Ödeme [7].

Es gibt verschiedene Ursachen der PH, die aktuelle Klassifikation vom PH Welt-Symposium 2013 in Nizza richtet sich nach den Ursachen der PH und ist in Tabelle 1 auf Seite 6 zusammengefasst [5].

Die erste Gruppe umfasst die pulmonalarterielle Hypertonie (PAH), die durch pathologische Veränderungen der kleinen Pulmonalarterien gekennzeichnet ist [8]. Bei der idiopathischen PAH (IPAH) können keine auslösenden Faktoren identifiziert werden. Bei der erblichen Form der PAH werden bekannte Mutationen (Bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2), Aktivin Rezeptor-like Kinase Typ 1 (ALK1), Endoglin (ENG), mothers against decapentaplegic 9 (SMAD9), Caveolin-1 (CAV1), potassium channel super family k member-3 (KCNK3)) und familiäre Formen ohne bekannte Mutation unterschieden [9]. In etwa 75% der Familien, in denen mehrere Personen an PH erkrankt sind liegt eine Mutation des BMPR2 vor [10]. BMPR2 gehört zur Familie der transforming growth factor (TGF)β Superfamilie. Etwa 5% der Patienten mit hereditärer PAH haben Mutationen in anderen Genen der TGF-β Familie, wie dem Alk1 [11], ENG [12] und Smad 9 [13]. Kürzlich neu identifiziert wurden Mutationen des CAV1, das ein Membranprotein der Caveloae in Endothelzellen kodiert [14], und KCNK3, das den potassium channel super family k member-3 kodiert [15]. Des Weiteren gibt es die Medikamenten- und Toxininduzierte PAH, die beispielsweise durch Appetitzügler ausgelöst werden kann [16, 17]. Außerdem kann eine PAH mit anderen Erkrankungen wie Kollagenosen [18, 19], einer HIV-Infektion [20], angeborenen Herzfehlern [21], portaler Hypertonie [22] und Schistosomiasis assoziiert sein. Die Infektion mit dem Parasiten Schistosoma masnoni ist weltweit die häufigste Ursache der PAH [23].

Die pulmonale venookklusive Erkrankung (*pulmonary veno-occlusive disease*, PVOD) und pulmonalkapillare Hämangiomatose (*pulmonary capillary hemangiomatosis*, PCH) werden aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur PAH (histologische

4

Veränderungen der kleinen Pulmonalarterien, klinische Symptome und Risikofaktoren) als Untergruppe 1' klassifiziert [24]. Die persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen wurde 2013 als Untergruppe 1'' klassifiziert [5].

Die zweite Gruppe umfasst die PH aufgrund von Linksherzerkrankungen, wie systolischer und diastolischer Dysfunktion, sowie Aorten- oder Mitral-Vitien. Diese Gruppe wird auch als postkapilläre PH oder pulmonalvenöse Hypertonie (PVH) bezeichnet. Diagnostisch lässt sich diese Gruppe von den anderen durch den erhöhten pulmonalarteriellen Verschlussdruck (*pulmonary artery wedge pressure*, PAWP) von > 15 mmHg unterscheiden [25]. Kongenitale oder erworbene Linksherz Einfluss-/Ausflusstraktobstruktionen und angeborene Kardiomyopathien wurden 2013 neu zur zweiten Gruppe hinzugefügt [5]. Die Linksherzerkrankungen stellen die häufigste Ursache der PH dar [26].

In der dritten Gruppe wird die PH aufgrund von Lungenerkrankungen wie Lungenfibrose [27] und chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (*chronic obstructive lung disease*, COPD) [28] zusammengefasst. Aber auch ein dauerhafter Aufenthalt in großer Höhe und das Schlafapnoe-Syndrom können die Ursache sein.

Die vierte Gruppe umfasst die chronisch thromboembolische PH (CTEPH), bei der die Pulmonalarterien nach einer pulmonalen Embolie mit einem Thrombus verschlossen bleiben, weil dieser nicht vollständig aufgelöst wurde. Es findet ein fibrotischer Umbau des Thrombus statt, in dem das thrombotische Material bis an die Media des Gefäßes vordringt und dabei die normale Intima ersetzt [29]. Aber auch in distalen Pulmonalarterien in denen keine Embolie stattgefunden hat sind PAH-ähnliche Veränderungen zu finden [5]. Der im Verlauf entstehende PAP-Anstieg kann durch operatives Entfernen des Thrombus rückgängig gemacht werden, allerdings hängt der Erfolg der Operation von der Lokalisation des Thrombus ab [30].

In der fünften Gruppe sind verschiedene Formen der PH enthalten bei denen die Ätiologie unbekannt oder multifaktoriell bedingt ist. Die erste Untergruppe beinhaltet hämatologische Erkrankungen wie chronische myeloproliferative Erkrankungen [31]. Aber auch eine Splenektomie nach einem Unfall oder aufgrund

5

einer hämatologischen Behandlung kann zu einer PH führen [32]. Systemische Erkrankungen, die eine PH auslösen können, sind beispielsweise Sarkoidose [33] und pulmonale Langerhanszell Histiozytose [34]. Metabolische Erkrankungen, bei denen eine PH beschrieben ist, sind die Glykogenspeicherkrankheit (Typ 1a, Glukose-6-Phsophatase Mangel, [35]) und Morbus Gaucher [36], aber auch Schilddrüsenerkrankungen [37]. Die letzte Untergruppe enthält verschiedene Erkrankungen wie beispielsweise tumorale Obstruktion und mediastinale Fibrose [5].

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (verändert nach [5]).

Г

Klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Nizza 2013)
1. Pulmonalarterielle Hypertonie (PAH) 1.1. Idiopathische PAH (IPAH) 1.2. Hereditäre PAH
1.2.1. BMPR2 1.2.2. ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3 1.2.3. Unbekannte Genese
1.3. Medikamenten- und Toxininduziert1.4. Assoziiert mit1.4.1. Kollagenosen
1.4.2. HIV-Infektion 1.4.3. Portaler Hypertonie 1.4.4. Angeborenem Herzfehler
1.4.5. Schistosomiasis 1.' Pulmonale venookklusive Erkrankung (PVOD) und/oder pulmonalkapilläre
Hamangiomatose (PCH) 1". Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)
2. Pulmonale Hypertonie aufgrund von Linksherzerkrankungen 2.1. Systolische Dysfunktion 2.2. Diastolische Dysfunktion
 2.3. Herzklappenerkrankungen 2.4. Kongenitale/erworbene Linksherz Einflu ß-Ausflu ß-Trakt Obstruktion und angeborene Kardiomyopathien
 3. Pulmonale Hypertonie aufgrund von Lungenkrankheiten und/oder Hypoxie 3.1. Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) 3.2. Interstitielle Lungenerkrankung
 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischtem restriktiven und obstruktiven Erscheinungsbild 3.4. Schlafapnoe-Syndrom
3.5. Alveoläre Hypoventilation3.6. Chronischer Aufenthalt in großer Höhe3.7. Bronchopulmonale Dysplasie
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)

5. PH bei unklarer multifaktorieller Ursache

- 5.1. Hämatologische Erkrankungen: Chronisch hämolytische Anämie, Myeloproliferative Erkrankungen, Splenektomie
- 5.2. Systemische Erkrankungen: Sarkoidose, pulmonale Langerhanszell Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose
- 5.3. Metabolische Erkrankungen: Glykogenspeichererkrankung, Morbus Gaucher, Schilddrüsenerkrankungen
- 5.4. Andere: Tumorale Obstruktion, fibrosierende Mediastinitis, chronischer Nierenausfall mit Dialyse, Segmentale PH

Nach einer Studie des *National Institute of Health* (NIH) von 1991 liegt die mittlere Lebenserwartung von unbehandelten IPAH-Patienten bei 2,8 Jahren nach Diagnosestellung [38]. Neuere Register-Analysen ergeben 1-, 3- und 5-Jahres Überlebensraten für PAH-Patienten von ca. 86, 70 und 56 % [39-41]. Allerdings unterscheidet sich die Lebenserwartung innerhalb und zwischen den Gruppen der PH. In der ersten Gruppe ist die Lebenserwartung für PAH-Patienten mit Kollagenosen geringer als für IPAH-Patienten oder Patienten mit angeborenen Herzfehlern [42].

Multivariate Analysen zu Prädiktoren des Überlebens ergeben recht einheitliche Ergebnisse in den verschiedenen Register-Analysen. Neben demographischen Faktoren wie Geschlecht, Alter und Ätiologie sind vor allem Anstiege in Laborparametern wie Kreatinin und *brain natriuretic peptide* (BNP), und hämodynamischen Parametern, sowie die Verschlechterung der funktionellen Kapazität (Verringerung der 6-Minuten-Gehstrecke, höhere *New York Heart Association/World Health Organisation* (NYHA/WHO) funktionelle Klasse mit einem geringerem Überleben assoziiert [43].

1.3. Pathophysiologie der pulmonalarteriellen Hypertonie

1.3.1. Histologische Veränderungen

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH), die der Gruppe 1 der in Tabelle 1 auf Seite 6 dargestellten klinischen Gruppen der PH entspricht. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, gibt es auch innerhalb dieser Gruppe sehr unterschiedliche Ursachen der PAH. Charakteristisch für alle sind aber Auftreten Untergruppen der PAH das einer anhaltenden pulmonalarteriellen Vasokonstriktion und die Umbauprozesse in den Pulmonalarterien [44]. Die Gefäßumbauprozesse werden auch als Remodeling bezeichnet und sind in Abbildung 4 auf Seite 9 dargestellt [45].

Das pulmonalvaskuläre Remodeling betrifft alle drei Gefäß-Schichten; die Endothelzellen der Tunica intima, die glatten Muskelzellen der Tunica media und die Fibroblasten der Tunica adventitia. Außerdem kommt es zu einer erhöhten Einlagerung von Extrazellulärmatrix-Proteinen wie Kollagen, Elastin und Fibronektin [46]. Histologisch kommt es zur Muskularisierung vorher nichtmuskularisierter peripherer Arterien. Es wird vermutet, dass die neu auftretenden Zellen aus Perizyten hervorgehen die zu glatten Muskelzellen differenzieren und proliferieren [47]. Die Herkunft dieser Zellen ist aber umstritten, es gibt auch Belege das sie aus Stammzellen [48], Fibrozyten [49] oder Endothelzellen [50] hervorgehen. Ein typisches Merkmal der PAH ist die Mediahypertrophie, die sowohl in großen Pulmonalarterien als auch in kleinen distalen Pulmonalarterien auftritt [51]. Des Weiteren sind die Ausbildung einer Neointima und neu entstehende Endothelzell-Kanäle zu beobachten [52]. Hierbei führen die Proliferation der Endothel- und glatten Muskelzellen zu einer Okklusion des vaskulären Lumens, wodurch die für die PAH typischen plexiformen Läsionen entstehen [53].



Abbildung 4: Vaskuläre Veränderungen bei PAH. Muskularisierung distaler und medialer prekapillärer Arterien, Verlust prekapillärer Arterien, Verdickung der großen Pulmonalarterien, Neotintima Entstehung die zur okklusion von Gefäßen mit plexiformen Läsionen führt (verändert nach [45]).

1.3.2. Molekulare Mechanismen des vaskulären Gefäßumbaus

Die vaskuläre Obstruktion wird durch vasokonstriktive Mediatoren und das bereits erwähnte *Remodeling* angetrieben [54]. Diese Mechanismen sind in Abbildung 5 auf Seite 10 zusammenfassend dargestellt.

Fehlregulation des Gefäßtonus

Durch eine verringerte Synthese oder den erhöhten Abbau ist die Verfügbarkeit von vasodilatatorischen Mediatoren wie Prostaglandin I₂ (PGI₂) [55], Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) und zyklischem Guanosinmonophosphat (*cyclic guanosine monophosphat*, cGMP) [56] bei PAH verringert.

Zusätzlich ist die Synthese vasokonstriktiver Mediatoren wie Thromboxan [55], Endothelin-1 [57] und 5-Hydroxytryptamin (5-HT) [58] erhöht, was insgesamt eine Vasokonstriktion der Pulmonalgefäße zur Folge hat.

Des Weiteren sind Veränderungen der K⁺- und Ca²⁺-Kanäle an der Erhöhung des Gefäßtonus beteiligt [59]. Eine verringerte Expression der K⁺-Kanäle und der dadurch erhöhte Ca²⁺-Einstrom in die Zellen führen zur Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [60].



Abbildung 5: Molekulare Mechanismen des vaskulären Gefäßumbaus. Schematische Darstellung der vaskulären Veränderungen bei PAH und bekannte Mediatoren. (AEC = Alveolare Epithelzelle, PGI₂ = Prostaglandin, NO = Stickstoffmonoxid, sGC = lösliche Guanylatzylkase, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, PDE = Phosphodiesterase, K⁺ = Kalium, Ca²⁺ = Calcium, TGF- β = transformierender Wachstumsfaktor s, BMP = Bone Morphogenetic Protein, PDGF = Platelet-derived growth factor, FGF = Fibroblast growth factor, HIF = Hypoxie-induzierbarer Faktor, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, NADPH = Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat,) Verändert nach [54].

Abnormale Proliferation

Die erhöhte Proliferation pulmonalarterieller glatter Muskelzellen wird außerdem von Wachstumsfaktoren ausgelöst. Signalmoleküle der TGF-β-Superfamilie, inklusive der BMP-Familie, regulieren die Proliferation, Migration und Zelldifferenzierung. Die BMPR2-Mutation ist die häufigste unter den hereditären PAH-Formen, aber auch Alk1- und ENG-Mutationen treten auf [61].

Auch Wachstumsfaktoren der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Familie spielen bei der PAH eine Rolle. Es gibt vier verschiedene PDGF-Liganden (PDGF-A bis-D) die als Homo- oder Heterodimere (nur PDGF-AB) an die Rezeptoren PDGFR- α und – β binden. Die PDGF-Rezeptoren sind transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinasen die nach Bindung der Liganden dimerisieren, und durch Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste Signalwege aktivieren, die die Genexpression und den Zellzyklus beeinflussen [62, 63]. Es werden beispielsweise Ras/MAPK, Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) und Phospholipase C (PLC) Signalwege aktiviert, die Zellwachstum, Migration und Differenzierung auslösen [64].

PDGF stimuliert die Proliferation der pulmonalarteriellen glatten Gefäßmuskelzellen [65], und eine erhöhte Expression von PDGF [66] und PDGF-Rezeptoren [67] sind im Lungengewebe von PAH Patienten beschrieben. Im Tiermodell konnte bereits die Wirksamkeit des in der vorliegenden Arbeit verwendeten PDGF-Rezeptorantagonisten (Imatinib) gezeigt werden [68].

Ebenfalls zur PDGF-Familie gehört der vascular endothelial growth factor (VEGF), es gibt fünf VEGF-Liganden (VEGF-A bis –D und placental growth factor, PIGF) und drei Rezeptoren (VEGFR1 bis -3) [62]. VEGF und der Rezeptor VEGFR2 werden in plexiformen Läsionen von PAH-Patienten exprimiert [69].

Des Weiteren sind erhöhte Spiegel des *basic fibroblast growth factor* (bFGF) im Plasma und Urin von PAH Patienten beschrieben [70].

Metabolische Veränderungen in Form von erhöhter Glukoseaufnahme, sowie einer erhöhten glykolytischen Aktivität treten in Endothelzellen und Lungen von IPAH-Patienten auf [71]. Dieser als Warburg-Effekt [72] bezeichnete Wechsel der Zellen vom normalen Zustand mit geringer Glykolyse-Rate unter aeroben

11

Bedingungen, hin zu einer stark erhöhten Glykolyse-Rate mit anschließender Laktat-Fermentation, ist vor allem in Tumorzellen beschrieben [73].

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sind bei Veränderungen der Proteinexpression der Extrazellulärmatrix involviert [74], und ein Ungleichgewicht der MMPs und ihrer Inhibitoren (*tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*, TIMPs) tritt auch in den Pulmonalarterien von IPAH Patienten auf [75].

Chronische Hypoxie

Verschiedene mit PH-assoziierte Lungenerkrankungen wie COPD, interstitielle Fibrose und Kollagenosen gehen mit chronischer Hypoxie einher [76]. Im Gegensatz zu den systemischen Gefäßen, bei denen Hypoxie eine Vasodilatation hervorruft, löst eine alveoläre Hypoxie eine hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion (HPV) aus. Die HPV führt dazu, dass schlecht ventilierte Bereiche der Lunge schwächer, und gut ventilierte Bereiche stärker durchblutet werden und optimiert damit das Ventilations-Perfusions-Verhältnis und die Sauerstoffanreicherung des Blutes [77]. Allerdings steigt auch der pulmonalarterielle Druck wenn weite Bereiche der Lunge von der alveolären Hypoxie betroffen sind [78]. Als Effektor-Zellen der HPV werden die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen angesehen, die durch erhöhten Ca²⁺-Einstrom oder erhöhte Ca²⁺–Sensitivität den Gefäßtonus verändern [59].

Eine chronische Hypoxie führt zu einer permanenten Vasokonstriktion, vaskulärem *Remodeling* und damit einer PH [76]. Verschiedene Faktoren spielen hierbei eine Rolle. Der *hypoxia-inducible factor* (HIF) wird durch Hypoxie induziert und reguliert die Transkription verschiedener Gene, beispielsweise des VEGF [79]. Auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen eine Rolle, ob diese allerdings erhöht oder erniedrigt sind bei chronischer Hypoxie ist nicht hinreichend geklärt [80]. Nach Reexposition in normoxische Bedingungen wird das *Remodeling* umgekehrt und die Verdickung der Gefäße geht fast auf den Ausgangszustand zurück [81].

Mechanische Stimuli

Des Weiteren werden mechanische Reize als Auslöser der PAH diskutiert. Mechanische Stimuli wie Scherstress und mechanische Ausdehnung können die Expression von Extrazellulärmatrix-Proteinen [82] und die Proliferation der glatten Muskelzellen in den Gefäßen fördern [83].

Inflammatorische Prozesse

Auch verschiedene inflammatorische Prozesse spielen eine Rolle bei der PAH. Es treten HIV- und Schistosomiasis-assoziierte Formen auf [84], und verschiedene zirkulierende Autoantikörper sind in PAH-Patienten beschrieben [85]. Nach einer anfänglichen Schädigung der Gefäße sezernieren die vaskulären Zellen Chemokine und Zytokine und rekrutieren dadurch zirkulierende inflammatorische Zellen. Makrophagen, B- und T-Lymphozyten sowie dendritische Zellen sind in plexiformen Läsionen und anderen vaskulären Läsionen in der PAH präsent [44, 54, 85, 86].

Das Chemokin Fraktalkin/CX3CL1 bewirkt die Adhäsion und Aktivierung zirkulierender, CX3CR1-positiver Leukozyten. In PAH-Patienten ist der Rezeptor CX3CR1 hoch-reguliert in zirkulierenden CD4⁺ und CD-8⁺ T-Lymphozyten, und die Konzentration des löslichen CX3CL1 im Plasma der Patienten ist erhöht [87, 88]. Auch das Chemokin CCL2 ist hoch-reguliert im Lungengewebe und Plasma von IPAH-Patienten [89].

Außerdem sind die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1β (IL-1β) und Interleukin-6 (IL-6) im Plasma von PAH-Patienten erhöht [90], und die erhöhten IL-6 Plasma-Werte sind mit einer höheren Mortalität assoziiert [91]. Unterstützt werden diese Beobachtungen zur Rolle des IL-6 durch Versuche im Tiermodell. Die Überexpression von IL-6 in Mäusen führt zu vaskulären Läsionen, die denen der humanen PAH ähneln [92], der *Knockout* von IL-6 mildert die Hypoxieinduzierte PH in Mäusen und verringert die Rekrutierung inflammatorischer Zellen [93].

1.3.3. Rechtsherzhypertrophie

Alle im vorherigen Abschnitt genannten Prozesse sind am vaskulären Gefäßumbau bei PAH beteiligt. Das *Remodeling* der Gefäße führt zur Verringerung des Gefäßlumens, was zusammen mit der anhaltenden Konstriktion der Pulmonalarterien die progressive Zunahme des pulmonalvaskulären Widerstandes zur Folge hat. Der dadurch entstehende Scherstress führt zusätzlich zur Produktion von Extrazellulärmatrix-Bestandteilen, zur Proliferation der glatten Muskelzellen und Fibroblasten, sowie einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration [46, 82, 83].

Der rechte Ventrikel des Herzens reagiert auf die gesteigerte Nachlast anfangs mit kompensatorischer Hypertrophie und leichter Dilatation. Im Verlauf der Erkrankung kommt es aber zur Dekompensation, die ein Rechtsherzversagen zur Folge hat [94, 95].

Neben dem pulmonal-arteriellen Druck (PAP) werden bei der Rechtsherzkatheter-Untersuchung zur Diagnosestellung einer PH auch das Herzminutenvolumen, der rechtsventrikuläre und der rechtsatriale Druck (RAP) gemessen. Der rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (RVEDP) gibt die rechtsventrikuläre Insuffizienz wieder [96]. Die Prognose der Patienten hängt maßgeblich davon ab, wie lange der rechten Ventrikel die gesteigerte Nachlast kompensieren kann [38, 97]. Der RAP ist dabei ein sehr guter hämodynamischer Prognoseparameter für PAH-Patienten [98, 99].

1.4. Therapie der Pulmonalen Hypertonie

In Deutschland sind sieben Medikamente aus drei Wirkstoffgruppengruppen zur Behandlung der PAH zugelassen. Als spezifische Therapien sind Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, Phosphodiesterase-5-Inhibitoren und Prostanoide zugelassen [100, 101], deren Wirkmechanismen im folgenden Abschnitt beschrieben werden. In Abbildung 6 auf Seite 16 ist die Wirkungsweise der zugelassenen Medikamente (graue Kästen und Pfeile) und neuer Therapieansätze (rote Kästen und Pfeile) schematisch dargestellt.

14

1.4.1. Zugelassene Therapien

Endothelin-Rezeptor-Antagonisten

Endothelin-1 (ET-1) wird hauptsächlich von Endothelzellen sezerniert und bindet an die Rezeptoren ET_A und ET_B [102]. ET_A wird von vaskulären glatten Muskelzellen, und ET_B von Endothel- und glatten Muskelzellen exprimiert. Hypoxie, ROS und Wachstumsfaktoren lösen eine erhöhte ET-1 Expression der Endothelzellen aus. Die Bindung des ET-1 an ET_A und ET_B führt zur Proliferation der glatten Muskelzellen und Vasokonstriktion. Die Bindung an ET_B auf Endothelzellen hingegen induziert die Synthese von NO und anderen Vasodilatatoren, sowie den ET-1 Abbau [103]. Der erste zugelassene Endothelin-Rezeptor-Antagonist (ERA) war Bosentan, der nicht-selektiv an beide Rezeptoren bindet. Ambrisentan ist ein selektiver Antagonist des ETA Rezeptors, der die vasodilatatorischen Effekte des ET_B Rezeptors nicht beeinflusst. Beide Medikamente verbessern die körperliche Leistungsfähigkeit der Patienten und verzögern die klinische Verschlechterung [104, 105]. Sitaxentan wurde aufgrund von Bedenken zur Lebertoxizität wieder vom Markt genommen. Bei Patienten mit Bosentan-Therapie kann es zur Erhöhung der Leber-Transaminasen kommen, weshalb die Leberwerte regelmäßig kontrolliert werden müssen. Macitentan, ein lipophiler dualer ERA mit hoher Gewebeaffinität, wurde 2013 zugelassen [106].

Phosphodiesterase-5-Inhibitoren

NO wird in den Endothelzellen mittels NO-Synthasen aus L-Arginin synthetisiert und diffundiert in die angrenzenden glatten Muskelzellen [107]. Dort aktiviert NO die lösliche Guanylatzyklase (*soluble guanylate cyclase*, sGC), was zum Anstieg des intrazellulären zyklischen Guanosinmonophosphats (*cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) führt [108, 109]. cGMP bewirkt als sekundärer Botenstoff die Relaxation der glatten Muskelzellen, scheint aber außerdem bei der Proliferation eine Rolle zu spielen [56]. Phosphodiesterasen (PDE) bauen sekundäre Botenstoffe wie cGMP ab, die PDE-5 wird vor allem in der Lunge in den glatten Muskelzellen exprimiert [110]. Für PAH zugelassene PDE-5-Inhibitoren sind Sildenafil (seit 2006) und Tadalafil (seit 2010); beide führen zu einer verbesserten Leistungsfähigkeit und einer Verringerung der Symptome bei den Patienten [111, 112].

Prostanoide

Prostanoide sind Arachidonsäure-Metabolite, in die Prostaglandine und Thromboxane unterteilt werden [113]. In der Lunge sind vier verschiedene Prostanoid-Rezeptoren beschrieben, die Bindung von Prostazyklin (Prostaglandin 12) vermittelt über den sekundären Botenstoff zyklisches Adenosin-Monophosphat (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) eine Dilatation, die Bindung von Thromboxan eine Konstriktion der glatten Muskelzellen. Bei PAH ist die Synthese von Prostazyklin verringert und die Synthese des Antagonisten Thromboxan erhöht [55]. Die Folgen sind Vasokonstriktion, Proliferation, Thrombose und Inflammation in den betroffenen Gefäßen [114]. Das erste, für PAH zugelassene Medikament war in den USA das intravenös verabreichte Prostazyklin Epoprostenol (1995). Heute sind auch lloprost [115] und Treprostinil [116] zugelassen, die intravenös, subkutan oder inhalativ verabreicht werden.



Abbildung 6: Aktuelle und neue Therapieansätze zur Behandlung der PAH. Zugelassene Therapien (graue Kästen) und Prüfpräparate (rote Kästen) für PAH. Pfeile stellen Stimulation, abgeschlossene Linien eine Blockade des Rezeptors/Signalweges dar. ET-1, Endothelin-1; ET_A, Endothelin-Rezeptor A; ET_B, Endothelin-Rezeptor B; NO, Nitric oxide (Stickstoffmonoxid); PDE-5, Phosphodiesterase-5; PDGF, Platelet derived growth factor ; sGC, Soluble guanylate cyclase (lösliche Guanylatcyclase). Verändert nach [101].

1.4.2. Neue Therapieansätze

Die zugelassenen Medikamente führen als Mono- oder Kombinationstherapie zu einer deutlichen Verringerung der Hospitalisierungsrate und scheinen auch die Sterblichkeit der Patienten zu senken [117]. Dennoch bleibt die PAH eine chronische Erkrankung, die bis heute nicht heilbar ist. Es gibt neue Therapieansätze, die im folgenden Abschnitt erläutert werden, und deren Wirkungsweise in Abbildung 6 auf Seite 16 in den roten Kästen dargestellt ist.

Prostazyklin-Rezeptor-Agonisten

Selexipag (ACT-293987) ist ein selektiver Prostacyclin-Rezeptor-Agonist, der oral verabreicht wird. Im Tiermodell zeigt Selexipag bessere vasodilatatorische Eigenschaften als Beraprost und Iloprost [118] und wird aktuell in einer klinischen Phase-III-Studie erprobt [119].

Vasoaktives intestinales Peptid

Das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) ist ein Hormon, das nach Bindung an VIP-Rezeptoren cAMP- und cGMP-Signalwege aktiviert und so den Gefäßtonus reguliert [120]. Bei PAH-Patienten sind verringerte VIP-Spiegel im Serum und Lungengewebe dokumentiert [121]. In einer Studie mit acht PAH-Patienten führt die einmalige Inhalation des VIP-Analogons Aviptadil zur kurzzeitigen Verbesserung der Belastbarkeit, der Dyspnoe und des pulmonal-vaskulären Widerstandes [122].

sGC-Stimulatoren und –Aktivatoren

PDE-5-Inhibitoren wirken am Ende des NO-Signalweges und benötigen daher vermutlich einen intakten Signalweg, um effektiv wirken zu können [123]. Riociguat ist ein neuer sGC-Stimulator, der NO-unabhängig die cGMP-Synthese aktiviert. Im Tiermodell bewirkt Riociguat eine Reduktion der Rechtsherzhypertrophie und des vaskulären *Remodelings* [124]. Eine klinische Phase-III-Studie zu Riociguat zeigt die Verbesserung der Leistungsfähigkeit, sowie in weiteren klinischen Endpunkten, wie der Verlängerung der Zeit bis zur

klinischen Verschlechterung der Patienten [125]. Die Zulassung wurde 2013 in den USA und 2014 in Europa erteilt.

Tyrosinkinase-Inhibitoren

Wie bereits weiter oben beschrieben, spielt der Wachstumsfaktor PDGF eine Rolle bei der erhöhten Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen [65-67]. Die Expression des PDGF-Rezeptors ist erhöht bei PAH und daher potentiell interessant für neue PAH-Therapien. Imatinib ist ein BCR-ABL-, c-Kit- und PDGF-Rezeptor Tyrosinkinasen-Inhibitor, der für die Behandlung der chronisch myeloische Leukämie [126] und gastrointestinaler Tumoren zugelassen ist [127]. In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Imatinib die Phosphorylierung des PDGF-Rezeptors verhindert und damit das Remodeling und die Rechtsherzhypertrophie verringert werden [68]. In der klinischen Studie gelang es durch Imatinib die Leistungsfähigkeit sowie hämodynamische Parameter der PAH-Patienten zu verbessern. Allerdings treten Nebenwirkungen, wie beispielsweise Übelkeit, Kopfschmerzen und Ödeme, auf die mit einer erhöhten Abbruchrate der Therapie verbunden waren [128, 129].

In dieser Arbeit wird Imatinib als Therapie im Monocrotalin-Tiermodell eingesetzt, das im folgenden Abschnitt erklärt wird.

1.5. Tiermodelle der Pulmonalen Hypertonie

Zum besseren Verständnis der Pathomechanismen der PH sowie für die Erprobung neuer Therapien, werden experimentelle Tiermodelle verwendet. Es gibt eine Vielzahl von Tiermodellen für PH, am geläufigsten sind Maus- und Rattenmodelle. Bei den am häufigsten verwendeten Modellen wird die PH durch chronische Hypoxie oder Monocrotalin induziert [130].

1.5.1. Hypoxie-induzierte PH

Es wird normo- und hypobare Hypoxie verwendet, um in verschiedenen Tierspezies eine PH zu induzieren. Am häufigsten werden Mäuse und Ratten verwendet, die pathologischen Veränderungen nach Hypoxie-Exposition sind ähnlich [131]. Es kommt zur Muskularisierung präkapillärer Arteriolen sowie zur Mediahypertrophie muskularisierter Pulmonalarterien mit Proliferation der Fibroblasten und der glatten Muskelzellen [132, 133]. Außerdem wird durch die Rekrutierung zirkulierender Monozyten bei Ratten eine vaskuläre Inflammation induziert [134]. Weiterhin kommt **PAP-Anstieg** und es zum zur Rechtsherzhypertrophie. Das vaskuläre *Remodeling* ist bei Mäusen weniger stark ausgeprägt als bei Ratten, in beiden Spezies ist das Remodeling reversibel, wenn die Tiere wieder unter normoxischen Bedingungen gehalten werden. Das Hypoxie-Modell ist eher ein Modell der Gruppe 3 der PH, es weist nicht die PAH-typischen Intima-Hyperplasien, in situ Thrombosen und plexiformen Läsionen auf [135].

1.5.2. Monocrotalin-induzierte PH

Monocrotalin (MCT) ist ein Pyrrolizidinalkaloid der Pflanze *Crotalaria spectabilis*, das in der Leber zum aktiven Monocrotalin-Pyrrol verstoffwechselt wird. Zuerst beschrieben ist die MCT-induzierte PH bei Ratten, die die Samen der *Crotalaria spectabilis* mit dem Futter bekamen [136]. Eine subkutane oder intraperitoneale Injektion von MCT induziert bei Ratten ein starkes pulmonalvaskuläres *Remodeling* und eine rechtsventrikuläre Hypertrophie. Ohne Behandlung sterben die Tiere an einem Rechtsherzversagen [137].

Innerhalb weniger Tage nach der Injektion kommt es zum Endothelschaden, zur Muskularisierung nicht-muskularisierter Arterien und zur Mediahypertrophie in den muskularisierten Arterien [138]. Des Weiteren ist die Infiltration der Adventitia mit inflammatorischen monokuklären Zellen beschrieben [139]. Neben den Lungengefäßen schädigt MCT außerdem Leber, Nieren und Herz [130]. Viele Merkmale der humanen PAH finden sich im MCT-Modell, weshalb es zu den Modellen der PAH gezählt wird. In situ Thrombosen und plexiforme Läsionen treten bei MCT allerdings nicht auf. Ein Kritikpunkt am MCT-Modell ist, dass eine Vielzahl getesteter Medikamente zur Heilung führen, was bei PH-Patienten nicht der Fall ist [135]. Bei Mäusen lässt sich durch MCT kein PH-ähnliches vaskuläres Remodeling auslösen [140].

Neben den beiden beschriebenen Modellen werden außerdem transgene Mäuse mit Mutationen bekannter Mediatoren eingesetzt. Hierzu zählen BMPR2^{+/-} [141], VIP^{-/-} [142], Apolipoprotein E^{-/-} Mäuse mit fettreicher Diät [143], sowie Serotonin [144] und Interleukin-6 überexprimierende Mäuse [92]. In einem neueren Tiermodell führt die Kombination von chronischer Hypoxie und der Injektion eines VEGFR2-Inhibitors (SU5416) bei Ratten zu einer irreversiblen PH. Präkapilläre arterielle Endothelzell-Proliferation, die Proliferation der glatten Muskelzellen und plexiforme Läsionen treten auf [145].

In der vorliegenden Arbeit wurde das MCT-Modell verwendet um die Lungen-Proteom-Veränderungen im PAH-Tiermodell ohne Therapie, und mit Imatinib-Therapie zu untersuchen. Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Methoden der metabolischen Markierung mit stabilen Isotopen und der Massenspektrometrie zur Untersuchung des Lungenproteoms erläutert.

1.6. Proteomik

Der Begriff *Proteomics* wurde 1994 von Marc Wilkins geprägt und bezeichnet die Erforschung des Proteoms [146]. Das Proteom umfasst die Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle oder einem Lebewesen unter definierten Bedingungen und zu einem definierten Zeitpunkt. Im Gegensatz zum statischen Genom ist das Proteom dynamisch variabel und damit komplexer. Das humane Genom enthält etwa 30000 Gene, aus denen etwa eine Millionen Proteine exprimiert werden. Alternative mRNA-Spleißvarianten und posttranslationale Modifikation der Proteine erhöhen die Diversität des Proteoms [147]. In der Proteomik werden Massenspektrometer verwendet, um Proteine zu identifizieren. 2002 erhielten John Fenn und Koichi Tanaka für ihre Entwicklung von Ionisierunstechniken für die Massenspektrometrie den Nobelpreis für Chemie [148].

1.6.1. Massenspektrometrie

Mit Hilfe der Massenspektrometrie lassen sich Verbindungen und Moleküle anhand ihrer Masse identifizieren. In der Proteomik-Forschung werden Massenspektrometer zur Detektion des Masse-zu-Ladungsverhältnisses (m/z) von Peptidionen verwendet, mit dem Ziel, das Peptid zu identifizieren. Abbildung 7 zeigt schematisch den grundlegenden Aufbau eines Massenspektrometers.



Abbildung 7: Schematisierter Aufbau eines Massenspektrometers. Die Hauptkomponenten sind die Ionenquelle, der Massenanalysator und der Detektor, die alle in einem Hochvakuum-System arbeiten und von einem Kontrollsystem gesteuert und überwacht werden (verändert nach [149]).

Die Variante Probeneinlass-Systems, Ionenquelle des des der und Massenanalysators bestimmen den Typ des Massenspektrometers. Die Probe wird entweder direkt oder von einem Flüssigchromatographie-System (liquid chromatography, LC) in das Massenspektrometer eingebracht. Die am häufigsten verwendeten lonenquellen sind Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix-assisted Laser-Desorption Ionization, MALDI) [150] und Elektrospray Ionisierung (ESI) [151]. Die Peptid-Ionen befinden sich nun in der Gasphase und werden im Massenanalysator nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt und im Detektor erfasst. Als Massenanalysatoren werden in der Proteomik die Ionenfalle, der Flugzeitanalysator (time of flight, TOF) und der Quadrupol-Analysator angewendet. Das Hochvakuum soll einen ungebremsten Ionenstrom ermöglichen. Das ganze System wird von einem Kontrollsystem gesteuert und überwacht [152].

In der vorliegenden Arbeit wurde ein LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific) Massenspektrometer verwendet. Dies ist ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) das aus einem Massenanalysator, einer linearen Ionenfalle (*linear trap quadrupole*, LTQ) und einem Orbitrap-Detektor besteht. Die Proben werden mit einem Umkehrphasen- (*reverse phase*, RP) Flüssigchromatographie-System

(*liquid chromatography*, nano LC-System) in die Elektrospray Ionenquelle injiziert. Die Peptide werden von der RP-C18-Säule mit zunehmender Konzentration eines organischen Lösungsmittels eluiert. An der Spitze der LC-Säule ist eine hohe positive Spannung angelegt, so dass die Peptide protoniert werden und positiv geladene Ionen entstehen (Abbildung 8).



Abbildung 8: Elektrospray Ionisierung (ESI). Aus der Flüssigchromatographie (LC)-Säule austretende Peptide werden protoniert, lösen sich von der Spitze der Säule und durch Verdunstung des Lösungsmittels entstehen immer kleiner werdende Tröpfchen. Wenn nur noch einzelne Peptid-Ionen vorliegen, wandern diese zum negativ geladenen Eingang des Massenspektrometers (verändert nach [153]).

Aus der Säulenspitze treten Tröpfchen aus und wandern aufgrund ihrer positiven Ladung zur Gegenelektrode am negativ geladenen Eingang des Massenspektrometers. Dabei verdunstet das Lösungsmittel und immer kleinere Tröpfchen entstehen, bis die Peptide als einzelne Peptid-Ionen in der Gasphase vorliegen und ins Massenspektrometer eintreten [153].

Die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) besteht aus zwei Phasen und ermöglicht es, nach der Bestimmung des m/z-Verhältnisses und der Intensität noch Informationen über die Primärstruktur des Peptids bzw. Proteins zu erhalten. Dazu werden die Ionen in der zweiten Phase isoliert und in einer Kollisionskammer mit inertem Gas kollidiert, so dass sie in Fragmente zerbrechen. Dann wird das m/z-Verhältnis der Fragment-Ionen bestimmt und mit Hilfe von Datenbanken das ursprüngliche Protein identifiziert. Abbildung 9 auf Seite 23 zeigt ein LTQ-Orbitrap Velos Massenspektrometer.


Abbildung 9: Schematische Darstellung des LTQ Orbitrap Massenspektrometers. Die durch Elektrospray-Ionisation (ESI) entstandenen Peptidionen werden durch die lineare Ionenfalle (LTQ) zum Orbitrap geleitet. Die Ionen mit der höchsten Intensität werden anschließend im LTQ selektiert und fragmentiert, und die m/z -Verhältnisse der Fragment-Ionen gemessen (verändert nach [154]).

Die in der ESI-Ionenquelle erzeugten Peptid-Ionen werden durch eine hochfrequente Spannung über eine lineare Ionenquelle (LTQ) zur einer Ionenfalle (C-trap) geleitet, wo sie komprimiert und zum Orbitrap-Detektor weitergeleitet werden. In der ersten Phase werden die m/z-Verhältnisse im sogenannten *full MS-Scan* detektiert. In der zweiten Phase (*MS/MS-Scan*) werden in absteigender Intensität die Ionen im LTQ sortiert und durch kollisionsinduzierte Dissoziation fragmentiert (*collision-induced dissociation*, CID). Anhand der m/z-Verhältnisse der Fragment-Ionen werden die ursprünglichen Proteine mit Hilfe von Datenbanken identifiziert [154].

1.6.2. Metabolische Markierung mit stabilen Isotopen

Anhand der oben beschriebenen Methode lassen sich Peptide und Proteine in einer Probe identifizieren, jedoch nicht quantifizieren. Die Quantifizierung erfolgt in der Proteomik-Forschung durch die Anwendung verschiedener Techniken, z.B. der 2D-Gelelektrophorese, der chemischen Markierung oder der metabolischen Markierung [155]. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Markierung mit Hilfe von stabilen Isotopen angewendet (*stable isotope labeling of amino acids in cell culture*, SILAC). Bei der SILAC-Methode werden Aminosäuren verwendet, die stabile Isotope (²H, ¹³C, ¹⁵N) enthalten - am häufigsten werden die Aminosäuren Arginin, Lysin, Leucin und Valin eingesetzt [156]. Abbildung 10 auf der nächsten Seite zeigt den Ablauf eines SILAC-Experiments mit ¹³C-markiertem, "schweren" Lysin. Die Zellen werden dazu in Medium mit "leichten" ¹²C₆-Lysin (Lysin-0)

Aminosäuren und "schweren" ¹³C₆-Lysin (Lysin-6) Aminosäuren kultiviert. Die Massendifferenz liegt dabei bei 6 Dalton (Da) für die Aminosäure Lysin, bei der jedes der sechs Kohlenstoffatome (¹²C) durch ein ¹³C ersetzt wurde. Ziel ist es, zwei verschiedene Zustände zu vergleichen. So werden beispielsweise Kontrollzellen in Lysin-0-Medium kultiviert und behandelte Zellen in Lysin-6-Medium. In der Adaptionsphase sind im Massenspektrum der in Lysin-6 kultivierten Zellen schwere und leichte Peptidpaare desselben Peptids zu sehen mit der spezifischen Massendifferenz von 6 Da. Nach fünf Zellteilungen sind die Zellen komplett markiert (97%), und bei der Messung der Proben werden im Massenspektrometer nur noch die schweren Peptide detektiert [157].



Abbildung 10: Schematische Darstellung eines SILAC-Experiments. Die Zellen werden in Medium kultiviert, das entweder leichte (Lysin-0) oder schwere (Lysin-6) Aminosäuren (AS) enthält. Nach fünf Zellteilungen haben die Zellen das Lysin-6 vollständig inkorporiert. Die Massendifferenz zwischen Lysin-0 (schwarzer Kreis) und Lysin-6 (blaues Dreieck) beträgt 6 Da. Werden die Zelllysate 1:1 gemischt und mit dem Massenspektrometer analysiert lassen sich die markierten Peptide von den nicht markierten unterscheiden, und die relativen Proteinmengen berechnen (verändert nach [157]).

Um die beiden Proteome quantitativ vergleichen zu können, werden die Zelllysate der Proben 1:1 gemischt. Bei der Verwendung von Lysin-6 für die Markierung werden die Proben dann mit dem Enzym Lys-C verdaut. Das Enzym spaltet die Proteine nach jedem Lysin, so dass jedes Peptid, das analysiert wird, nur ein Lysin am C-Terminus enthält. Die detektierten Peptidpaare unterscheiden sich durch die spezifische Massendifferenz von 6 Da. Anhand der Intensitäten der leichten und schweren Peptide kann die relative Proteinabundanz in beiden Proben berechnet werden. Dazu wird aus den Intensitäten die SILAC-Ratio berechnet, die die relative Proteinexpression wiedergibt [156]:

SILAC – Ratio = Intensität schwer ÷ Intensität leicht

Die Vorteile der Methode liegen in der einfachen Handhabung und gemeinsamen Probenaufbereitung, die Veränderungen durch unterschiedliche Behandlung verhindert.

SILAC wurde in der Zellkultur entwickelt, ist aber heute auch auf Pflanzen [158], Bakterien [159], Hefen [160] und Mäuse anwendbar. Für die komplette Markierung von Mäusen wird lysinfreies Futter verwendet, dem schweres Lysin-6 zugesetzt ist. Bei durchgehender Fütterung der Mäuse mit Lysin-6-Futter sind die Nachkommen der zweiten Filialgeneration (F2) komplett markiert (über 96%). Die Tiere entwickeln sich normal und zeigen keine Veränderungen in Wachstum, Verhalten und Fertilität. Die aus dem Gewebe, aus Zellen oder dem Blut isolierten Proteine der komplett markierten SILAC-Mäuse können als interner Standard für die Quantifizierung verwendet werden. Das Vorgehen ist hierbei anders als in dem oben gezeigten Zellkultur-Versuch. Die Proteine der SILAC-Maus werden sowohl mit den Proteinen der Kontrolltiere als auch der Versuchstiere, z.B. Knockout-Mäusen gemischt. Die Proben werden zusammen aufgearbeitet und im SILAC-Ratios Massenspektrometer gemessen. Die der Kontrollund Versuchsprobe werden anschließend dividiert und so der schwere Lysin-6-Standard wieder heraus gerechnet [161].

Die komplette Markierung von Modellorganismen ist aufwendig und teuer, es ist aber auch möglich, die Markierung nur in einem bestimmten Zeitraum anzuwenden (*pulsed/dynamic in vivo* SILAC). Loose et al. haben Molche nach der Amputation des Schwanzes für 60 Tage mit Lysin-6 markiert, um die neu synthetisierten Proteine während der regenerativen Prozesse zu markieren [162]. Darüber hinaus lassen sich durch *dynamic* SILAC auch Auf- und Abbauraten (*turnover*) von Proteinen bestimmen [163, 164].

In der vorliegenden Arbeit werden die Ratten in einem *pulsed*-SILAC Versuchsansatz für zwei Wochen mittels Lysin-6-Futter markiert.

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Die Rolle vieler, in der Einleitung erwähnter Signalwege der PH ist inzwischen bekannt. Zur Behandlung der PH sind außerdem verschiedene Therapien entwickelt und zugelassen worden, die in diese Signalwege eingreifen. Trotz großer Fortschritte in der Erforschung möglicher Ursachen und Behandlungsansätze der PH, ist diese Erkrankung aber noch nicht heilbar.

Mittels neuer *high-throughput* (Hochdurchsatz) *non-hypothesis driven* (nichthypothesengelenkter) Ansätze ist es heute möglich, sich einen Überblick über die Veränderungen im Genom oder Proteom zu verschaffen, ohne dabei den Fokus auf bekannte Veränderungen zu legen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-hypothesengelenkter Ansatz gewählt, um Veränderungen des Lungenproteoms im MCT-Modell für PAH der Ratte mit und ohne Therapie zu untersuchen. Die metabolische Markierung der Proteine mit der SILAC-Methode ermöglicht darüber hinaus die Quantifizierung der im Massenspektrometer identifizierten Proteine.

Die Tiere wurden in den letzten zwei Versuchswochen mit Lysin-6-Futter gefüttert, um die in dieser späten Phase der Erkrankung neu synthetisierten Proteine zu markieren und zu quantifizieren. Das Ratten-MCT Modell für PAH ist ein in der Arbeitsgruppe etabliertes Tiermodell zur Untersuchung der pathologischen Veränderungen der PAH sowie der Erforschung neuer Therapieansätze.

Es wurden drei Gruppen von Ratten für zwei Wochen mittels Lysin-6-Futter markiert. Eine gesunde Kontroll-Gruppe dient zur Normalisierung der Inkorporation des markierten Lysins in das Lungenproteom der Ratten. In der MCT-behandelten Placebo-Gruppe sollen die pathologischen Veränderungen des Lungenproteoms im PAH-Modell untersucht werden. Ziel ist es, bisher unbekannte Mediatoren und Signalwege der PH zu identifizieren.

Die dritte Imatinib-Gruppe stellt ein PAH-Modell unter Therapie dar. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Imatinib das *Remodeling* der Pulmonalgefäße im Tiermodell verringert. In klinischen Studien zeigen sich eine verbesserte Leistungsfähigkeit und verbesserte hämodynamische Parameter der Patienten. Welche Proteine unter der Therapie mit Imatinib im Lungenproteom des PAH-Tiermodells verändert sind, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Blottingmembran	Biorad, München, Deutschland			
Einmalspritze 1ml Luer Omnifix®-F	B.Braun Melsungen AG, Melsungen,			
	Deutschland			
Kanülen, Hyperdermic Needles Luer Lock, verschiedene Größen	Henry Schein, Melville, USA			
Paraffin-Einbettmedium Paraplast Plus®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,			
	Deutschland			
Precellys Ceramic Kit 1,4 mm 2 ml tube	Peqlab, Erlangen, Deutschland			
S-Monovette® EDTA	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht,			
	Deutschland			
S-Monovette® Lithium-Heparin	Sarstedt AG und Co, Nümbrecht,			
	Deutschland			
Vasofix® Braunüle 20G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen,			
	Deutschland			
Whatman Blotting Papier	Biorad, München, Deutschland			

2.1.2. Chemikalien

Acetonitril					Sigma-	Aldrich	Chemie	GmbH,	Steinheim,
					Deutsc	hland			
Amersham	ECL	Prime	Western	Blotting	GE He	althcare	, Münche	n, Deutsc	hland
Detection R	eagent	İ							
Ammonium	persulfa	at 10%			Sigma	Aldrich	Chemie	GmbH,	Steinheim,
					Deutsc	hland			
Baytril® 2,5	%				Bayer V	Vital, Lev	verkusen	, Deutsch	land
BSA (Bovin	e Seru	m Albur	nin)		PAA	Labora	tories	GmbH,	Pasching,
					Österre	eich			
BSA Proteir	n Stand	lard			Sigma-	Aldrich,	Müncher	n, Deutsch	nland

C18 Empore Disks	3M, Minneapolis, Minnesota, USA		
C18-AQ RepoSil-Pur, 3 µm	Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch-Entringen,		
	Deutschland		
Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland		
Dulbecco's Phosphate buffered saline	PAN Biotech GmbH, Aidenbach,		
(DPBS)	Deutschland		
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland		
Ethanol 99,6%, 96% und 70%	J.T.Baker, Altmann Analytik GmbH & Co.		
	KG, München, Deutschland		
Formaldehyd-Lösung 3,5-3,7%	Otto Fischar GmbH & Co KG, Saarbrücken,		
	Deutschland		
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH,		
	Unterschleißheim, Deutschland		
Isotone Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%	B.Braun Melsungen AG, Melsungen,		
	Deutschland		
Kaleidoskop Marker	BioRad Laboratories GmbH, München,		
	Deutschland		
LTQ ESI Positive Ion Calibration Solution Thermo Scientific, Rockford, USA			
LIQESI FUSILIVE IUN CAIIDIALIUN SUIULIUN	Thermo Scientific, Rockiora, USA		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration	Thermo Scientific, Rockford, USA		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution	Thermo Scientific, Rockford, USA		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe,		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver Monocrotaline	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver Monocrotaline Natrium-Chlorid 58,44g/mol	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe,		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver Monocrotaline Natrium-Chlorid 58,44g/mol	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver Monocrotaline Natrium-Chlorid 58,44g/mol NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver Monocrotaline Natrium-Chlorid 58,44g/mol NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		
LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution Methanol Methylcellulose Milchpulver Monocrotaline Natrium-Chlorid 58,44g/mol NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gele NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) NuPAGE SDS MOPS Running Buffer (20x)	Thermo Scientific, Rockford, USA Thermo Scientific, Rockford, USA Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Sigma-Aldrich, München, Deutschland Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland		

PicoTip Emitter, aus Quarzglas	DNU-MS GbR, Berlin, Deutschland		
Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific, Rockford, USA		
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-	Thermo Scientific, Rockford, USA		
Puffer			
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA		
Roti [®] -Load	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe,		
	Deutschland		
SDS Pellets	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe,		
	Deutschland		
ß-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,		
	Deutschland		
Super Signal ® West Femto Maximum	Thermo Scientific, Rockford, USA		
Sensitivity Substrate			
Tetramethylethylendiamine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,		
	Deutschland		
Trifluoressigsäure (TFA)	Thermo Scientific, Rockford, USA		
Tris Base	Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe,		
	Deutschland		
Tween 20	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,		
	Deutschland		
Xylol	VWR International S.A.S., Fontenay-sous-		
	Bois, Frankreich		

Für die Massenspektrometrie wurden Chemikalien höchster Reinheit (HPLC-grade oder MS-grade) verwendet.

2.1.3. Molekularbiologische Kits

Colloidal Blue Staining Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DC Protein Assay	Biorad, München, Deutschland
Pierce ® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

2.1.4. Enzyme

Lys-C Endopeptidase

WAKO, Richmond, Virginia, USA

2.1.5. Futter

Lys(0)-SILAC-Mouse Diet	Silantes, München, Deutschland
Lys(6)-SILAC-Mouse Diet	Silantes, München, Deutschland
Normale Haltungsdiät – Ratten und Mäuse	Altromin, Lage, Deutschland

2.1.6. Operationsbesteck

Anatomische gebogene Pinzette	Aesculap®, BD 313 R 75060, stainless			
Anatomische gebogene Pinzette	$F.S.T. @, \ 110 \ 52\text{-}10, \ Germany, \ 02r21, \\$			
	stainless			
Kleine spitze gebogene Pinzette	moria®, MC 31			
Kleine spitze Schere	Aesculap®, BC1 00R 05020, stainless			
Knüpfpinzette	Aesculap®, FD 281R, stainless			
Nadelhalter	Aesculap®, BM1 48R, stainless			

2.1.7. Verwendete Geräte

Analysenwaage	Kern&Sohn GmbH, Balingen,
	Deutschland
Beatmungspumpe	FMI Föhr Medical Instruments GmbH,
	Seeheim- Ober Beerbach, Deutschland
EKG-Elektroden	AD Instruments GmbH Germany,
	Spechbach, Deutschland
Gasmischeinheit	FMI Föhr Medical Instruments GmbH,
	Seeheim- Ober Beerbach, Deutschland
Isofluran-Verdampfer Dräger-Vapor 2000	Drägerwerk AG und Co. KG, Lübeck,
	Deutschland
Laborwaage	Kern&Sohn GmbH, Balingen,
	Deutschland
LC EASY-nLC [™] (Nano-HPLC)	Proxeon Biosystems, Odense, Dänemark
LTQ Orbitrap Velos Massenspektrometer	Thermo Scientific, Bremen, Deutschland

Mikrotiterplattenleser FLUOstar galaxy	BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland		
Mikrotiterplattenleser Infinite 200 Pro	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz		
Millar®-Katheter (Model Spr-320 REF 840-	Millar Instruments, Houston Texas, USA		
8160, Length 140 cm, Size 2F)			
Narkosekasten,	Eigenbau		
Durchsichtiger Plexiglaskasten			
OP-Mikroskop (Lupe) Leica MS 5	Leica GmbH, Wetzlar		
Powerlab	AD Instruments GmbH Germany,		
	Spechbach, Deutschland		
Precellys 24	Peqlab, Erlangen, Deutschland		
Pressure control unit	Pressure control unit PCU-200		
Q-Flow	Vögtlin, Aesch, Schweiz		
Thermoplatte S	Desaga, Wiesloch, Deutschland		
Thermosonde Tcat-2LV	Physitemp Instruments, Inc.; Clifton, New		
	Jersey, USA		
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen,		
	Deutschland		
Ultra-Turrax	Ika, Staufen, Deutschland		
Vakuumzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland		
Westernblot Entwicklungssoftware ChemoStar	Intas Science Imaging Instruments		
	GmbH, Göttingen, Deutschland		
Westernblottingsystem	BioRad, München, Deutschland		
Zentrifuge Rotina 46 RS	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen,		
	Deutschland		

2.1.8. Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden männliche Ratten des Auszuchtstammes Sprague-Dawley (CD/SD-Ratten, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von ca. 150-175 g verwendet. Die Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Gen. Nr. B2/322).

2.2. Methoden

2.2.1. Haltung der Tiere

Die Tiere wurden in Tierhaltungsräumen mit fünf Tieren pro Käfig unter

Standard-Haltungsbedingungen gehalten. Wasser wurde *ad libitum* verabreicht, Futter zu Beginn 10 g pro Tier pro Tag (ab einer Woche vor Versuchsbeginn), bei Gewichtsverlust der Tiere wurde die Futtermenge erhöht. Die Behandlung und Fütterung der Tiere erfolgte nach folgendem Versuchsplan:



Abbildung 11: Versuchsplan des SILAC-Fütterungsversuchs der Kontroll-, Placebo- und Imatinib-behandelten Tiere. Der Versuch lief über sechs Wochen, zu Beginn wurde den Kontrolltieren NaCl injiziert, den Placebo- und Imatinib-Tiere subkutan MCT. Nach 2 Wochen wurde zur Adaption auf Lysin-0-Futter umgestellt. In den letzten beiden Wochen wurde zur Markierung Lysin-6-Futter gegeben, parallel dazu bekamen die Placebo-Tiere Methylcellulose und die Imatinib-Tiere Imatinib peroral (p.o.). Nach 6 Wochen endete der Versuch mit der hämodynamischen Messung und Organentnahme. n=5 pro Gruppe.

Die Ratten wurden in den letzten beiden Versuchswochen mit Lysin-6 markiert. Es wurden sowohl die MCT-Ratten als auch die MCT-Ratten mit Imatinib-Behandlung und die Kontroll-Ratten markiert. Anhand der SILAC-Ratios von schweren und leichten Proteinen in jeder Gruppe lassen sich dann Veränderungen in der Proteinsynthese in diesen zwei Wochen erkennen. Die MCT-Ratten befanden sich während der Markierungsphase in der fünften und sechsten Woche nach MCT-Injektion, also im Endstadium der Krankheit. Die MCT-Imatinib Ratten wurden parallel zur Markierung mit dem Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib behandelt, so dass die Veränderungen unter Therapie im Proteom zu finden sind.

2.2.2. Monocrotalin-Behandlung

Die Ratten wurden vor Versuchsbeginn randomisiert in die drei oben genannten Gruppen eingeteilt.

Für die Monocrotalin (MCT)-Behandlung von 20 Ratten wurde 1 g MCT auf der Analysenwaage abgewogen und in 12 ml 1 M HCl gelöst, dann 8 ml 1 M NaOH zugegeben und auf pH 7,4 eingestellt.

Die Ratten wurden gewogen, mit Isofluran betäubt und ihnen wurde 60 mg/kg Körpergewicht MCT subkutan in die Nackenfalte injiziert. Mit den Kontrolltieren wurde ebenso verfahren, statt MCT wurde NaCl injiziert. Ab dem Tag nach der Injektion wurde den Ratten für 14 Tage Baytril zum Trinkwasser gegeben, um pneumonische Veränderungen durch Begleitinfektionen zu vermeiden.

Während der sechswöchigen Versuchsdauer wurden die Ratten täglich gewogen. Bei einer Abnahme des Körpergewichts wurde die Futtermenge erhöht. Sechs Wochen nach MCT/NaCI-Injektion war der Versuch beendet. Die Tabellen 6 und 7 im Anhang enthalten die Daten zum täglich gemessenen Gewicht der Tiere und der verabreichten Futtermenge.

Im Folgenden werden die mit MCT behandelten Tiere als Placebo-Tiere

bezeichnet, die MCT behandelten Tiere mit Imatinib-Therapie als Imatinib-Tiere. Gesunde, mit NaCI behandelte Tiere, werden als Kontroll-Tiere bezeichnet.

2.2.3. Imatinib-Therapie

In den letzten beiden Wochen des sechswöchigen Versuchs wurden die MCTbehandelten Ratten mit Imatinib oder Placebo behandelt. Dazu wurde eine 1%ige Methylcellulose-Lösung in Leitungswasser hergestellt, die Beschichtung der Imatinib-Tabletten wurde entfernt und die Tabletten mit Hilfe eines Mörsers zu Pulver verarbeitet. Das Imatinib wurde in einer Konzentration von 20 mg/ml in der Methylcellulose-Lösung gelöst. Die Tiere in der Imatinib-Gruppe bekamen täglich peroral (p.o.) 100 mg/kg Imatinib in 1% Methylcellulose gelöst. Die Tiere der Placebo-Gruppen bekamen 1% Methylcellulose p.o., das Volumen entsprechend dem Gewicht (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Placebo- und Imatinib-Lösung. Nach dem Körpergewicht der Ratten berechnete Volumina zum p.o. Verabreichen der Placebo- (1% Methylcellulose) und Imatinib-Lösung (20 mg/ml in 1% iger Methylcellulose).

Gewicht Ratte	Volumen Imatinib/
	Methylcellulose
180 g	0,9 ml
200 g	1 ml
220 g	1,1 ml
240 g	1,2 ml
260 g	1,3 ml
280 g	1,4 ml
300 g	1,5 ml
320 g	1,6 ml
340 g	1,7 ml
360 g	1,8 ml
380 g	1,9 ml
400 g	2 ml

2.2.4. Invasive hämodynamische Messung

Am Ende des Versuchs wurden die Tiere gewogen und in einen Narkosekasten mit Sauerstoff-Isofluran-Gemisch gesetzt (Isofluran-Gehalt 5%). Während der 2% hämodynamischen Messung enthielt das Gemisch Isofluran zur Aufrechterhaltung der Narkose. Zusätzlich wurden 60 mg/kg Narcoren® zur Verstärkung der Narkose intraperitoneal verabreicht.

Die Ratten wurden tracheotomiert und mit 60 Atemzügen pro Minute und einem Volumen von 10l/min/kg beatmet. Es wurde ein Elektrokardiogramm (EKG) angeschlossen, um während der Messung das EKG und die Herzfrequenz überwachen zu können. Der Katheter wurde über die *Vena jugularis dexter* eingeführt und bis in den rechten Ventrikel vorgeschoben. Dabei wurde kontinuierlich der Druck aufgezeichnet, um die Position des Katheters zu überprüfen. Die Druckkurven wurden über zwei bis drei Minuten aufgezeichnet. Anschließend wurde der Katheter zur Messung des systemischen arteriellen Blutdrucks (SAP) in die *Arteria carotis communis sinister* eingeführt.

Der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) ist ein Parameter der rechtsventrikulären systolischen Herzfunktion und der höchste, zum Zeitpunkt der Systole gemessene Druck im rechten Ventrikel.

Nach der Messung wurde mittels Herzpunktion unter tiefer Narkose Blut mit Lithium Heparin- und EDTA-Monovetten entnommen, für 10 min bei 3000xg zentrifugiert und das Plasma eingefroren. Die Organe (Herz, Lunge, Nieren, Leber, Pankreas, Diaphragma, Oberschenkelmuskel) wurden entnommen und in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80° C eingefroren.

Die Tierversuche bis zur Tötung der Tiere durch Entbluten wurden von Frau Dr. Wiebke Janssen (Tierärztin) durchgeführt.

36

2.2.5. Messung der Rechtsherzhypertrophie

Zur Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie wurden Perikard und Fettgewebe vom Herz entfernt. Die beiden Atrien und Herzklappen wurden ebenfalls abgeschnitten. Der rechte Ventrikel wurde am Übergang zum Septum abgetrennt und der rechte Ventrikel (RV), sowie der linke Ventrikel mit Septum (LV+S) wurden auf einer Feinwaage gewogen. Die Rechtsherzhypertrophie errechnet sich aus dem Gewichts-Verhältnis vom RV zum LV+S.

2.2.6. Statistische Auswertung

Die mittels Katheter gemessenen hämodynamischen Parameter, sowie der RV/(LV+S)-Quotient der Tiere in den 3 Gruppen wurden mittels *one-way analysis of variance* (ANOVA) und anschließendem Tukey *Post-hoc* Test analysiert. Im Ergebnisteil dargestellt sind die Mittelwerte in den Gruppen \pm *standard error of mean* (SEM). Signifikanzen sind als ^{*/\$}p<0,05, ^{**/\$\$}p<0,01 und ^{***/\$\$\$}p<0,001 dargestellt.

2.3. Proteinbiochemische Methoden

Für die massenspektrometrische Analyse muss das Lungengewebe mit mechanischen und chemischen Behandlungen lysiert und homogenisiert werden. Die anschließende Auftrennung im Gel dient der Verringerung der Komplexität der Proben. Außerdem lassen sich die Proteine anschließend im Gel zu Peptiden verdauen und für die Analyse im Massenspektrometer aufreinigen.

2.3.1. Aufbereitung von Proteinextrakten - Gewebehomogenisierung und Zelllyse

Mit dem Skalpell wurden ca. 50 mg Lungengewebe zerkleinert, mit der Feinwaage gewogen und 1:10 mit SDT-Lysispuffer versetzt. In dem Puffer ist das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten, das über hydrophobe Wechselwirkungen mit

Membranen und Proteinen zur Zelllyse, sowie Denaturierung und Solubilisierung der Proteine führt [165].

<u>SDT-Lysispuffer</u>	
SDS	4 %
Tris/HCI pH 7.6	100 mM
DTT	100 mM

Mit einem Ultra-Turrax wurden die Proben homogenisiert und anschließend 10 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine einheitlich zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben sonifiziert (15 Impulse, 20% Amplitude, 1 s Impuls, 1 s Pause), um die DNA in den Proben zu fragmentieren und die Viskosität zu verringern. Durch anschließende Zentrifugation für 5 min bei 16.000 rpm setzen sich nicht gelöste Zellbestandteile ab, der Überstand enthält die gelösten Proteine und kann für die Proteinbestimmung und weitere Probenaufbereitung verwendet werden.

2.3.2. Proteinkonzentrationsbestimmung mittels DC Protein Assay

Der DC Protein-assay basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry [166] und ist hier gut geeignet, weil er unempfindlich gegen SDS ist und für die Bestimmung des Proteingehalts von Gewebeextrakten besser geeignet ist als der Bradford Test. Im ersten Reaktionsschritt bilden in alkalischer Lösung die Peptidbindungen der Proteine mit Cu²⁺-Ionen einen Komplex (Biuret-Reaktion), der dann im zweiten Schritt ein Folin-Reagenz reduziert und zu einem blauen Farbumschlag führt. Die Absorption wird bei 750 nm gemessen und die Konzentration der Proben anhand einer Eichreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt. Die Durchführung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

2.3.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Im nächsten Schritt wurden die Proteine nach dem diskontinuierlichen SDS-Gel-Elektrophoresesystem unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) im NuPAGE-Elektrophoresesystem (Invitrogen) aufgetrennt. Das SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine und führt dabei zu einer negativen Nettoladung und Denaturierung der Proteine. Mittels Dithiothreitol (DTT) werden zusätzlich die Disulfidbrücken reduziert, so dass alle Polypeptidketten die gleiche Menge SDS binden und nur abhängig von ihrem Molekulargewicht durch die Gelmatrix laufen. Um eine gleichmäßige Auftrennung der Proteine unterschiedlicher Größe zu erreichen, wurden NuPAGE Bis-Tris Gradientengele (4-12% Polyacrylamid) mit NuPAGE MOPS SDS-Laufpuffer nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 50 min.

2.3.4. Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit dem kolloidalen Farbstoff Coomassie Blue G250 gefärbt [167]. Der Farbstoff geht nicht-kovalente, reversible Bindungen mit den Aminosäuren ein. Daher können die Proteine im Gel später wieder entfärbt werden und die Methode ist damit kompatibel mit der anschließenden massenspektrometrischen Analyse. Das Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen) wurde dazu nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.3.5. Enzymatische Spaltung von Proteinen im Gel

Die mit Coomassie angefärbten Proteinbanden im Gel wurden in kleine Stücke aufgeteilt und mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden jeweils in kleinere, ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

<u>ABC-Puffer</u> NH4HCO3 in MilliQ-Wasser

50 mM

5 mg

<u>DTT-Stocklösung (0,5 μg/μl)</u> DTT 10 ml MilliQ-Wasser

<u>lodacetamid-Stocklösung (0,5 µg/µl)</u>	
Iodacetamid	5 mg
10 ml ABC-Puffer	
Puffer A*	
Acetonitril	5%
Trifluoressigsäure	1%
in MilliQ-Wasser	
Puffer A	
Essigsäure	0,5%
in MilliQ-Wasser	
<u>Puffer B</u>	
Acetonitril	80%
Essigsäure	0,5%

Zum Waschen der Gelstücke wurden zweimal 100 µl 50 mM ABC-Puffer/50% Ethanol für 20 min hinzugegeben und der Überstand verworfen. Die Gelstücke sollten nun entfärbt sein und wurden mit 100 µl absolutem Ethanol für 10 min dehydriert. Der Überstand wurde verworfen und der restliche Ethanol in der Vakuumzentrifuge für 5 min verdampft. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 10 mM DTT in 50 mM ABC für 45 min bei 56 °C reduziert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden zur Alkylierung der freien Sulfhydryl-Gruppen 100 µl 55 mM lodacetamid hinzugegeben und die Proben für 30 min in Dunkelheit inkubiert.

Der Überstand wurde erneut verworfen und die Gelstücke wurden für 15 min mit 100 µl ABC Puffer gewaschen und anschließend mit 100 µl absolutem Ethanol dehydriert. Es folgte ein weiterer Waschschritt mit ABC Puffer und anschließend zweimal eine Dehydrierung mit absolutem Ethanol für 15 min sowie eine Verdampfung des restlichen Ethanols in der Vakuumzentrifuge für 5 min.

Es folgte die enzymatische Proteolyse der denaturierten Proteine im Gel mit Lys-C (12,5 ng/ml in ABC Puffer). Zunächst wurden 40 µl der Enzymlösung zu den

Gelstückchen gegeben und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Dann sind die Gelstückchen wieder aufgequollen und es wurde so viel ABC Puffer hinzugegeben, bis alle Gelstückchen bedeckt sind. Die Proben wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Überstand abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgten mehrere Extraktionsschritte, nach denen jeweils der Überstand in diesen neuen Reaktionsgefäßen gesammelt wird. Die Extraktion beginnt mit 100 µl 30% Acetonitril/3% Trifluoressigsäure (TFA) für 20 min, um die enzymatische Reaktion zu stoppen. Dann folgten zweimal eine Inkubation mit 100 µl 70% Acetonitril in MilliQ-Wasser für 20 min und zweimal mit 100 µl 100% Acetonitril für 20 min. Die gesammelten Überstände enthalten die eluierten Peptide. Das Volumen wurde in der Vakuumzentrifuge auf 80 µl reduziert und 1:1 mit Puffer A* gemischt.

Diese Proben wurden nun auf *Stage Tips* gegeben, das sind handelsübliche Pipettenspitzen, die C18-Material enthalten, das über hydrophobe Wechselwirkungen Peptide bindet. Mit Hilfe dieser *reverse phase Stage Tips* können die Peptide entsalzen, gewaschen und aufkonzentriert werden [168, 169].

Aus der EMPORE C18-Extraction Disk wurden mit einem Metallröhrchen zwei Lagen C18 ausgestanzt und in die Pipettenspitzen gefüllt. Zur Equilibrierung wurden 20 µl 100% Methanol zugegeben und 2 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Dann wurden 20 µl Puffer B zugegeben und wieder 2 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurden zweimal 20 µl Puffer A zugegeben und jeweils für 2 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Dann wurde das Peptid-Puffer A* Gemisch auf die Stage Tips pipettiert und zum Binden der Peptide an das C18-Material für 4 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Zum Waschen wurden 20 µl Puffer A zugegeben und 2 min bei 2.600 rpm zentrifugiert. Dann wurden die Stage Tips bei 4 °C trocken gelagert bis sie für die massenspektrometrische Analyse eluiert wurden.

2.4. Massenspektrometrie

Mit dem Massenspektrometer wird das Masse-zu-Ladungsverhältnis der geladenen Peptide gemessen, um anschließend die zugehörigen Proteine zu identifizieren. Die Anwendung der SILAC-Methode in der vorliegenden Arbeit ermöglicht darüber hinaus die Quantifizierung der der Proteine.

Es wurde eine Umkehrphasenchromatographie verwendet, die über eine Elektrospray lonenquelle mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS, LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific) gekoppelt ist. Dazu werden die Proben von den Stage Tips eluiert und mit einem nano-HPLC Flüssigkeitschromatographie-Systems (Proxeon EASY-nLC[™]) auf eine Umkehrphasen- (*reverse phase*, RP) C18-Säule geladen. Auf der Säule werden die Peptide nach ihren hydrophoben Eigenschaften aufgetrennt, so dass polare Peptide zuerst, und unpolare Peptide später eluieren. Es wird mit einem steigenden Gradienten von 5-30% Acetonitril in 0,5% Essigsäure mit einer Flussrate von 200 nl/min über einen Zeitraum von 150 bzw. 240 min aufgetrennt. Mittels Elektrospray Ionisierung (ESI) werden die Peptide protoniert und in die Gasphase gebracht. Das Ionengas tritt in das Massenspektrometer ein, in dem ein full MS-Scan im Orbitrap erfolgt. Nach einer Anreicherung der Ionen in der Ionenfalle (LTQ) werden die Ionen durch die Kollision mit Stickstoff als Stoßgas (collision-induced dissociation, CID) fragmentiert. Die Fragment-Ionen werden dann als MS/MS-Scan detektiert.

2.4.1. Datenverarbeitung

Die Auswertung der MS-Rohdaten erfolgte mit Hilfe der MaxQuant Software (Version 1.0.14.1) [170]. Mit Hilfe der Mascot-Suchmaschine wurde die Datenbanksuche der MS/MS-Ionen gegen die IPI-Rattendatenbank (Version ipi.RAT.v3.68.fasta) durchgeführt. Im *Identify*-Modul werden die Peptide identifiziert und zu Proteingruppen zusammen gefügt. Die *False Discovery Rate* (FDR) beträgt 1% für die Identifizierung der Peptide. Für die Quantifizierung werden die SILAC-Ratios der Peptidpaare mit den Proteinratios verrechnet.

Das Eluieren und die Messung der Proben, sowie die Datenverarbeitung wurden von der wissenschaftlichen Servicegruppe für molekulare Massenspektrometrie des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durchgeführt.

2.5. Molekularbiologische Methoden

Um die mittels SILAC-Markierung und massenspektrometrischer Analyse identifizierten Proteine mit einer zweiten Methode im Lungengewebe nachzuweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Methoden der immunhistochemischen Färbung und des Western Blots angewandt. Beide Methoden basieren auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an die entsprechenden Antigene im Gewebe. Während der Western Blot einen quantitativen Nachweis ermöglicht, ist es mit Hilfe der Immunhistochemie möglich, die Proteine im Gewebe zu lokalisieren.

2.5.1. Western Blots

Aufbereitung von Proteinextrakten

Für die Western Blots wurden die Proteine mit Hilfe des Precellys-Homogenisators aus dem Lungengewebe isoliert. Dazu wurden ca. 30 mg gefrorenes Lungengewebe mit Hilfe eines Mörsers grob zerkleinert und mit 300 µl RIPA-Puffer (mit EDTA und Protease-Phosphatase-Inhibitor nach Angaben des Herstellers) versetzt. Dann wurde das Gewebe im Precellys-Röhrchen 3x für jeweils 30 sec. homogenisiert. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 15.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Röhrchen überführt und 1:10 mit DPBS verdünnt.

Die Messung der Proteinkonzentration wurde mit einem BCA-Test der Firma Pierce nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Der BCA-Test beruht auf der in Abschnitt 2.3.2. beschriebenen Biuretreaktion, die entstandenen Cu²⁺-Ionen bilden hierbei mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex. Die Absorption wird bei 562 nm gemessen und die Konzentration der Proben anhand einer Eichreihe mit BSA bestimmt. Die Proben wurden mit Roti[®]-Load Puffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht und dann für 3 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.

SDS-PAGE und Proteintransfer

Wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben wurden die Proteine mittels SDS-PAGE in einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden 10%ige Gele und folgender Laufpuffer verwendet:

Tris Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%

Die Auftrennung erfolgte bei 100 V für ca. 1,5-2 Std.

Der Transfer der Proteine auf eine Membran erfolgte mittels *wet-blotting* auf eine Nitrocellulosemembran im Kühlblock bei 100 V für 1 Std.

Transfer-Puffer	
Methanol	20%
Tris Base	19 mM
Glycin	190 mM

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Membranen mit 5% Milchpulver in TBST bei RT für eine Stunde blockiert.

<u>TBST</u>	
Tris Base	20 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,05%

Anschließend wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 2 Std. bei Raumtemperatur. Die Sekundärantikörper sind gekoppelt an eine Peroxidase. Nach Zugabe des Substrats (ECL oder Femto) entsteht Chemilumineszenz, die mit dem Entwickler von Intas (Chemo Star) detektiert wird.

Verwendete Primärantikörper:

β-Aktin (ab8226 und ab82267)	1:5000	Abcam
Dyfserlin (NCL-Hamlet)	1:100	Novocastra
Emilin-1	1:100	Thermo Scientific
GAPDH (6C5)	1:3000	Novus Biologicals
HIP1 (4B10)	1:500	Proteintech
Septin 7 (H-120)	1:300	Santa Cruz
Villin (C-19)	1:50	Santa Cruz

Verwendete Sekundärantikörper (Peroxidase-gekoppelt):

Anti-goat (A8919)	1:80000	Sigma
Anti-mouse (A9044)	1:25000	Sigma
Atni-rabbit (A9169)	1:20000	Sigma

Densitometrische Analyse der Immunoblots

Die Expression der Proteine in den Proben wurde mittels densitometrischer Analyse der entwickelten Banden quantifiziert und zur Expression der jeweiligen Ladekontrolle ins Verhältnis gesetzt (β-Aktin oder GAPDH).

Statistische Auswertung

Die Expression der Proteine in den Lungen (normalisiert zur Ladekontrolle) in den Gruppen wurden mittels ANOVA und anschließendem Tukey *Post-hoc* Test analysiert. Im Ergebnisteil sind die Mittelwerte in den Gruppen \pm SEM dargestellt. Signifikanzen sind als ^{*}p<0,05, ^{**}p<0,01 und ^{***}p<0,001 dargestellt.

2.5.2. Immunhistochemie

Zusätzlich zu den Western Blots wurden immunhistochemische Färbungen auf Schnitten von Rattenlungen durchgeführt, um die Expression der fünf Kandidaten in den Lungen zu lokalisieren. Lungengewebe von gesunden Ratten, und Ratten fünf Wochen nach MCT-Injektion, wurden in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Für die Färbungen wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte verwendet. Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll behandelt:

Entparaffinierung/Rehydrierung

Die Schnitte wurden eine Stunde bei 59 °C inkubiert um das Paraffin zu schmelzen, und anschließend 3x10 Minuten in Xylol entparaffiniert und 5 Minuten in 99,6% igem Ethanol inkubiert. Zur Rehydrierung wurde eine Alkoholreihe absteigender Konzentration (99,6%, 96%, 70% Ethanol) verwendet, die Schnitte wurden jeweils 5 min in dem Alkohol inkubiert und anschließend 2x5 min in Aqua dest. gewaschen.

Demaskierung

Bei formalinfixierten Schnitten ist ein Epitop-/Antigen-Retrieval nötig, um die Antigenität der Proteine sicher zu stellen. Dabei werden durch Hitzeeinwirkung die bei der Fixierung entstandenen Quervernetzungen der Proteine wieder rückgängig gemacht, und so die Anzahl immunoreaktiver Epitope erhöht.

Die Schnitte wurden in Citrat-Puffer (pH 6, Biocare Medical) in der Mikrowelle aufgekocht (25 min), anschließend 10 min warm gehalten und 30 min abkühlen lassen. Nach 1 min waschen in Aqua dest. wurde noch eine enzymatische Behandlung der Schnitte mit Proteinase K für 15 min bei RT durchgeführt, und anschließend wieder für 1 min in Aqua dest. gewaschen.

Blockierung

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden wurden die Schnitte nach zweimaligem waschen in TBS-Tris Puffer (pH 7,2) für 60 min in 10% BSA inkubiert. Nach zweimaligem waschen für 5 min in PBS wurde außerdem für 30 min mit Rodent Block R (Biocare Medical) inkubiert, um endogenes IgG zu blockieren und die Verwendung von Maus-Antikörpern auf dem Rattengeweben möglich zu machen. Anschließend wurden die Schnitte 2x1 min in TBS-T Puffer gewaschen. Folgende Primärantikörper werden über Nacht in den angegebenen Verdünnungen auf den Schnitten inkubiert.

Dyfserlin (NCL-Hamlet)	1:50	Novocastra	
Emilin-1 (H-80)	1:300	Santa Cruz	
HIP1 (4B10)	1:1	Santa Cruz	
Septin 7 (H-120)	1:50	Santa Cruz	
Villin-S	1:20	Novocastra	

Immunodetektion

Die Visualisierung der Antigene erfolgt über eine Enzym-Substrat Reaktion. Der Sekundärantikörper ist an das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt, das nach Zugabe des Substrats eine Farbreaktion hervorruft.

Am zweiten Tag wurden die Schnitte 4x5 min in TBS-T Puffer gewaschen und anschließend wurde AP-Polymer Reagenz 3 (ZytoChem-Plus AP Polymer Kit, Zytomed) auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Nach 3x5 min waschen mit TBS-T wurde das Substrat Vulcan Red Chromogen Kit (Biocare Medical) auf die Schnitte gegeben bis die gewünschte Färbeintensität erreicht war. Dann wurde die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt und zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde Hämatoxylin auf die Schnitte gegeben (30 s – 5 min je nach Färbeintensität). Auch diese Reaktion wurde mit Aqua dest. abgestoppt und die Schnitte wurden für 1 min in TBS-T und anschließend 10 min in Leitungswasser gewaschen.

Eindecken

Als Vorbereitung des Eindeckens der Schnitte wurden diese wieder 3x30 s in 99,6% Ethanol und anschließend 2x30 s in Xylol dehydriert. Anschließend wurden die Schnitte in Pertex Mounting Medium (Leica) eingedeckt.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden von Ewa Bieniek (TA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Gewichtszunahme der Tiere während des Versuchs

Ab Beginn des sechswöchigen Versuchs wurden die Tiere nicht mehr *ad libitum* gefüttert, sondern die Futtermenge wurde mit 10 g/Tag und Tier begonnen und im Verlauf so gesteigert, dass die Tiere kontinuierlich zu nahmen und nicht an Gewicht verloren. Abbildung 12 zeigt die Mittelwerte des Körpergewichts der Tiere in den drei Gruppen, während der sechs Wochen Versuchszeit.



Abbildung 12: Gewichtszunahme der Tiere während des Fütterungsversuchs. Mittelwerte des Körpergewichts der Kontroll- (n=3), Placebo- (n=3) und Imatinib-Tiere (n=4) während des Fütterungsversuchs. Von Tag 14 bis 27 wurde Lysin-0- und von Tag 28 bis 41 Lysin-6-Futter gefüttert.

In allen drei Gruppen haben die Tiere kontinuierlich zugenommen. Zum Vergleich der Gewichtszunahme in den Gruppen wurde für jedes Tier eine lineare Regression des Gewichtsverlaufs durchgeführt. Beim Vergleich der Wachstumsrate anhand der Steigungen der Gerade mittels ANOVA zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (p=0,85).

Die gemessenen Gewichte sowie die tägliche Futtermenge pro Tag und Tier sind in den Tabelle 6 und Tabelle 7 im Anhang auf den Seiten 105 und 106 zusammen gefasst.

3.2. MCT-Behandlung zur Ausbildung einer PH und Therapie mit Imatinib

In der vorliegenden Arbeit wurde das MCT-Rattenmodell als Modell der PH verwendet. Den Placebo- und Imatinib-Tieren wurde subkutan 60 mg/kg Körpergewicht MCT injiziert, den Kontrolltieren NaCl. Die Placebo-Tiere erhielten in den letzten beiden Versuchswochen täglich *p.o.* Methylcellulose und die Imatinib-Tiere *p.o.* 100 mg/kg Imatinib, in Methylcellulose gelöst. Der Versuch wurde nach sechs Wochen beendet.

Um die Ausbildung der PH und das Ausmaß der Erkrankung festzustellen wurden mit einem Katheter der systemische arterielle Druck (SAP), der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) und der rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (RVEDP) gemessen. In Abbildung 13 auf Seite 50 sind die gemessenen RVSP (A) und RVEDP (B) Mittelwerte in der Kontroll- (n=3), Placebo- (n=3) und Imatinib-Gruppe (n=4) dargestellt. Des Weiteren wurde der Quotient des Gewichts des rechten Ventrikels zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum bestimmt (RV/LV+S, Abbildung 10 C).



Abbildung 13: Hämodynamsiche Messungen zur Bestimmung der Ausprägung der PH, mit und ohne Imatinib-Behandlung. (A.) Rechtventrikulärer systolischer Druck (RVSP). (B.) Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP). (C.) Quotient des Gewichts des rechten Ventrikels zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum (RV/LV+S). *p<0,05, ***p<0,001 Kontrolle *vs.* Placebo. ^{\$p}<0,05, ^{\$s}p<0,01 Imatinib *vs.* Placebo.

Bei den Placebo-Tieren ist der RVSP nach sechs Wochen signifikant auf 106,3±43,9 mmHg erhöht im Vergleich zu den Kontroll-Tieren mit 23,7±1,1 mmHg. In der Imatinib-Gruppe unterscheidet sich der RVSP mit 44,3±12,6 mmHg nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe wird in den Imatinib-Tieren ein signifikant geringerer RVSP gemessen.

Der RVEDP ist signifikant auf 7,6±1,9 mmHg erhöht in der Placebo-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 1,8±0,1 mmHg. Auch in der Imatinib-Gruppe ist der RVEDP signifikant erhöht auf 5,4±0,7 mmHg im Vergleich zur Kontroll-Gruppe aber signifikant niedriger als in der Placebo-Gruppe.

Der SAP ist signifikant auf 97,5±12,5 mmHg erhöht in der Placebo-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 72,9±0,9. In der Imatinib-Gruppe zeigt sich kein

Unterschied des SAP von 71,7±5,8 mmHg zur Kontroll-Gruppe, im Vergleich zur Placebo-Gruppe ist der SAP signifikant verringert.

Als Maß der Rechtsherzhypertrophie wurde der Quotient des Gewichts des rechten Ventrikels zum Gewicht des linken Ventrikels mit Septum bestimmt (RV/LV+S). In der Placebo-Gruppe zeigt sich ein signifikant erhöhter RV/(LV+S)-Quotient von 0,6±0,11im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 0,22±0,01. Auch in der Imatinib-Gruppe ist der Quotient mit 0,37±0,05 signifikant erhöht im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, im Vergleich zur Placebo-Gruppe wird ein signifikant verringerter Quotient gemessen.

3.3. Massenspektrometrische Analyse der Lungenhomogenate

Nach Beendigung des Versuchs und der hämodynamischen Messungen wurde den Tieren Blut abgenommen und die Organe wurden eingefroren. Für die massenspektrometrische Analyse wurden Lungenhomogenate aufbereitet. Mittels 1D-Gelektrophorese wurden die Homogenate aufgetrennt und anschließend die Proteine im Gel zu Peptiden verdaut. Die Peptide wurden mittels Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt und mittels Elektrospray Ionisierung (ESI) protoniert und ins Massenspektrometer eingebracht. Dort wurde das Masse-zu-Ladungsverhältnis der geladenen Peptide gemessen um anschließend die zugehörigen Proteine zu identifizieren. Die Anwendung der SILAC-Methode in der vorliegenden Arbeit ermöglicht darüber hinaus die Quantifizierung der Proteine. Abbildung 14 auf der nächsten Seite zeigt ein exemplarisches Spektrum der Messung, detektiert wurde ein Peptid des Proteins Huntingtin-interacting protein 1 (HIP-1) mit der Aminosäuresequenz AINTQEVAVK. Bei der verwendeten Methode beträgt die Ladung jedes Peptids +2, so dass die m/z-Differenz im Spektrum $\Delta_{m/z}=3$ ist. Insgesamt beträgt die Massendifferenz zwischen dem nicht markierten Peptid AINTQEVAVK (536,8) und dem ¹³C₆-Lysin markierten Peptid (539,81) 6 Da, da das Peptid ein Lysin enthält.

51



Abbildung 14: Exemplarisches MS^2 -Spektrum des Peptids AINTQEVAVK des Proteins HIP-1. Die Massendifferenz zwischen dem nicht markierten und dem ${}^{13}C_6$ -markierten Peptid beträgt $\Delta_{m/z}$ =3 bei einer Ladung von +2, insgesamt 6 Da. Das Peptid enthält ein ${}^{13}C_6$ -Lysin und ist damit 6 Da schwerer als das unmarkierte Peptid.

3.3.1 ¹³C₆-Lysin Inkorporation in das Lungenproteom der drei Gruppen

Wie in Abbildung 14 dargestellt, lässt sich nach der Analyse der Proben im Massenspektrometer die Inkorporation des ${}^{13}C_6$ -Lysin für jedes Peptid bestimmen. Anhand der Peptide wird das Protein bestimmt, für das sich dann wiederum die Gesamtinkorporation des ${}^{13}C_6$ -Lysins bestimmen lässt. Abbildung 15 auf der nächsten Seite zeigt die mittlere Inkorporation des ${}^{13}C_6$ -Lysin in allen identifizierten Proteinen in der Kontroll-, Placebo- und Kontroll-Gruppe.



Abbildung 15: Durchschnittliche ¹³C₆-Lysin Inkorporation aller detektierten Proteine. Mittelwerte der ${}^{13}C_6$ -Lysin Inkorporation, 50,02% in der Kontroll- (n=2), 50,02% in der Placebo- (n=3) und 50,38% in der Imatinib-Gruppe (n=4).

In der Kontroll-Gruppe wurden 4300 Proteine identifiziert, in der Placebo-Gruppe 4637 und in der Imatinib-Gruppe 4785. Die niedrigste Inkorporation liegt bei 5,2%, die höchste bei 93,2%.

3.4. Analyse der GO-Term Anreicherung

Das Gene Ontology (GO)-Projekt hat zum Ziel ein einheitlicheres Vokabular in den Biowissenschaften einzuführen. Die GO-Datenbank besteht aus drei hierarchisch strukturierten Ontologien die Genprodukte nach ihrer Assoziation mit biologischen Prozessen (BP), zellulären Komponenten (*cellular components*, CC) und molekularer Funktion (MF) beschreiben. Eine häufige Anwendung findet die Datenbank zur *Enrichment*-Analyse, mit der GO-Terme identifiziert werden, die in den vorliegenden Daten überrepräsentiert, also angereichert sind.

3.4.1. Anreicherungen in der Placebo-Gruppe

Die Daten aus der massenspektrometrischen Analyse der Lungenhomogenate der Ratten wurden mit Hilfe des Tools *Gene Ontology enRlchement anaLysis and visuaLizAtion* (GOrilla) analysiert. Dazu wurden die Inkorporationen des ¹³C-Lysin in die Proteine mittel t-Test in der Kontroll- und der Placebo-Gruppe analysiert und nach aufsteigenden p-Werten sortiert. Diese sortierte Liste wurde zur GO-Term Analyse in das GOrilla-Tool eingegeben.

Zelluläre Komponenten

Abbildung 16 auf Seite 55 zeigt die GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Placebo-Tieren, im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Die Farbe der Kästen gibt den p-Wert der Veränderungen in dem jeweiligen GO-Term an. Die niedrigsten p-Werte, unter 10⁻⁹, zeigen die Komponenten Membran und Plasmamembran.

Tabelle 3 auf Seite 56 enthält die GO-Terme, die nach einer Korrektur für multiples Testen (Benjamini und Hochberg) noch einen p-Wert<0,001 zeigen. Neben den Membranveränderungen sind Zellverbindungen (*junctions* und *adherens junctions*), Vesikel und Lamellipodien signifikant verändert.

Die Anreicherung in dem jeweiligen GO-Term errechnet nach folgender Formel:

Anreicherung =
$$\frac{\frac{b}{n}}{(\frac{B}{N})}$$

- (N) = Gesamtanzahl der Gene
- (B) = Anzahl der Gene die mit einem spezifischen GO-Term assoziiert sind
- (n) = Bis zur wievielten Stelle der sortierten Liste die höchste Anreicherung ermittelt wurde
- (b) = Anzahl der Gene aus (B), die bis zu Stellen (n) in der Liste aufgetreten sind [29]



Abbildung 16: GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Lungen der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten. Die Farben der Kästen geben die in der Legende angegebenen p-Werte zu den Veränderungen der jeweiligen GO-Terme, für den Vergleich der ¹³C₆-Lysin Inkorporation zwischen den Kontroll- und Placebo-Tieren, wieder.

Für den GO-Term *plasma membrane* bedeutet dies, dass 4528 Gene in der eingegebenen Liste mit einem GO-Term assoziiert sind, davon sind 720 mit dem GO-Term *plasma membrane* assoziiert. Bis zum 665. Gen in der Liste wird die höchste Anreicherung errechnet, in der sich dann 173 Gene befinden, die mit dem GO-Term *plasma membrane* assoziiert sind. Die höchste Anreicherung findet sich in den GO-Termen *cell-cell adherens junctions* und *lamellipodium*.

Tabelle 3: GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Lungen der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten. Korrigierter p-Wert (Benjamini und Hochberg). Anreicherung: (N) Gesamtzahl Gene, die mit einem GO-Term assoziiert sind, (B) Anzahl der Gene assoziiert mit dem GO-Term in der ersten Spalte, (n) bis zur wievielten Stelle der Liste die höchste Anreicherung dieses GO-Terms ermittelt wurde, (b) Anzahl der Gene aus (B), die bis zu Stellen (n) in der Liste aufgetreten sind.

GOCC-Term	p-Wert	Korrigierter p-Wert	Anreicherung (N, B, n, b)
plasma membrane	5.14E-12	5.46E-9	1.64 (4528,720,665,173)
membrane	1.88E-11	9.98E-9	1.38 (4528,1436,665,292)
plasma membrane part	2.19E-8	7.74E-6	1.86 (4528,455,472,88)
cell junction	2.37E-8	6.29E-6	2.15 (4528,250,514,61)
lamellipodium	1.06E-7	2.25E-5	3.37 (4528,67,521,26)
vesicle	1.16E-7	2.06E-5	1.68 (4528,379,741,104)
cell-cell junction	6.54E-7	9.92E-5	2.93 (4528,114,406,30)
cell projection	1.57E-6	2.09E-4	1.70 (4528,443,529,88)
membrane-bounded vesicle	1.8E-6	2.13E-4	1.68 (4528,321,741,88)
cell-cell adherens junction	6.64E-6	7.05E-4	5.29 (4528,28,367,12)
cytoplasmic vesicle	9.48E-6	9.15E-4	1.64 (4528,313,741,84)

Biologische Prozesse

Abbildung 17 auf der nächsten Seite zeigt die GO-Term Analyse der biologischen Prozesse in den Placebo-Tieren verglichen mit den Kontroll-Tieren. Die niedrigsten p-Werte zeigen die Terme *single-organism process, biological adhesion* und *cell adhesion*. Nach Korrektur der p-Werte zeigen die GO-Terme *biological adhesion* und *cell adhesion* noch p-Werte kleiner als 0,001 (Tabelle 4 auf Seite 58).



Abbildung 17: GO-Term Veränderungen der biologischen Prozesse in den Lungen der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten. Die Farben der Kästen geben die in der Legende angegebenen p-Werte zu den Veränderungen der jeweiligen GO-Terme, für den Vergleich der ¹³C₆-Lysin Inkorporation zwischen den Kontroll- und Placebo-Tieren, wieder.

Tabelle 4: GO-Term Veränderungen der Biologische Prozesse in den Lungen der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten. Korrigierter p-Wert (Benjamini und Hochberg). Anreicherung: (N) Gesamtzahl Gene, die mit einem GO-Term assoziiert sind, (B) Anzahl der Gene assoziiert mit dem GO-Term in der ersten Spalte, (n) bis zur wievielten Stelle der Liste die höchste Anreicherung dieses GO-Terms ermittelt wurde, (b) Anzahl der Gene aus (B), die bis zu Stellen (n) in der Liste aufgetreten sind.

GOBP-Term	p-Wert	Korrigierter p-Wert	Anreicherung (N, B, n, b)
biological adhesion	1.06E-7	9.07E-4	2.00 (4528,200,713,63)
cell adhesion	1.75E-7	7.5E-4	1.99 (4528,198,713,62)

Molekulare Funktion

Bei der Analyse des GO-Term molekulare Funktion zeigen *cytoskeletal protein binding* und *actin binding* die niedrigsten p-Werte (Abbildung 18 auf der nächsten Seite). Nach Korrektur zeigt allerdings kein Term mehr einen p-Wert unter 0,001.


Abbildung 18: GO-Term Veränderungen der molekularen Funktionen in den Lungen der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten. Die Farben der Kästen geben die in der Legende an gegebenen p-Werte zu den Veränderungen der jeweiligen GO-Terme, für den Vergleich der ¹³C₆-Lysin Inkorporation zwischen den Kontroll- und Placebo-Tieren wieder.

3.4.2. Anreicherungen in der Imatinib-Gruppe

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, wurden die Inkorporationen des ¹³C-Lysin in die Proteine mittels t-Test in der Placebo- und der Imatinib-Gruppe analysiert und nach aufsteigenden p-Werten sortiert. Diese sortierte Liste wurde zur GO-Term Analyse in das GOrilla-Tool eingegeben.

Zelluläre Komponenten

Abbildung 19 zeigt die Anreicherungen in den GO-Termen zu den zellulären Komponenten. Nach Korrektur der p-Werte liegt kein GO-Term der zellulären Komponenten mehr unter 0,001. Die höchsten Anreicherungen zeigen succinate-CoA ligase complex (GDP-forming), mitochondrion (part und matrix), lamellipodium und neuronal cell body.



Abbildung 19: GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Lungen der Imatinib-Ratten verglichen mit den Placebo-Ratten. Die Farben der Kästen geben die in der Legende angegebenen p-Werte zu den Veränderungen der jeweiligen GO-Terme für den Vergleich der ¹³C₆-Lysin Inkorporation zwischen den Imatinib- und Placebo-Tieren wieder.

Biologische Prozesse

In Abbildung 20 auf der nächsten Seite sind die Anreicherungen der GO-Terme der biologischen Prozesse in den Lungen der Imatinib-Ratten im Vergleich zu den Placebo-Ratten dargestellt. Nach Korrektur der p-Werte für multiples Testen zeigen die Terme *organic acid catabolic process* und *carboxylic acid catabolic process* p-Werte kleiner als 0,001 (siehe Tabelle 5 auf Seite 63).



Abbildung 20: GO-Term Veränderungen der biologischen Prozesse in den Lungen der Imatinib-Ratten verglichen mit den Placebo-Ratten. Die Farben der Kästen geben die in der Legende angegebenen p-Werte zu den Veränderungen der jeweiligen GO-Terme, für den Vergleich der ¹³C₆-Lysin Inkorporation zwischen den Imatinib- und Placebo-Tieren, wieder.

Tabelle 5: GO-Term Veränderungen der Biologische Prozesse in den Lungen der Imatinib-Ratten verglichen zu den Placebo-Ratten. Korrigierter p-Wert (Benjamini und Hochberg). Anreicherung: (N) Gesamtzahl Gene, die mit einem GO-Term assoziiert sind, (B) Anzahl der Gene assoziiert mit dem GO-Term in der ersten Spalte, (n) bis zur wievielten Stelle der Liste die höchste Anreicherung dieses GO-Terms ermittelt wurde, (b) Anzahl der Gene aus (B), die bis zu Stellen (n) in der Liste aufgetreten sind.

GOBP-Term	p-Wert	Korrigierter p-Wert	Anreicherung (N, B, n, b)
organic acid catabolic process	2.15E-7	1.83E-3	6.69 (4528,81,117,14)
carboxylic acid catabolic process	2.15E-7	9.17E-4	6.69 (4528,81,117,14)

Molekulare Funktion

Die Anreicherungen der GO-Terme zur molekularen Funktion in den Imatinib-Tieren sind in Abbildung 21 auf der nächsten Seite dargestellt. Nach p-Wert Korrektur bleiben keine signifikant veränderten Terme. Die höchste Anreicherung wird in den Termen *succinate-CoA ligase (GDP-forming) activity, beta-catenin binding* und *Rab GDP-dissociation inhibitor activity* gefunden.



Abbildung 21: GO-Term Veränderungen der molekularen Funktionen in den Lungen der Imatinib-Ratten verglichen mit den Placebo-Ratten. Die Farben der Kästen geben die in der Legende angegebenen p-Werte zu den Veränderungen der jeweiligen GO-Terme für den Vergleich der ¹³C₆-Lysin Inkorporation zwischen den Imatinib- und Placebo-Tieren wieder.

3.5. Veränderte Inkorporationen des ¹³C₆-Lysin

Zum Vergleich der Inkorporation des ¹³C₆-Lysin in die einzelnen Proteine wurden die Mittelwerte der Inkorporationen in den Gruppen Kontrolle, Placebo und Imatinib mittels t-Test verglichen.

3.5.1. Placebo-Gruppe

Für den Vergleich der Inkorporation in der Placebo gegen die Kontroll-Gruppe zeigen bei einem p-Wert<0,01 116 Proteine signifikant veränderte Inkorporationen, bei einem p-Wert<0,001 19 Proteine. Die 19 Proteine sind in Abbildung 22 auf der nächsten Seite in einer *Heatmap* dargestellt. Für jede Gruppe ist die Inkorporation des ¹³C₆-Lysin (in %) in das jeweilige Protein farblich dargestellt. Zum Beispiel für Emilin-1 lässt sich erkennen, dass die Inkorporation in der Placebo-Gruppe höher ist als in der Kontroll-Gruppe, und unter Imatinib-Therapie verringert im Vergleich zur Placebo-Gruppe.



Abbildung 22: Heatmap zur veränderten Inkorporation (%) des ${}^{13}C_6$ -Lysin in den Kontroll-, Placebo- und Imatinib-Ratten. 19 Proteine, deren Markierung mit ${}^{13}C_6$ -Lysin signifikant verändert ist in der Placebo- verglichen zur Kontroll-Gruppe (p<0,001).

3.5.2. Imatinib-Gruppe

Für den Vergleich der Inkorporation in der Imatinib gegen die Placebo-Gruppe zeigen bei einem p-Wert<0,01 64 Proteine signifikant veränderte Inkorporationen, bei einem p-Wert<0,001 sind es 13 Proteine. Diese 13 Proteine sind in Abbildung 23 in einer *Heatmap* dargestellt. Für jede Gruppe ist die Inkorporation des ¹³C₆-Lysin (%) in das jeweilige Protein farblich dargestellt.



Abbildung 23: Heatmap zur veränderten Inkorporation (%) des ¹³C -Lysin in den Kontroll-, Placebo- und Imatinib-Ratten. 13 Proteine, deren Markierung mit ¹³C₆-Lysin signifikant verändert ist in der Imatinib- verglichen zur Placebo-Gruppe (p<0,001).

3.5.3. Auswahl der weiter zu untersuchenden Proteine

Aus den 19 Proteinen in Abbildung 22 (Seite 69) wurden nach Recherche zu verfügbaren Antikörpern fünf Kandidaten ausgewählt. Abbildung 24 auf der nächsten Seite zeigt die Veränderungen der ¹³C₆-Lysin Inkorporation für die fünf Proteine *Dystrophy-associated fer-1-like protein* (Dysferlin), *Elastin microfibril interface-located protein 1* (Emilin-1), *Huntingtin-interacting protein-1* (HIP-1), Septin-7 und Villin.

Wie in Abbildung 24.A auf der nächsten Seite dargestellt steigt die Markierung des Proteins Dysferlin in den Placebo-Tieren signifikant auf 47,5% an im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, bei der 27,7% des Dysferlins markiert sind (p=0,00018). Die Imatinib-Gruppe zeigt eine leicht verringerte Markierung des Dysferlins von 42,1% im Vergleich zur Placebo-Gruppe (p=0,31).

In Abbildung 24.B ist die Markierung des Proteins Emilin-1 in den drei Gruppen dargestellt. In der Kontroll-Gruppe sind 27,6% des Proteins markiert, in der Placebo-Gruppe ist die Markierung signifikant auf 52,7% erhöht (p=0,00053). In der Imatinib-Gruppe ist Emilin-1 zu 37,8% markiert, im Vergleich zur Placebo-Gruppe ist dies eine signifikant verringerte Markierung (p=0,012).

Die Veränderungen der Markierung des HIP-1 sind in Abbildung 24.C dargestellt. In der Kontroll-Gruppe sind 51,1% des Proteins markiert, in der Placebo-Gruppe ist die Markierung signifikant auf 55,8% erhöht (p=0,0003). In der Imatinib-Gruppe sind 55,2% der HIP-1 Proteine markiert, es besteht kein Unterschied zur Placebo-Gruppe (p=0,56).

Abbildung 24.D zeigt die Markierung des Proteins Septin-7. Die Markierung beträgt 30,7% in der Kontroll-Gruppe, und ist in der Placebo-Gruppe signifikant erhöht auf 40,2% (p=0,00055). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Placebound der Imatinib-Gruppe, in der 40,7% der Septin-7 Proteine markiert sind (p=0,24).

Das fünfte Protein ist Villin, dessen veränderte Markierung in Abbildung 24.E dargestellt ist. In der Kontrollgruppe sind 50% der Villin Proteine markiert, in der Placebo-Gruppe ist die Markierung signifikant auf 26,3% verringert (p=0,00052). Im Vergleich zur Placebo-Gruppe ist Villin in der Imatinib-Gruppe mit 30% etwas mehr markiert (p=0,29).



Abbildung 24: ¹³C₆-Lysin Markierung der Proteine Dysferlin, Emilin-1, HIP-1, Septin-7 und Villin in den Kontroll-, Placebo- und Imatinib-Ratten. Prozentualer Anteil der Markierung mit ¹³C₆-Lysin der Proteine (A.) Dysferlin, (B.) Emilin-1, (C.) Huntingtin-interacting protein-1 (HIP-1), (D.) Septin-7 und (E.) Villin in den Kontroll- (n=2), Placebo- (n=3) und Imatinib-Ratten (n=4). *p<0,05, ***p<0,001.

folgenden Teil der Arbeit wurde versucht, die mittels SILAC Im und Massenspektrometrie gemessenen Veränderungen der fünf Kandidaten mit Antikörper-basierten Methoden zu bestätigen.

3.6. Nachweis der fünf Proteine mit Antikörper-basierten Methoden

3.6.1. Dysferlin

Abbildung 25.A auf der nächsten Seite zeigt den Western Blot mit dem Anti-Dysferlin Antikörper Hamlet-1 (Novocastra) für die Lungenhomogenate der Tiere aus dem SILAC-Versuch. In Abbildung 25.B ist die Quantifizierung des Blots dargestellt. Es ist ein Anstieg in der Placebo-Gruppe erkennbar, allerdings ist dieser nicht signifikant. In der Imatinib-Gruppe zeigt sich eine signifikant geringere Dysferlin-Expression als in der Placebo-Gruppe (p=0,0234).



Abbildung 25: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für Dysferlin. Dysferlin Nachweis in Rattenlungen mittels (A. und B.) Western Blot und (C.) Immunhistochemie. Die Dysferlin-Expression scheint leicht erhöht in den Lungen der Placebo-Tiere (n=3) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (n=2, n.s.). In den Imatinib-Tieren (n=4) ist die Dysferlin-Expression signifikant verringert im Vergleich zu den Placebo-Tieren (*p<0,05). Mittels immunhistochemischer Färbung lässt sich Dysferlin (rosa) in den Lungen der Kontroll- und MCT-Ratten (5 Wochen nach MCT-Injektion) nachweisen (C.). In den Kontroll-Lungen ist Dysferlin in den kleinen Gefäßen des vasa vasorum lokalisiert, in den MCT-Lungen zusätzlich auch in den größeren Gefäßen der Lunge (Kernfärbung blau, Maßstabsskala 20 µm).

In Abbildung 25.C sind repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen von Lungengewebe mit dem Anti-Dysferlin Antikörper dargestellt. Die Bilder auf der linken Seite zeigen Lungen von gesunden Ratten, oben in 40facher und unten in 63facher Vergrößerung. Eine positive Färbung ist in den kleinen Gefäßen erkennbar, die in der Adventitia der größeren Gefäße lokalisiert sind und diese versorgen (*Vasa vasorum*).

Auf der rechten Seite der Abbildung 25.C sind die Lungen der MCT-behandelter Ratten dargestellt (fünf Wochen nach MCT-Injektion, nicht aus dem SILAC-Versuch). Neben der Färbung der kleinen Gefäße im *vasa vasorum* ist hier auch eine Färbung der Intima und Media der größeren Gefäße erkennbar.

3.6.2. Emilin-1

Abbildung 26. A (Seite 73) zeigt einen Western Blot mit Lungen-Homogenat von den Tieren aus dem SILAC-Versuch und einem Anti-Emilin-1 Antikörper (Pierce). Abbildung 26.B zeigt die Quantifizierung des Western Blots. In den Placebo-Tieren wird signifikant weniger Emilin-1 exprimiert als in den Kotroll-Tieren und den Imatinib-Tieren.

Abbildung 26.C zeigt immunhistochemische Färbungen von Lungengewebe gesunder und MCT-Ratten mit einem Anti-Emilin-1 Antikörper (Santa Cruz). In den Lungen der Kontroll-Tiere zeigt sich eine sehr schwache Färbung des Gewebes. In den Lungen der MCT-Tiere zeigt sich eine starke Färbung der Intima der größeren Arterien, aber auch der kleine Gefäße des *vasa vasorum*. In der 40fachen Vergrößerung ist auch eine Färbung alveolärer Zellen erkennbar.



Abbildung 26: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für Emilin-1. Emilin-1 Nachweis in Rattenlungen mittels (A. und B.) Western Blot und (C.) Immunhistochemie. Die Emilin-1 Expression ist signifikant verringert in den Placebo-Tiere (n=3) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (n=2, *p<0,05)). In den Imatinib-Tieren (n=4) ist die Emilin-1-Expression signifikant erhöht im Vergleich zu den Placebo-Tieren (*p<0,01). In den Kontroll-Lungen ist Emilin-1 (rosa) nur sehr schwach exprimiert, in den MCT-Lungen wird Emilin-1 im Endothel der großen und kleinen Gefäße exprimiert, aber auch im restlichen Lungengewebe (Kernfärbung blau, Maßstabsskala 20 μ m).

3.6.3. HIP1

Abbildung 27.A auf der nächsten Seite zeigt den Western Blot mit einem Anti-Hip-1 Antikörper (Santa Cruz) mit homogenisierten Lungengewebe der Tiere aus dem SILAC-Versuch. Abbildung 27.B zeigt die Quantifizierung des Western Blots. In der Placebo- und der Imatinib-Gruppe wird signifikant weniger HIP-1 exprimiert im Vergleich zur Kontroll-Gruppe.

Bei der Verwendung desselben Antikörpers für immunhistochemische Färbungen zeigt sich in den Lungen der Kontroll-Tiere eine sehr schwache Färbung in kleineren Gefäßen (siehe Abbildung 27.C). In den MCT-Tieren hingegen zeigt sich eine starke Färbung der Media großer und kleinerer Gefäße.



Abbildung 27: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für HIP-1. HIP-1 Nachweis in Rattenlungen mittels (A. und B.) Western Blot und (C.) Immunhistochemie. Die HIP-1 Expression ist signifikant niedriger in den Lungen der Placebo-Tiere (n=3) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (n=2, **p<0,01). In den Imatinib-Tieren (n=4) ist die HIP-1 Expression signifikant verringert im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (*p<0,05). Mittels immunhistochemischer Färbung lässt sich HIP-1 (rosa) in den Lungen der Kontroll- und MCT-Ratten (5 Wochen nach MCT-Injektion) nachweisen (C.). In den Kontroll-Lungen ist HIP-1 schwach in den kleinen Gefäßen des exprimiert, in den MCT-Lungen zusätzlich auch in den größeren Gefäßen der Lunge (Kernfärbung blau, Maßstabsskala 20 μm).

3.6.4. Septin-7

Die Ergebnisse des Western Blots und der Färbungen mit dem Anti-Septin-7 Antikörper (Santa Cruz) sind in Abbildung 28 auf Seite 77 dargestellt. Der Western Blot in Abbildung 28.A zeigt schwächere Banden in den Placebo und Imatinib-Lungen im Vergleich zu den Lungen der Kontroll-Tiere. Die Quantifizierung des Western Blots in Abbildung 28.B zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Verwendung des Antikörpers für die immunhistochemischen Färbungen führt zu einer positiven Färbung der Lungengefäße in der Kontroll-Tieren. Auch in den MCTbehandelten Tieren ist eine positive Färbung der Gefäße erkennbar, allerdings findet sich auch eine positive Färbung des restlichen Lungengewebes (Abbildung 28.C).



Abbildung 28: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für Septin-7. Septin-7 Nachweis in Rattenlungen mittels (A. und B.) Western Blot und (C.) Immunhistochemie. Die Septin-7 Expression ist nicht verändert in den Lungen der Placebo-Tiere (n=3) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (n=2), und im Vergleich zu den Imatinib-Tieren (n=4). Mittels immunhistochemischer Färbung lässt sich Septin-7 (rosa) in den Lungen der Kontroll- und MCT-Ratten (5 Wochen nach MCT-Injektion) nachweisen (C.). In den Kontroll-Lungen ist Septin-7 in der Media der Gefäße exprimiert, in den MCT-Lungen außerdem im restlichen Lungengewebe (Kernfärbung blau, Maßstabsskala 20 µm).

3.6.5. Villin

Abbildung 29.A auf der folgenden Seite zeigt den Western Blot mit einem Anti-Villin Antikörper (Santa Cruz) auf dem Lungengewebe der Ratten aus dem SILAC-Versuch. Im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe sind in der Placebo-Gruppe keine Banden erkennbar, in der Imatinib-Gruppe zeigen sich Banden, die aber schwächer sind als in der Kontrollgruppe. Die Quantifizierung in Abbildung 29.B bestätigt dies, in der Placebo-Gruppe wird signifikant weniger Villin exprimiert als in der Kontroll-Gruppe. In der Imatinib-Gruppe ist die Expression signifikant höher als in der Placebo-Gruppe, aber signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe.

Mittels immunhistochemischer Färbungen (Antikörper von Novocastra) lässt sich Villin in einzelnen Zellen des Lungengewebes nachweisen. Es ist keine positive Färbung der Zellen der Gefäße oder Bronchien zu finden, lediglich vereinzelte Zellen des alveolären Epithels zeigen eine positive Färbung.



Abbildung 29: Western Blot und Immunhistochemische Färbungen für Villin. Villin Nachweis in Rattenlungen mittels (A. und B.) Western Blot und (C.) Immunhistochemie. Die Villin Expression ist signifikant verringert in den Lungen der Placebo-Tiere (n=3, ***p<0,001), und in den Imatinib-Tieren (n=4, *p<0,05) im Vergleich zu den Kontroll-Tieren (n=2). Im Vergleich zu den Placebo-Tieren zeigen die Imatinib-Tiere eine signifikant höhere Villin Expression (**p<0,01). Mittels immunhistochemischer Färbung lässt sich Villin (rosa) in den Lungen der Kontroll- und MCT-Ratten (5 Wochen nach MCT-Injektion) in einzelnen Zellen nachweisen (C.) (Kernfärbung blau, Maßstabsskala 20 μ m).

4. Diskussion

4.1. Auswahl des Tiermodells

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rattenmodell der Monocrotalin (MCT)induzierten PH verwendet. Wenige Tage nach subkutaner MCT-Injektion kommt es in den Pulmonalarterien der Tiere zu einer Endothelschädigung, die zur nicht-muskularisierter Arterien Mediahypertrophie Muskularisierung und zur muskularisierter Arterien führt [138]. Der pulmonalarterielle Druck steigt ab der zweiten Woche nach Injektion, der Quotient zur Bestimmung der Rechtsherzhypertrophie (Gewichts des rechten Ventrikels zum linken Ventrikel plus Septum, RV/LV+S) ist ab der dritten Woche erhöht [171]. Im MCT-Modell scheinen sowohl die Endothelschädigung, als auch inflammatorische Prozesse wie die Infiltration der Adventitia mit inflammatorischen Zellen [139] am Remodeling beteiligt zu sein.

In vorherigen Studien konnte bereits die Entstehung der PAH im Rattenmodell, sowie die Wirksamkeit des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib gezeigt werden. Vier Wochen nach MCT-Injektion zeigen sich ein signifikant erhöhter rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP) und eine Rechtsherzhypertrophie gemessen als RV/LV+S-Quotient. Der Anteil nicht-muskularisierter Arterien nimmt signifikant ab, der Anteil vollständig muskularisierter Arterien nimmt signifikant zu, und in Gefäßen aller Größen ist eine Mediahypertrophie feststellbar. In der fünften und sechsten Woche nach MCT-Injektion werden die Tieren mit Imatinib (1, 10 und 50 mg/Kg KG) oder Placebo behandelt. Die Imatinib-Behandlung der höchsten Dosis führt zu signifikant niedrigerem RVSP und RV/LV+S-Quotient, sowie geringerer Mediahypertrophie in der Imatinib-Gruppe verglichen zur Placebo-Gruppe [68].

Aufbauend auf den Ergebnissen der Studie von Schermuly et al. [68], wurde das Studiendesign in der vorliegenden Arbeit gewählt. Nach MCT-Injektion (NaCI in der Kontrollgruppe) läuft der Versuch sechs Wochen. In der fünften und sechsten Woche erhält die Placebo-Gruppe Methylcellulose als Placebo, die Imatinib-Gruppe 100 mg/kg Körpergewicht Imatinib in Methylcellulose gelöst. Nach 6 Wochen wurde der Versuch beendet, mittels Katheter die Hämodynamik gemessen, der RV/LV+S-Quotient bestimmt und die Organe entnommen.

Sechs Wochen nach MCT-Injektion zeigt sich in den Placebo-Tieren eine stark ausgeprägte PH. Der RVSP, rechtsventrikuläre enddiastolische Druck (RVEDP) und RV/LV+S-Quotient sind signifikant erhöht. In der Imatinib-Gruppe zeigt sich ein signifikant niedrigerer RVSP als in der Placebo-Gruppe. RVEDP und RV/LV+S-Quotient sind signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe, aber im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant niedriger.

Die MCT-Injektion hat in der Placebo-Gruppe eine stark ausgeprägte PH ausgelöst, die Imatinib-Behandlung hat das Ausmaß und Fortschreiten der Krankheit verringert. Diese Ergebnisse entsprechen den, in der Literatur beschriebenen Ergebnissen zum MCT-Modell und der Imatinib-Therapie in diesem Modell [68].

Das MCT-Modell wurde in dieser Arbeit gewählt, weil es unter den Tiermodellen der PH am besten die vaskulären Veränderungen der PAH abbildet. Das Remodeling in Form der Muskularisierung nicht-muskularisierter Arterien und der Mediahypertrophie, aber auch die Infiltration der Adventitia mit inflammatorischen Zellen, finden im MCT-Modell statt [138, 139]. Im Hypoxie-Modell sind diese PHtypischen Veränderungen schwächer ausgeprägt und es wird eher als Modell der Gruppe 3 der PH angesehen [135]. Die PAH-typischen plexiformen Läsionen und in situ Thrombosen treten im MCT-Modell, im Gegensatz zum Hypoxie und SU5416-Modell der Ratte allerdings nicht auf [145]. Im MCT-Modell sind die Remodeling-Prozesse nicht reversibel, wie es z.B. im Hypoxie-Modell der Fall ist. Das entspricht eher der Situation bei Patienten mit PH, bei denen die Krankheit immer progredient verläuft.

Im MCT-Modell ist die Wirksamkeit von Imatinib bereits beschrieben. Unter der Therapie kommt es zur Umkehr der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, was als *Re-Remodeling* bezeichnet wird [68]. Um diese Prozesse genauer untersuchen zu können, wird in der vorliegenden Arbeit das MCT-Modell verwendet, da es am deutlichsten die *Remodeling*-Prozesse abbildet, und deren Reversion unter ImatinibTherapie bereits gezeigt ist. Welche Veränderungen bei diesen Prozessen in der Lunge auf Proteinebene stattfinden, ist dabei Schwerpunkt dieser Arbeit.

Bisher zugelassene Therapien für PH wirken vor allem vasodilatatorisch. Da aber diese Therapien nicht ausreichen, um die Krankheit zu heilen oder den progressiven Verlauf zu stoppen, zielen neue Therapieansätze darauf ab, das *Remodeling* der Gefäße zu stoppen oder sogar umzukehren. Die Verwendung des Rezeptor-Tyrosinkinasen-Inhibitors Imatinib hat im Tiermodell und der klinischen Studie zu vielversprechenden Ergebnissen geführt [68, 128, 129]. Ein Kritikpunkt am MCT-Modell ist, dass sehr viele getestete Therapien die MCT-induzierte PH heilen, diese Medikamente aber im Menschen nicht wirken. Für Imatinib ist aber die Wirksamkeit auch in PAH-Patienten bereits beschrieben [128, 129].

Die Infiltration der Adventitia mit inflammatorischen Zellen ist im MCT-Modell bereits 8-16 Stunden nach MCT-Injektion beschrieben, aber nicht mehr 14 Tage nach Injektion [139]. Es ist nicht bekannt, ob diese frühen inflammatorischen Prozesse auch in PAH-Patienten stattfinden. In dieser Arbeit wurden die Tiere in den letzten beiden Versuchswochen, vier bis sechs Wochen nach MCT-Injektion, mittels Lysin-6-Futter markiert, um diese frühe inflammatorische Phase auszuschließen.

Alle drei Gruppen wurden ab einer Woche vor Versuchsbeginn nicht mehr *ad libitum* gefüttert. Die Futtermenge wurde mit 10 g/Tag/Tier begonnen und so angepasst, dass die Tiere während des Versuchs kontinuierlich Gewicht zunahmen. Bezüglich der Gewichtszunahme, über die Versuchszeit, besteht kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass alle Tiere eine vergleichbare Futtermenge zu sich genommen haben und damit eine vergleichbare Markierung mit ¹³C₆-Lysin möglich war.

4.2. *Pulsed*-SILAC Markierung

Mittels Massenspektrometrie lassen sich mehrere Hundert Proteine in Gewebe- und Zell-Lysaten identifizieren. Die metabolische Markierung mit Lysin, das mit schweren Kohlenstoffatomen (¹³C anstelle von ¹²C) markiert ist, ermöglicht darüber hinaus die Quantifizierung der Proteine [155-157]. Diese, als stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC) bezeichnete Methode wurde in der Zellkultur entwickelt, wird aber heute auch bei Pflanzen, Bakterien und Mäusen angewendet [158-160]. Da die komplette Markierung eines Modellorganismus, in dieser Arbeit der Ratte, allerdings zeit- und kostenintensiv ist, wurde die Methode der pulsed-SILAC-Markierung entwickelt. Verwendet wurde diese Methode bereits, um bei Molchen nach Schwanz-Amputation die synthetisierten Proteine in der neu Regenerationsphase zu markieren [162]. Die Methode der *pulsed*-SILAC-Markierung wird auch in der vorliegenden Arbeit angewendet, um die Ratten in den letzten beiden Versuchswochen, und damit der Endphase der Krankheit und auch der Therapie-Phase in der Imatinib-Gruppe, zu markieren.

Nach Beendigung des sechswöchigen Versuchs werden aus den Lungen der Ratten Proteine isoliert, 1D-Gel aufgetrennt Mittels im und verdaut. massenspektrometrischer Analyse werden die Proteine in den Proben identifiziert und der Anteil der ¹³C₆-Lysin markierten Proteine am Gesamtproteinanteil bestimmt. Der Quotient der Signalintensitäten der leichten und schweren Peptide gibt dabei die Abundanz der zugehörigen Proteine wieder [156]. Die Markierung der einzelnen Proteine liegt zwischen 5 und 93%, im Mittel sind in allen Gruppen 50% der Proteine markiert. Auf das gesamte Lungenproteom gesehen, zeigen sich aber keine Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass von einer gleichmäßigen Futteraufnahme und gleichmäßigem ¹³C₆-Lysin Einbau in die Proteine ausgegangen werden kann.

Die Inkorporation des ¹³C₆-Lysin in ein Protein hängt von der Synthese- und Abbaurate des Proteins ab. Der Quotient der schweren zu den leichten Peptiden bildet damit die Umsatzrate des Proteins ab. Die Umsatzrate wird bestimmt durch die Synthese- und Abbaurate eines Proteins, so dass sich nicht direkt auf die Rate der

Translation des Proteins schließen lässt. Ein hoher Quotient der schweren zu den leichten Peptiden kann sowohl Ergebnis einer hohen Translationsrate eines stabilen Proteins, als auch einer geringen Translationsrate eines schnell abgebauten Proteins sein [164]. In dieser Arbeit werden die Inkorporationen des schweren Lysins in die einzelnen Proteine zwischen den Gruppen verglichen. Das heißt, es werden nicht Gesamt-Proteinmengen, sondern die Umsatzraten der Proteine verglichen.

Die Genexpression in Zellen und Geweben wird bereits vielfach mit Hochdurchsatz-Methoden wie mRNA-Microarrays untersucht. Die Korrelation der mRNA- und Protein-Abundanz ist aber gering [172-174]. Viele regulatorische Prozesse kontrollieren die Translation von der mRNA zum Protein, strukturelle Eigenschaften der mRNA, Proteine und auch miRNAs sind unter anderem in diese Prozesse involviert [175].

Die technische Weiterentwicklung der Massenspektrometer ermöglicht heute die vergleichsweise schnelle und einfache Untersuchung des Proteoms. Die metabolische Markierung mit einem schweren Isotop erlaubt darüber hinaus die Quantifizierung der Proteine [176]. In dieser Arbeit wurde diese Hochdurchsatz-Methode gewählt, um nicht hypothesen-basiert das Lungenproteom im PH-Rattenmodell mit und ohne Therapie zu untersuchen.

4.3. GO-Term Annotationen

Um einen Überblick über Veränderungen in der Inkorporation des ¹³C₆-Lysins in das Lungenproteom der drei Gruppen zu bekommen, wurden *Gene Ontology* (GO)-Term Annotationen durchgeführt. Das GO-Projekt hat das Ziel, ein einheitliches Vokabular zur Beschreibung von Genprodukten in allen Organismen zur Verfügung zu stellen. GO besteht aus den drei hierarchisch strukturierten Ontologien: *biological process, cellular components* und *molecular functions*. Es gibt verschiedene Programme, mit denen die GO Datenbank gefiltert und durchsucht werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde die GOrilla Software [29] verwendet, um Anreicherungen in GO-Termen zu ermitteln. Dazu wurden die Mittelwerte der Inkorporation des ¹³C₆-Lysin, für jedes einzelne identifizierte Protein mittels t-Test verglichen. Die Listen für den Vergleich

Kontrolle *vs.* Placebo und Placebo *vs.* Imatinib wurden dazu nach den ermittelten p-Werten in aufsteigender Reihenfolge sortiert. Das heißt das Protein, dessen mittlere ¹³C₆-Lysin-Inkorporation im Gruppenvergleich den niedrigsten p-Wert aufweist, steht oben in der Liste. Diese sortierten Listen wurden in das Programm eingegeben und damit die im Ergebnisteil gezeigten GO-Term Veränderungen ermittelt. Zur Analyse wurden sortierte Listen der Gen-Namen verwendet, weil jedes Gen nur einen Namen, jedes Protein aber mehrere Namen haben kann, was die Zuordnung erschwert.

Anreicherungen in der Placebo-Gruppe

Für den GO-Term "zelluläre Komponenten" zeigen sich signifikante Veränderungen in den Termen *membrane*, *plasma membrane* und *plasma membrane part*. *Lamellipodium*, *vesicle*, *membrane-bounded vesicle* und *cytoplasmic vesicle* sind auch signifikant verändert.

In früheren Untersuchungen von Lungengewebe von PH-Patienten mittels Elektronenmikroskopie werden die vaskulären Zellen als vergrößert und reich an Vakuolen mit Endoplasmatischen Retikulum- und Golgi-Anteilen sowie Weibel-Palade-Körperchen beschrieben Dies weist auf Veränderungen des intrazellulären Transports hin [177-179]. Veränderungen der Membran sind bei PH vor allem in Endothelzellen untersucht, da in diesen nach heutigem Wissensstand die erste Schädigung stattfindet. Dieser Schädigung folgen dann die weiteren pathologischen Veränderungen der Media und Adventitia. In der aktualisierten Klassifikation der PH (Nizza 2013), ist zu den erblich bedingten PH-Formen die Caveolin-1-Mutation mitaufgenommen worden [5]. Caveolin-1 wird am stärksten in Endothelzellen exprimiert und ist Teil der Caveolea (Einstülpungen der Plasmamembran) [180]. Caveolin-1 reguliert den Gefäßtonus über die Interaktion mit der endothelialen NO-Synthase (eNOS) [181] und die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen über die Interaktion mit dem PDGF-Rezeptor [182]. Caveolin-1 ist nicht unter den signifikant veränderten Proteinen in der Analyse des Lungenproteoms der Ratten, allerdings ist die Endothelzell-Schädigung, zusammen mit dem Verlust der Caveolin-1-Expression,

im MCT-Rattenmodell 48 Stunden nach MCT-Injektion beschrieben. Zwei Wochen nach MCT-Injektion sind diese Unterschiede nicht mehr messbar [183].

Des Weiteren sind *cell junction*, *cell/cell junction* und *cell-cell adherens junction* signifikant verändert. *Cell junctions* sind Zellverbindungen zwischen Zellen des gleichen Zelltyps oder auch zwischen unterschiedlichen Zell-Typen, die dem Austausch kleiner Moleküle und Ionen dienen. Solche Zellverbindungen sind auch zwischen vaskulären Endothelzellen und glatten Muskelzellen beschrieben [184, 185] und könnten an der Weiterleitung der Depolarisierung durch Ionen zwischen den beiden Zelltypen in der PH-typischen Vasokonstriktion beteiligt sein [186]. Da Lungenhomogenat zur massenspektrometrischen Analyse verwendet wurde, lässt sich nicht sagen in welchen Zelltypen die genannten Veränderungen auftreten.

Bei der Analyse der GO-Terme der biologischen Prozesse zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontroll- und Placebo-Tieren in den Termen *biological adhesion* und *cell adhesion*. Unter den Genen in den Termen sind verschiedene Integrine und auch *platelet/endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1). Veränderungen der Integrine auf glatten Gefäßmuskelzellen sind sowohl im MCT- als auch im Hypoxie-Modell beschrieben [187]. Ein Verlust der PECAM-1-Expression geht im MCT-Rattenmodell mit dem frühen Endothelschaden und dem Verlust der Caveolin-1- und von-Willebrand-Faktor-Expression einher [183]. PECAM-1 interagiert außerdem mit verschiedenen Integrinen und reguliert darüber die Adhäsion inflammatorischer Zellen [188, 189].

Anreicherungen in der Imatinib-Gruppe

Nur in den GO-Termen der biologischen Prozesse werden mit dem gewählten *cutoff* signifikante Veränderungen, in der Imatinib-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe, gefunden. Die Terme *organic acid catabolic process* und *carboxylic acid catabolic process* zeigen signifikante Veränderungen. In beiden Termen sind die gleichen 16 Gene angereichert, es handelt sich dabei um Enzyme kataboler Stoffwechselprozesse, die kovalente Kohlenstoffverbindungen spalten.

Die Veränderungen des Lungenproteoms in der Imatinib-Gruppe, verglichen zur Placebo-Gruppe, sind wesentlich geringer als in der Placebo-Gruppe verglichen zur Kontroll-Gruppe. Mit dem gewählten *cutoff* sind keine GO-Terme signifikant verändert, die im Zusammenhang mit dem Rezeptor-Tyrosinkinasen-Inhibitor Imatinib beschrieben sind. Der sehr streng gewählte *cutoff* von p kleiner 0,001 für die Analyse der Veränderungen der GO-Terme, dient hauptsächlich einem ersten Überblick über die stärksten Veränderungen zwischen den Gruppen. Bei der Wahl eines etwas größeren p-Wertes würden mehr GO-Terme signifikante Veränderungen zeigen, die Menge der zu interpretierenden Daten würde aber den Umfang dieser Arbeit übersteigen.

Im nächsten Schritt wurden die Veränderungen der einzelnen Proteine betrachtet und diese in die GO-Terme eingeordnet, um Kandidaten für weitere Untersuchungen zu finden.

4.4. Auswahl der Kandidatenproteine

Nach der GO-Term Analyse wurde für den t-Test-Vergleich der Inkorporation in die einzelnen Proteine ein p-Wert *cutoff* von p kleiner 0,001 festgelegt, um eine überschaubare Anzahl hoch signifikant veränderter Proteine zu erhalten. Für den Vergleich Kontrolle *vs.* Placebo liegen 19 Proteine mit ihrem p-Wert unter dem *cutoff*. Beim Vergleich der Imatinib- zur Placebo-Gruppe sind 13 Proteine hoch signifikant verändert.

Nach Recherchen zu Funktionen der Proteine und ihrer Zuordnung in die signifikant veränderten GO-Terme, sowie nach Verfügbarkeit von Antikörpern wurden fünf Kandidaten ausgewählt. Diese fünf Kandidaten wurden im folgenden Teil der experimentellen Arbeit, mit Antikörper-basierten Methoden (Western Blot und Immunhistochemie) in den Rattenlungen nachgewiesen.

Die Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt diskutiert und in den Kontext des momentanen Wissensstandes über diese Proteine gesetzt.

4.4.1. Dysferlin

Dystrophy-associated fer-1-like protein (Dysferlin) ist ein 230 kDa großes, transmembranes Protein der Ferlin-Proteinfamilie. Mutationen im Dysferlin-Gen verursachen drei verschiedene Muskeldystrophien: Gliedergürteldystrophie (*limb-girdle muscular dystrophy type 2B*; LGMD2B) [190], Myoshi-Myopathie [191] und eine Muskeldystrophie der distalen anterioren Kompartimente [192].

In Muskelzellen befindet sich Dysferlin im Sarkolemm und ist involviert in Membran-Reparaturprozesse. Nach Beschädigung durch mechanischen Stress kommt es in Muskelzellen zum Ca²⁺-Einstrom, was zur Aggregation intrazellulärer Vesikel, wie Lysosomen, führt. Diese vereinigen sich mit dem Sarkolemm, um weitere Zellschädigungen zu verhindern. Dysferlin ist in diesen Prozess involviert und interagiert dabei mit Annexin A1 und A2 [193]. Mutationen im Dysferlin-Gen führen zu einer Störung der Reparaturprozesse und damit der Dystrophie der Muskeln. Anhand von *Knockout*-Studien in Mäusen konnte außerdem die Beteiligung von Dysferlin an Membran-Reparaturprozessen in Kardiomyozyten und stress-induzierter Kardiomyopathie gezeigt werden [194]. Auch in Patienten mit LGMD2B aufgrund von Dysferlin-Mutationen sind stress-induzierte Kardiomyopathien beschrieben [195].

Außerdem beschrieben, ist eine verringerte Dysferlin-Expression in Synzytiotrophoblasten bei Patientinnen mit Präeklampsie [196], eine Akkumulation von Dysferlin mit neuritischen Plaques in Alzheimer [197] und eine Assoziation der Dysferlin-Expression in Endothelzellen mit Störungen der Blut-Hirn-Schranke bei Multipler Sklerose [198]. Dysferlin wird also nicht ausschließlich in Muskelzellen exprimiert und scheint außerdem bei Krankheiten involviert zu sein, bei denen Membran-Reparaturmechanismen anderer Zellen gestört sind.

Darüber hinaus ist die Expression von Dysferlin in der Intima, Media und Adventitia der Maus-Aorta und oberflächlichen Femoralarterie, sowie humanen Koronararterien beschrieben. Sharma *et al.* zeigen, dass Dysferlin-null Mäuse eine beeinträchtigte Angiogenese aufweisen und die Adhäsion und Proliferation von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) nach *siRNA-knockdown* von Dysferlin beeinträchtigt ist, was zu einer verringerten PECAM-1 Expression führt [199].

Dysferlin ist in den signifikant veränderten GO-Termen *plasma membrane/part, lamellipodium, cytoplasmic vesicle, vesicle* und *cell projection* enthalten. Wie oben beschrieben, ist Dysferlin an Membran-Reparaturprozessen, der Lysosom-Aggregation und auch PECAM-1 Expression beteiligt (GO-Terme *biological adhesion/cell adhesion*). Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe ist die ¹³C₆-Lysin Inkorporation in Dysferlin signifikant erhöht in der Placebo-Gruppe. Mittels Western Blot lässt sich Dysferlin im Lungenhomogenat der Ratten nachweisen, hier zeigt sich allerdings nur ein Trend zu einer höheren Dysferlin-Expression in der Placebo-Gruppe wird signifikant weniger Dysferlin exprimiert als in der Placebo-Gruppe. Die immunhistochemischen Färbungen von Lungen gesunder und MCT-behandelter Ratten zeigen, dass Dysferlin in gesunden Tieren in den kleinen Gefäßen des *vasa vasorum* größerer Gefäßen, als auch in den kleinen Gefäßen des *vasa vasorum* eine positive Färbung.

Dysferlin ist bisher nicht in Erkrankungen der Lunge oder den Gefäßen der Lunge beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird Dysferlin mittels Massenspektrometrie und Western Blot im Lungengewebe von Ratten nachgewiesen. Sowohl in gesunden, als auch MCT-behandelten Ratten wird Dysferlin exprimiert, und anhand der Ergebnisse der Färbungen kann die Expression in den Gefäßen der Lunge gezeigt werden. Die erhöhte Expression im MCT-Modell lässt vermuten, dass Dysferlin in diesem PH-Modell eine Rolle spielt. Der in der PH beschriebene vaskuläre Gefäßumbau führt zu einer Verringerung des Gefäßlumens und Scherstress. Dies könnte zu mechanischen Verletzungen der Endothelzellen der Gefäße führen. Die gut beschrieben Rolle von Dysferlin bei Membran-Reparaturprozessen wäre auch hier denkbar. Darüber hinaus beschriebene Funktionen von Dysferlin, in der Endothelzell-Adhäsion und Proliferation, könnten in unserem Tiermodell allerdings auch eine Rolle spielen.

Welche Funktion Dysferlin im PAH-Rattenmodell hat, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht beantworten. Diese liefern lediglich den Hinweis das dieses, bisher in der PAH nicht beschriebene Protein beim vaskulären Gefäßumbau eine Rolle spielt. Die signifikant verringerte Dysferlin-Expression in der Imatinib-Gruppe weist darauf hin, dass Dysferlin an *Remodeling*-Prozessen beteiligt ist, die unter

Imatinib-Therapie schwächer ausgeprägt sind als in der Placebo-Gruppe. Dysferlin stellt damit einen interessanten Kandidaten dar, der in weiteren Experimenten zur Rolle im vaskulären Gefäßumbau der PAH untersucht werden sollte.

4.4.2. Emilin-1

Elastin microfibril interface-located protein 1 (Emilin-1) ist ein sekretiertes Glykoprotein, das in der extrazellulären Matrix mit elastischen Fasern assoziiert ist und vor allem in Blutgefäßen, Haut, Herz, Lunge, Nieren und der Hornhaut exprimiert wird [200-202]. Emilin-1 gehört zur Emilin/Multimerin-Proteinfamilie, die durch eine N-terminale EMI-Domäne und eine gC1q-Domäne charakterisiert ist. Außerdem gehören Emilin-2, Multimerin-1 und Multimerin-2 zu dieser Familie [203-205].

Emilin-1 ist an der Elastin-Anordnung beteiligt und zwischen amorphem Elastin und Mikrofibrillen lokalisiert [206]. Homozygote Emilin-1 Knockout-Mäuse entwickeln sich normal und zeigen eine normale Lebensdauer. Allerdings zeigen sich in den Tieren Veränderungen in der Struktur elastischer Fasern und der Zell-Morphologie in den Arterien. Emilin-1 scheint die homogene Anordnung der elastischen Fasern zu unterstützen, sowie die Verbindung der vaskulären Zellen mit den elastischen Fasern. In den Knockout-Mäusen finden sich Endothel- und glatte Muskelzellen in den Arterien, die scheinbar den Kontakt mit den elastischen Fasern verloren haben. Diese Zellen weisen morphologische Veränderungen wie vergrößerte endoplasmatische Retikula und Mitochondrien, sowie Zellkerne mit kondensiertem Chromatin auf [207]. Des Weiteren interagiert Emilin-1 mit α 4 β 1-Integrin und reguliert darüber Zelladhäsion und -migration [208, 2091. Eine Studie zu Matrixmetalloproteinasen (MMPs) in humanen Gefäßen identifizierte Emilin-1 als Substrat von MMP-3, -9, und -14 [210].

Außerdem reguliert Emilin-1 die TGF-β-Aktivität über die Interaktion mit proTGF-β. Emilin-1 verhindert die Spaltung des proTGF-β durch Proprotein-Konvertasen in der Extrazellulärmatrix und reguliert damit die Verfügbarkeit von TGF-β. Der *Knockout* von Emilin-1 führt in Mäusen zu erhöhtem Blutdruck, erhöhtem peripheren

90

vaskulären Widerstand und einem verringerten Gefäßdurchmesser bei Gefäßen des Mesenteriums und der Aorta [211].

In einer Kohorte japanischer Patienten mit arterieller Hypertonie konnte ein Zusammenhang zwischen drei verschiedenen *small-nucleotide polymorphisms* (SNPs) und dem Auftreten der Hypertonie bei Männern gefunden werden [212]. In einer Meta-Analyse mehrerer Studien konnten zwei SNPs bestätigt werden [213].

Emilin-1 ist in dem signifikant veränderten GO-Term *cell adhesion* vorhanden, aufgrund der oben beschriebenen Interaktion mit dem $\alpha 4\beta$ 1-Integrin und den elastischen Fasern der extrazellulären Matrix. Bei der ¹³C₆-Lysin-Inkorporation zeigt sich eine signifikant erhöhte Inkorporation in der Placebo-Gruppe, verglichen zur Kontroll-Gruppe, und eine signifikant verringerte Inkorporation in der Imatinib-verglichen zur Placebo-Gruppe. Die immunhistochemischen Färbungen von Lungengewebe gesunder und MCT-Ratten zeigen eine schwache Färbung des Gewebes in den Kontroll-Tieren. In den Lungen der MCT-Tiere zeigt sich eine starke Färbung der Intima der größeren Arterien, aber auch der kleinen Gefäße des *vasa vasorum*.

Die Ergebnisse des Western Blots widersprechen den Ergebnissen des SILAC-Versuchs und den Färbungen. Allerdings kann von der erhöhten Umsatzrate von Emilin-1 im SILAC-Versuch nicht direkt auf eine höhere Gesamtmenge des Proteins geschlossen werden. Die Färbungen lassen aber eine erhöhte Expression im Gewebe vermuten, auch wenn diese nicht quantitativ ausgewertet ist. Kritisch anzumerken ist hier, dass Emilin-1 in der Ratte lediglich vorhergesagt ist aufgrund des Sequenzabgleiches mit Maus und Mensch, bei denen das Protein bereits nachgewiesen ist. Laut der Vorhersage ist das Protein Emilin-1 bei der Ratte (Rattus norwegicus) 900 Aminosäuren (AS) lang und damit kleiner als bei Maus (1017 AS) und Mensch (1016 AS). Antikörper verschiedener Firmen gehen im Western Blot Bindungen mit Banden unterschiedlicher Höhen ein und sind damit wenig zuverlässig. Natürlich lässt dies auch die Ergebnisse der Färbungen anzweifeln, auch wenn diese mit verschiedenen Antikörpern konsistent waren. Keiner der verwendeten Antikörper wurde von der jeweiligen Firma im Rattengewebe getestet. Die Identifikation von Emilin-1 mittels Massenspektrometrie ist in diesem Fall als die verlässlichste Methode anzusehen. Auch wenn hier noch die Unsicherheit besteht,

dass das Protein bisher in der Ratte nicht nachgewiesen ist und die Identifizierung mittels Datenbankabfrage stattfand, die sich in diesem Fall auf den DNA-Sequenzabgleich mit Mensch und Maus bezieht. Die Ergebnisse geben dennoch einen klaren Hinweis darauf, dass Emilin-1 im MCT-Modell eine Rolle spielt. Aufgrund der Probleme mit den Antikörpern ist es für diesen Kandidaten sinnvoller, eine weitere Bestätigung im Tiermodell zu überspringen und auf die Expression in humanem Gewebe, von gesunden und PAH-Patienten, zu untersuchen.

4.4.3. HIP1

Huntingtin-interacting protein 1 (HIP1) ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das am stärksten im Gehirn exprimiert wird. HIP1 ist benannt nach seiner Entdeckung als Interaktionspartner des Proteins Huntingtin, Mutationen im Huntingtin-Gen lösen die Erbkrankheit Chorea Huntington aus [214, 215]. HIP1 bindet Clathrin, *clathrin adaptor protein 2* (AP2) und Aktin, und ist an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt [216, 217]. Ein HIP1-*Knockout* in Mäusen führt zu degenerativen Veränderungen wie testikulärer Degeneration, spinalen Defekten, Gewichtsverlust und Katarakte [218].

Eine chromosomale Translokation, die zu einem HIP1/platelet-derived growth factor β receptor (PDGF β R)-Fusionsprotein führt, das eine chronische myelomonozytische Leukämie verursacht, ist bekannt [219]. HIP1 wird in vielen epithelialen Tumorzelllinien exprimiert, aber nicht in den gesunden Epithelzellen. Außerdem wird HIP1 in Prostata- und Kolon-Tumoren verstärkt exprimiert, und die Expression korreliert mit einer aggressiven Pathologie und dem Wiederauftreten der Erkrankung bei Prostatakrebs-Patienten [220]. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von HIP1 zum Recycling des *epidermal-growth-factor receptor* (EGFR) und *fibroblast-growth-factor receptor* (FGFR) zur Zelloberfläche führt. Dies löst eine Hypersensitivität der Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren aus, eine Transformation der Zellen, sowie die Tumorentstehung in athymischen Nacktmäusen [221]. In Hormon-sensitiven Tumorzell-Linien interagiert HIP1 mit dem Androgen-Rezeptor, was zur Translokation in den Nukleus führt. Hier agiert HIP1 als Coaktivator der Androgen-Rezeptor-Transkription [222]. Außerdem interagiert HIP1

mit Phosphatidylinositol-3,4- und -3,5-bisphosphat, die in intrazellulären Vesikeln lokalisiert sind [223] und wird von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) phosphoryliert [224]. Die Funktionen von HIP1 bei Chorea Huntington und den beschriebenen Prozessen der Endozytose, dem RTK-Recycling und der Tumorentstehung sind jedoch bisher nicht hinreichend geklärt.

HIP1 ist in den signifikant veränderten GO-Termen *vesicle, membrane-bounded vesicle* und *cytosolic vesicle,* sowie *cytoskeletal binding* und *actin binding* (nach Korrektur für multiples Testen allerdings nicht mehr p<0,001) enthalten. Bei dem SILAC-Versuch ist die Inkorporation des ¹³C₆-Lysin in HIP1 signifikant erhöht in der Placebo-Gruppe verglichen zur Kontroll-Gruppe. Bezüglich der ¹³C₆-Lysin-Inkorporation zeigt die Imatinib-Gruppe zeigt keinen Unterschied zu den anderen beiden Gruppen.

Im Western Blot zeigen sich signifikant verringerte HIP1-Expressionen in den Lungen der Placebo- und Imatinib-Tiere, was den Ergebnissen aus dem SILAC-Versuch widerspricht. Mittels immunhistochemischer Färbungen lässt sich HIP1 in kleineren Gefäßen der Lunge, in den Kontroll-Tieren, lokalisieren. In den MCT-Ratten zeigt sich eine starke Färbung der hypertrophierten Media großer und kleiner Gefäße der Lunge. Diese Ergebnisse würden eine erhöhte Expression von HIP1 nach MCT-Behandlung vermuten lassen, die sich aber im Western Blot nicht zeigt.

Die oben zusammengefasste Literatur gibt Hinweise darauf, dass HIP1 auch beim *Remodeling* der PH eine Rolle spielen könnte. Ein Tumorzell-ähnliches Überleben und Proliferieren der vaskulären Zellen wird auch in der PH diskutiert [225]. Auch aufgrund des in der Einleitung erwähnten Warburg Effekts, der ursprünglich in Tumorzellen beschrieben ist [72, 73]. Ein Zusammenhang mit Wachstumsfaktoren, speziell dem PDGF, ist gezeigt [66, 67] und Imatinib wirkt als Tyrosin-Kinasen-Inhibitor auch auf den PDGF-Rezeptor [68]. Wie auch schon für Emilin-1 diskutiert, ist die Identifizierung von HIP1 mittels Massenspektrometrie zuverlässiger als die Antikörper-basierten Methoden. Die erhöhte Inkorporation des schweren Lysins in HIP1 muss aber nicht gleichbedeutend sein mit einer erhöhten HIP1-Konzentration in der Lunge. Lediglich die Umbaurate des Proteins ist erhöht.

4.4.4. Septin-7

Septine sind zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben, wo sie bei der Zellteilung am Septum der Mutter- und Tochterzelle lokalisiert sind und deshalb Septine genannt werden [226]. Beim Menschen sind 13 verschiedene Septine beschrieben, die gewebespezifisch oder ubiquitär exprimiert werden [227]. Septine interagieren mit Aktin und Mikrotubuli des Zytoskeletts, aber auch mit Membranen [228]. Die Depletion von Septinen mittels siRNA führt zu Störungen der Mitose in der Metaphase, es kommt zu Defekten in der Ausrichtung der Spindelfasern und dem Verlust der Chromosomen in der Metaphaseplatte [229]. Außerdem sind Septine an der Ciliogenese und Neurogenese beteiligt und sind als Teil des Zytoskeletts in die Kompartimentalisierung der Zellen und Rekrutierung anderer Proteine in die Kompartimemente beteiligt.

Septine gehören zur Familie der GTPasen, wie genau die GTP-Bindung und -Hydrolysierung ablaufen, ist aber nicht geklärt [228]. Außerdem spielen sie eine Rolle bei bakteriellen Infektionen und dem angeborenen Immunsystem [230].

Septin-7 (CDC10) wird ubiquitär exprimiert und hat Funktionen bei der Aktomyosin-Dynamik bei der Migration von Endothelzellen [231], dem Glukose-Transport in Podozyten [232], der Assoziation von Axonen und Schwann-Zellen [233], der Chromosomen-Segregation [229], der Mitose [234], der Meiose von Maus-Oozyten [235], der Dendriten-Entwicklung [236] sowie der Mikrotubuli-Regulation [237]. Weiterhin ist Septin-7 mit Alzheimer [238], Tumoren des zentralen Nervensystems (Gliome) [239], Down-Syndrom [240] und Infertilität [241] assoziiert. Ein *Knockout* von Septin-7 in Mäusen ist während der Embryonalphase letal [230].

Septin-7 ist in dem signifikant veränderten GO-Term *plasma membrane* enthalten. Die massenspektrometrische Analyse der Lungenhomogenate zeigt eine erhöhte ¹³C₆-Lysin Inkorporation in der Placebo-Gruppe, verglichen zur Kontroll-Gruppe. Mittels Western Blot lassen sich keine Unterschiede in der Septin-7 Expression zwischen den Gruppen feststellen. Die Färbungen von Lungengewebe gesunder Ratten mit einem Anti-Septin-7 Antikörper zeigen eine positive Färbung der Gefäße.
In den Lungen der MCT-Ratten sind sowohl die Gefäße, als auch weitere Zellen der Lunge positiv gefärbt.

Mit Blick auf die PH sind von den oben genannten Studien vor allem die zur Mitose, Endothelzell-Migration und der Gliom-Entstehung interessant. In primären kardialen Maus-Endothelzellen führt der *Knock-down* von Septin-7 zu Veränderungen des perinukleären Aktomyosins und damit erhöhter Migration der Zellen [231]. In einer humanen Glioblastoma-Zelllinie führt eine Septin-7 Überexpression zur Inhibierung der Zell-Proliferation und Zellzyklus-Arrest [38].

Die mittels Massenspektrometrie gemessene erhöhte Umsatzrate von Septin-7 in der Placebo-Gruppe könnte also auf eine Rolle des Septin-7 in der Zell-Migration und – Proliferation bei PH hinweisen. Ob Septin-7 dabei allerdings nur ein Marker dieser Prozesse oder maßgeblich daran beteiligt ist, lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen nicht sagen.

4.4.5. Villin

Villin (auch Villin-1, wobei Villin-2 bis -4 nur in Arabidopsis thaliana beschrieben sind) ist ein Epithelzell-spezifisches Protein, das an der apikalen Membran der Zellen lokalisiert ist, wo es Aktin bindet und modifiziert. Die Aktin-Modifikationen sind vielfältig. Villin kann Aktin durch verschiedene Mechanismen sowohl polymerisieren, als auch abbauen [242]. Die Bindung von Villin und Aktin ist Ca²⁺-abhängig und die Verbindung von Villin und filamentösem Aktin wird durch Tyrosin-Phosphorylierung von Villin reguliert. Die Tyrosin-Phosphorylierung verringert die Bindung zu Aktin-Filamenten, verhindert die Polymerisierung und fördert die Aktin-Depolymerisierung Aminosäuresequenz Villin sind [243]. In der von zehn Tyrosin-Phosphorylierungstellen identifiziert, und die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase c-src reguliert die Phosphorylierungen in vitro und in vivo [244, 245]. Auch die Ca²⁺-Aktin-Modifikation Konzentration bestimmt die durch Villin, sehr hohe Konzentrationen fördern den Aktin-Abbau [246, 247]. Außerdem kann Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat die Aktin-Modifikationen durch eine Interaktion mit Villin regulieren [248] und phosphoryliertes Villin interagiert mit Phospholipase Cy₁ [249]. Diese vielfältigen Funktionen von Villin in der Aktin-Dynamik führen dazu, dass Villin viele Funktionen bei der Zell-Morphologie, Zell-Motilität, Signaltransduktion, Apoptose und dem Übergang von Epithel- zu mesenchymalen Zellen hat [245].

Die meisten Veröffentlichungen zu Villin befassen sich mit gastrointestinalen und renalen Epithelzellen, in denen Villin das einzige Aktin-bindende Protein in den ist. Villin-Knockout Mikrovilli Mäuse zeigen keinen Phänotyp. ledialich ultrastrukturelle Unterschiede im Aufbau des Aktins in den Mikrovilli sind beschrieben. Die Aktin-Filamente sind nicht so gleichmäßig organisiert und eng gepackt wie bei Wildtyp-Mäusen [250]. Und die durch Ca2+ hervorgerufene Unterbrechung der Bürstensaum-Membran durch den Umbau filamentösen Aktins durch Villin bleibt in den Knockout-Mäusen aus [251]. Außerdem zeigen die Knockout-Mäuse eine höhere Anfälligkeit für Natrium-Dextransulfat induzierte Kolitis aufgrund einer erhöhten Apoptose-Rate der Zellen [252].

In Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und chronischer Pankreatitis ist eine verringerte Villin-Expression in den Enterozyten beschrieben [253, 254]. Bei Patienten mit Kolon-Karzinom sind erhöhte Auto-Antikörper Konzentrationen im Serum der Patienten dokumentiert [255] und eine erhöhte Villin-Expression ist bei Patienten mit Leberzellkarzinom mit dem Wiederauftreten der Erkrankung assoziiert [256]. Auch in der Lunge ist Villin im Zusammenhang mit neuroendokrinen Karzinomen beschrieben. In großzelligen Karzinomen ist die Villin-Expression höher als in kleinzelligen Karzinomen [257].

In dieser Arbeit ist in der Placebo-Gruppe der Anteil an ¹³C₆-Lysin markierten Villin am Gesamt-Villin signifikant verringert, verglichen zur Kontroll-Gruppe. Mittels Western Blot lässt sich dieses Ergebnis bestätigen, in der Placebo-Gruppe wird signifikant weniger Villin exprimiert als in der Kontroll-Gruppe. In der Imatinib-Gruppe steigt die Expression signifikant an, ist aber geringer als in der Kontroll-Gruppe.

Mittels immunhistochemischer Färbungen lässt sich Villin in Zellen des Lungengewebes von gesunden und MCT-Ratten nachweisen. Eine geringe Anzahl der Zellen des alveolären Epithels scheint Villin zu exprimieren. In den verschiedenen Zellen der Bronchien und Gefäße der Lunge ist keine Villin-Expression nachweisbar.

Villin ist in den GO-Termen der biologischen Prozesse *cytoskeletal protein binding* und *actin binding* enthalten, die aber nach der Korrektur für multiples Testen keinen p-Wert kleiner 0,001 aufweisen. Bei den GO-Termen der zellulären Komponenten ist Villin in den Termen *lamellipodium, vesicle* und *membrane-bounded vesicle* enthalten.

In der PH-Forschung werden hauptsächlich die Blutgefäße untersucht, da sich hier histologisch das *Remodeling* manifestiert. Zu den Veränderungen der Epithelzellen/Pneumozyten der Alveolen gibt es wenig Literatur. Im MCT-Modell sind Veränderungen der Pneumozyten Typ II beschrieben. Die Zellen und auch die Zellkerne sind vergrößert, es zeigen sich vergrößerte Surfactant-Granula und die Anzahl der Typ II Zellen nimmt vom 8. Bis 21. Tag nach MCT-Injektion ab [258, 259].

Villin wird vor allem in Epithelzellen mit Mikrovilli exprimiert. Es sind sogenannte *brush/tuft cells* beschrieben, die in der Lunge auch als Pneumozyten Typ III bezeichnet werden. Die Funktion dieser Zellen ist nicht bekannt [260]. Diese Zellen sind im Epithel der Atemwege beschrieben, bei der Ratte auch in den Alveolarwänden [261, 262]. Beim Menschen sind diese Zellen in den Alveolarwänden nur unter pathologischen Bedingungen wie interstitieller Pneumonie und primärer ziliärer Dyskinesie beschrieben [263, 264]. Als Marker dieser Zellen werden die Ko-Lokalisierung von Cytokeratin 18 und Villin [265, 266], oder Villin und Fimbrin angesehen [266].

Welche Rolle Villin in dem MCT-Modell dieser Arbeit spielt, lässt sich mit den bisherigen Ergebnissen nicht sagen. Aufgrund der Daten zu Pneumozyten-Veränderungen im MCT-Modell, könnte dieser Effekt auch auf das MCT zurückzuführen sein und muss nicht mit der humanen PH zusammenhängen. Die Beschreibungen der *brush/tuft cells* stammen vor allem aus Ratten, so dass der gemessene Effekt auch Spezies-spezifisch sein kann. Bevor also die Rolle von Villin bei der humanen PH weiter untersucht wird, sollte das Protein erst in humanem Lungengewebe nachgewiesen werden (gesund und PH) und die Villin-exprimierenden Zellen identifiziert werden.

97

4.5. Vergleich mit anderen Lungenproteom-Analysen

Es gibt bereits Untersuchungen aus anderen Arbeitsgruppen zum Lungenproteom im PH-Tiermodell und PAH-Patienten. Laudi et al. haben das Lungenproteom gesunder Ratten mit dem von Ratten mit MCT- oder Hypoxie-induzierter PH verglichen. Die Lungenhomogenate wurden im 2D-Gel aufgetrennt, die Gele gefärbt, eingescannt und mittels Software die Protein-Spots verglichen. Die Spots bei denen sich densitometrisch signifikante Unterschiede zeigten wurden ausgeschnitten, verdaut und die Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse identifiziert. Für den Vergleich der Kontroll- zur MCT-Gruppe konnten so neun signifikant veränderte Proteine identifiziert werden [267]. Diese neun Proteine sind nicht unter den signifikant veränderten Proteinen dieser Arbeit. Allerdings ist auch ein Septin, Septin-2, signifikant hoch reguliert in der MCT-Gruppe [267]. Die Herangehensweise in der Studie von Laudi et al. ist anders als in dieser Arbeit. Durch die densitometrische Analyse der 2D-Gele und der Spotauswahl vor der Identifizierung der Proteine im Massenspektrometer wird nicht das gesamte Lungenproteom betrachtet und die Vorauswahl der Spots beeinflusst die Ergebnisse. Es ist möglich, dass nicht jeder Spot im 2D-Gel nur ein Protein repräsentiert. Durch posttranslationale Modifikationen kann ein Protein in mehreren Spots zu finden sein und es können auch mehrere Proteine in einem Spot vertreten sein. In dieser Arbeit sind ca. 4500 Proteine identifiziert worden, mittels t-Test wurden ca. 3650 Proteine verglichen. Es fand keine absolute Quantifizierung statt, aber über die Inkorporation des ¹³C₆-Lysins in die Proteine lässt sich auf eine erhöhte bzw. verringerte Umsatzrate des Proteins schließen [164]. Auch in der Studie von Laudi et al. wurden die mittels 2D-Gel und Massenspektrometrie gefundenen, veränderten Proteine mit einer zweiten Methode, mittels Western Blot, bestätigt [267].

Abdul-Salam *et al.* haben Lungengewebe von PAH-Patienten mit dem von gesunden Donoren verglichen. Es wurde ebenfalls Lungenhomogenat verwendet, das in einer SDS-PAGE aufgetrennt wurde. Die Proteinbanden wurden im Gel verdaut und die Proteine, ohne Verwendung einer Markierung, mittels Flüssigkeitschromatographie und Tandem-MS identifiziert und quantifiziert. In den Lungen der PAH-Patienten konnten 362 Proteine identifiziert werden, davon sind 25 signifikant verändert im Vergleich zu den gesunden Donoren. Für die Bestätigung mit einer zweiten Methode haben die Autoren auch Western Blots und immunhistochemischen Färbungen angewendet [268]. Die ausgewählten Kandidaten sind nicht unter den in dieser Arbeit gefundenen signifikant veränderten Proteinen (*cutoff* p<0,001). Das *chloride intracellular channel protein 4* (CLIC4) [268] ist allerdings auch in dieser Arbeit in den MCT-Ratten hoch reguliert (p<0,05, siehe Tabelle 8 im Anhang).

Im Vergleich zu den beiden zitierten Studien ist es in dieser Arbeit gelungen einen größeren Überblick über das Lungenproteom zu bekommen. Es sind ca. 4500 Proteine identifiziert worden und dieser große Datensatz ermöglicht eine GO-Term Analyse um einen Überblick über signifikant veränderte Prozesse, Funktionen und Zellkompartimente zu bekommen. Bei einer Veränderung des *cutoffs* für den p-Wert würden sicherlich auch weitere, bisher aus anderen Studien veröffentlichte, Proteine auftauchen.

4.6. Fazit und Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit mittels *pulsed*-SILAC Markierung identifizierten fünf Kandidaten sind auch mit antikörper-basierten Methoden in den Ratten-Lungen nachweisbar. Für Dysferlin und Villin zeigen sich die gleichen Veränderungen im Western Blot wie in der massenspektrometrischen Analyse. Emilin-1, HIP1 und Septin-7 sind in den Lungen nachweisbar, die Quantifizierung der Western Blots gibt allerdings nicht die Ergebnisse der massenspektrometrischen Messung wieder. Allerdings kann auch von einer veränderten Inkorporation des ¹³C₆-Lysins in die Proteine nicht direkt auf die Veränderung der Gesamtmenge der Proteine geschlossen werden. Es können sich auch nur die Umsatzraten geändert haben. Aber auch die Änderung der Umsatzraten mit dem positiven Nachweis der Proteine in den Lungen, gibt einen klaren Hinweis auf deren Rolle in dem gewählten MCT-Modell. Die Identifizierung der Proteine und die Messung der metabolischen Inkorporation von ¹³C₆-Lysin mittels Massenspektrometer ist zuverlässiger als der Nachweis mit Antikörpern. Die Färbungen sind nicht quantitativ ausgewertet und der Nachweis mittels Western Blot ist als bedingt quantitativ anzusehen. Dennoch sind

diese Nachweise für das weitere Vorgehen wichtig. Mit Hilfe der Färbungen sind die Proteine in den Gefäßen der Lungen nachgewiesen, was für die Entscheidung für weitere Untersuchungen *in vitro* für die Wahl des Zelltyps von Bedeutung ist.

Mit dem in dieser Arbeit gewählten nicht-hypothesengelenkten Ansatz sind bisher in der PH nicht beschriebene Proteine identifiziert worden. Die bisher veröffentlichte Literatur gibt für jedes Protein plausible Hinweise auf die Rolle der Proteine in der PH. Mit den nun generierten Hypothesen zu den Kandidaten lassen sich jetzt die weiteren Untersuchungen planen.

Besonders der Schritt aus dem Tiermodell, in die humane Situation, ist im weiteren Vorgehen wichtig um auszuschließen, dass die gemessenen Effekte lediglich in der Ratte oder dem MCT-Modell eine Rolle spielen, nicht aber in der humanen PH. Die Kandidaten sollten im gesunden Lungengewebe und den Lungen von PH-Patienten nachgewiesen und die Expression quantifiziert und lokalisiert werden. Daran können sich dann funktionelle Untersuchungen anschließen, die wiederum im Tiermodell oder *in vitro* stattfinden können.

Die fünf identifizierten Kandidaten haben vielfältige Funktionen und könnten alle eine Rolle in der PH spielen, die aber noch bestätigt werden muss.

Außerdem ist es sinnvoll, die bisher gewählten *cutoffs* der p-Werte für die Analysen noch zu verändern. Damit wird die Anzahl veränderter GO-Terme und einzelner Proteine stark erhöht, aber das Blickfeld auch erweitert, und es zeigen sich noch weitere potentiell wichtige Prozesse und Proteine, die bisher nicht betrachtet wurden. Besonders für den Vergleich der Imatinib- zur Placebo-Gruppe sind noch weitere als die bisher betrachteten Stoffwechsel-Veränderungen zu erwarten.

5. Zusammenfassung

Pulmonale Hypertonie (PH) ist eine progressive verlaufende Erkrankung, die durch einen erhöhten pulmonalarteriellen Druck charakterisiert ist. In den Pulmonalarterien kommt es zur Vasokonstriktion und zu Umbauprozessen der Gefäßwände, dem sogenannten *Remodeling*. Diese Prozesse führen zur Verringerung des Gefäßlumens und zusammen mit der Vasokonstriktion zur progressiven Zunahme des pulmonalvaskulären Widerstandes. Der rechte Ventrikel kann diese gesteigerte Nachlast zunächst kompensieren, im Verlauf der Erkrankung kommt es aber zum Rechtsherzversagen.

Es sind viele Signalwege bekannt, die in der PH eine Rolle spielen, dennoch ist diese Erkrankung bis heute nicht heilbar. Bisher zugelassene Therapien führen zur Vasodilatation und verringern darüber die Nachlast auf den rechten Ventrikel. Neue Therapieansätze zielen darauf ab, das *Remodeling* aufzuhalten oder sogar umzukehren (*reverse Remodeling*). Der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib hat hierbei gute Erfolge im Tiermodell und klinischen Studien gezeigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-hypothesengelenkter Ansatz gewählt, um neue, bisher nicht beschriebene Signalwege der PH zu identifizieren. Es wurde das Rattenmodell der Monocrotalin (MCT)-induzierten PH verwendet, das gut die *Remodeling*-Prozesse der humanen PH abbildet und in dem die Wirksamkeit von Imatinib beim *reverse Remodeling* bereits gezeigt ist. Um die Veränderungen im Lungen-Proteom der Ratten untersuchen zu können, wurden die Tiere mit stabilen Isotopen markiert (*stable isotope labeling of amino acids in cell culture*, SILAC). Die Tiere wurden mit SILAC-Futter gefüttert, das schweres ¹³C₆-Lysin enthält, in dem jedes ¹²C-Atom durch das stabile aber schwerere Isotop ¹³C ersetzt wurde. Die spezifische Massendifferenz zwischen dem schweren und dem leichten Lysin ermöglicht die Quantifizierung der im Massenspektrometer identifizierten Proteine. Die drei Gruppen Kontrolle, MCT/Placebo und MCT/Imatinib wurden für zwei Wochen mit dem SILAC-Futter gefüttert. Die Listen der identifizierten Proteine mit den ¹³C₆-Lysin Einbauraten wurden mittels t-Test verglichen und eine Analyse zur Veränderung von GO-Termen durchgeführt.

Bei den GO-Termen zeigen sich strukturelle Veränderungen der Zellkompartimente Membran, Vesikel und Zellverbindung, sowie Veränderungen bei Prozessen der Zelladhäsion für den Vergleich der Placebo- zur Kontroll-Gruppe. Beim Vergleich der Imatinib- zur Placebo-Gruppe sind katabole Stoffwechselprozesse hoch signifikant verändert.

Der Vergleich der ¹³C₆-Lysin-Inkorporation in einzelne Proteine mittels t-Test ergibt 19 hoch signifikant veränderte Proteine in der Placebo-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, und 13 hoch signifikante veränderte Proteine in der Imatinib-Gruppe verglichen zur Placebo-Gruppe. Aus diesen wurden fünf Kandidaten ausgewählt und mittels Western Blot und immunhistochemischen Färbungen in Lungen von gesunden und MCT-Ratten nachgewiesen.

Die Kandidaten Dysferlin, Emilin-1, HIP1, Septin-7 und Villin wurden mit dem nichthypothesengelenkten SILAC-Ansatz identifiziert und mit Antikörper-basierten Methoden nachgewiesen. Alle fünf Proteine sind bisher nicht im Zusammenhang mit PH beschrieben, sind aber in Pathomechanismen involviert, die auch in der PH beschrieben sind. In weiteren Studien kann jetzt die Rolle dieser Proteine in der humanen PH untersucht werden.

6. Summary

Pulmonary hypertension (PH) is a progressive disease characterized by increased pulmonary arterial pressure. Pathological changes like vasoconstriction and vascular remodeling lead to a narrowing of the luminal diameter and an increase in pulmonary vascular resistance. The increased afterload is compensated by right ventricular hypertrophy, but during disease progression patients develop right heart failure.

Today many different pathways are known to be involved in PH pathogenesis, but PH is still an incurable disease. Approved therapies target the vasoconstriction and lower the afterload, new therapeutic strategies aim to stop or reverse the remodeling processes in the pulmonary vasculature. Imatinib is a receptor tyrosine-kinase inhibitor that has shown its efficiency in reverse remodeling in animal models and clinical studies.

The aim of this study was to identify unknown pathways and proteins involved in PH. A non-hypothesis driven high-throughput proteomic approach was chosen to investigate proteomic changes in an animal model of PH. The monocrotaline (MCT)-induced rat PH model was used because it mirrors best the remodeling processes of human PH, and Imatinib was already shown to be efficient in reverse remodeling in this model. To investigate the lung proteome changes, we metabolically labeled the rats by stable isotope labeling of amino acids in cell culture (SILAC). The rats received SILAC-food that contains a heavy lysine. By replacing the normal ¹²C carbon atom with the heavy stable isotope ¹³C the mass of the amino acid is increased and this specific mass difference allows for quantitative comparison of the lung proteomes.

Three groups, a control group, a MCT/placebo group and a MCT/Imatinib group were fed with SILAC-food for two weeks. The lists with the identified proteins with $^{13}C_6$ -lysine incorporation were compared by t-test and analyses of GO-term changes were performed.

Changes in GO-terms were detected for cellular components membrane, vesicles and cell junctions. For biological processes changes in cell adhesion were detected for the comparison of the placebo *vs.* the control group. For the comparison of the Imatinib *vs.* the placebo group significant changes were only detected in organic and carboxylic acid catabolic processes.

By comparing ${}^{13}C_6$ -lysine incorporations into single proteins by t-test 19 proteins were identified to be significantly changed in placebo *vs.* control group, and 13 proteins in the Imatinib *vs.* placebo group. Out of these, five candidates were picked to be further evaluated. The expression of these five candidates in healthy and MCT rat lungs was confirmed by Western Blot und localized by immunohistochemistry.

With the non-hypothesis driven pulsed-SILAC approach dysferlin, emilin-1, HIP1, septin-7 and villin were identified and additionally confirmed by antibody-based methods. These five proteins are not described in the pathology of PH but the results of this study, together with published data for these proteins, led to hypotheses of their roles in PH. Further studies are needed to confirm their role in human PH and investigate in which way they interact in disease pathways.

7. Anhang

	Kont	Kontroll-Gruppe		Placebo-Gruppe			I	matinib	-Grupp	9	
Tag	1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	
1	173	169	175	149,2	157,5	160,2	149,1	155,6	148,2	162,4	
2	173	169	175	153,9	160,5	165,5	156,3	156,2	157,8	165,1	
3	176,8	171,4	187,6	154,2	152,4	169,2	155,8	157,5	159,2	166,5	
4	171,6	170,6	185,3	157,6	166,4	167,5	163	164,9	163,4	170,4	
5	176,8	172,6	184,4	160,6	168,4	170,8	162,9	160,7	160,3	166,1	
6	170,7	172,3	180,1	158,1	168,6	170,9	165	160,9	162,7	171,8	
7	169,4	164,8	173,3	158,2	167,9	174,1	162,6	153,4	157,3	161,3	
8	168,9	163,8	170,5	172	172	174	168	160	162	168	NaCI-/MCT-Injektion
9	176,4	170,6	174,4	173	173	177,6	165,4	155,8	154,4	162	
10	168,2	161,8	167,1	167	166,1	172	162,7	160	158,6	163,6	
11	172,5	163,3	166,8	174,2	175,4	180	165,4	164,8	161,5	172,4	
12	178,2	167,3	171,5	180,9	180,6	184,6	168,9	167,6	165,3	176,4	
13	176,9	169,8	175,8	183,9	177,2	185	168,2	165	162,2	178,2	
14	173,3	164,2	171,4	181,2	178,6	184	166,8	160,4	159,3	174,1	
15	175,6	164,9	172,3	191,4	183,9	185,3	166,7	165,7	163,2	180	
16	182,8	175,7	179,9	202	189	192,1	173	173,1	171,9	185,1	
17	178	168,9	169,4	192,8	182,2	180,6	171,8	170,6	166,8	182,6	
18	182,5	177	180,6	202,2	191	193,1	178,3	176	174,2	192,8	
19	186,7	184,3	185,4	205,2	192	197,2	186,4	183,4	181,1	203,8	
20	184,9	181,5	187,9	206,1	193	193,7	187	180,5	181,3	202,6	
21	184,5	180,9	187,5	204,9	190	193	183,7	178,9	175,1	198,4	
22	187,2	182	188,2	214,3	197,9	202,4	184,3	183,8	177,2	202	Start Lysin-0-Futter
23	200,4	199,3	203,8	226	207,3	209	199,2	193,1	188,3	226	
24	198,5	194,9	200,8	228,3	199,4	201	191,2	190,4	186,6	212	
25	208	206,8	211,8	224,1	224	211	214,1	201	194,7	225,7	
26	215,5	208,4	214,7	234,7	205,6	223,4	232,1	198,1	203	240	
27	217,7	217,4	220,9	242,8	235,8	225,3	220,9	215,3	222	242,1	
28	214,6	214,6	220,1	244	231,3	228,3	233,2	205,1	214,8	245	
29	222,5	223,6	230,3	270,3	249,2	247,2	245,3	217,3	244,3	271	
30	229,9	231,8	238,3	267,6	252,5	258,1	251	239,3	240	278	
31	231,2	232,4	239,9	277,3	261,4	262,9	253,1	230	246,3	289,3	
32	241,4	243,6	251,1	285,3	273	268,2	268,3	245,3	245,7	297,3	
33	249	247,2	256,7	293,4	281	273,3	275,4	251,9	246,6	306,2	
34	251,3	249,6	260,4	301,9	290	279,8	286,4	251,6	238,8	313,3	
35	248,2	249,7	259,1	307,3	297,7	286,9	290	260,3	228,3	322,2	
36	258,4	258,5	267,5	309,1	302,6	285,6	303,8	271,7	224,3	363,2	Start Placebo/Imatinib

Tabelle 6: Gewichtszunahme der Ratten in den drei Versuchsgruppen.

37	246,2	263,6	274,7	319,4	311,6	290,1	310	277,8	216,9	326,2	und Lysin-6-Futter
38	267,3	266	277	312,4	309,1	285,4	304,1	282,1	211,3	330,4	
39	272,1	268,3	280,8	315	314,8	296,7	316,2	274,3	206,1	326,3	
40	274,9	273,1	283,1	317,2	329	301,4	308,2	285,4	203	331,1	
41	277,2	275,9	286,7	316,3	325	310,3	314,3	288,1	206,4	316,9	
42	274,2	271,9	282,6	311,5	327,4	310	312,3	289,3	209,9	318,9	
43	278,9	275,7	286,7	295,6	325	307,9	311,9	289,4	208,7	317,8	
44	284,3	280,8	290,2	289,3	331,2	315,6	319	300	221	328,5	
45	285,1	280,7	289,1	278,5	328	312,9	315,8	296,4	218,7	328,5	
46	293,8	287,9	296,5	273,3	329,4	319,5	320,3	302,1	223,4	336,6	
47	294,6	290,3	298	266,1	334,7	319,9	330	308,1	240	345,7	
48	295,4	291,3	299,7	265,7	341,8	322,5	330,1	311,9	237,7	343,8	
49	295,1	289,5	298	264,6	336,3	325,2	332,6	309,7	240	346,6	
50	307,9	307	303	263	336,3	323,6	340	311	241,3	341,2	

Tabelle 7: Futtermenge pro Tag pro Ratte.

Tag	Kontrolle	Placebo	Imatinib	
1	10,2	10,0	10,0	
2	10,2	10,0	10,0	
3	10,2	10,0	10,0	
4	10,2	10,0	10,0	
5	10,2	10,0	10,0	
7	10,4	10,0	10,1	
8	11	10,2	10,3	NaCl-/MCT-Injektion
9	11,4	10,4	10,3	
10	11,8	10,5	10,6	
11	12,0	10,7	10,8	
12	12,0	11,2	11,0	
13	12,1	11,3	11,2	
14	12,1	11,6	11,5	
15	12,4	11,8	11,8	
16	12,6	12,1	12,0	
17	12,6	12,3	12,2	
18	12,8	12,6	12,6	
19	13,0	12,9	12,9	
20	13,0	13,2	13,1	
21	13,1	13,5	13,3	
22	13,4	13,7	13,6	Start Lysin-0-Futter
23	13,5	14,1	13,9	
24	13,6	14,7	14,2	
25	13,8	15,3	14,5	
26	13,9	15,9	14,8	

27	14,1	16,5	15,5	
28	14,3	17,1	15,9	
29	14,5	17,7	16,4	
30	14,7	18,3	17,6	
31	14,8	18,9	18,4	
32	15,1	19,5	19,1	
33	15,2	20,1	19,6	
34	15,4	13,6	20,3	
35	15,6	12,5	20,9	
36	15,9	10,98	21,525	Start Placebo/Imatinib
37	16,1	10,9	22,1	und Lysin-6-Futter
38	16,1	10,9	19,9	
39	16,4	14,0	17,2	
40	16,4	11,2	13,9	
41	16,6	6,5	11,6	
42	16,7	13,7	14,2	
43	16,9	12,1	16,8	
44	17,1	16,3	13,1	
45	17,3	9,2	15,1	
46	17,5	11,4	15,6	
47	17,6	11,6	15,1	
48	17,8	8,5	15,8	
49	18,1	10,0	17,1	
50	18,4	9,9	11,8	
51	12.5	7.1	14.5	

	42			
Tabelle 8:	¹³ C ₆ -Lysin-Inkor	poration in b	bekannte	PH-Mediatoren.

Protein-Id Uniprot	Protein-Name	Gen- Name	Inkorporation Kontrolle	Inkorporation Placebo	Inkorporation Imatinib	Inkorporation P/K	TTEST PK	Inkorporation I/P	TTEST IP
Gucy									
Q9WVI4	Guanylate cyclase soluble subunit alpha-2	Gucy1a2	0,3765	0,5907		1,5689	0,1266		
P19686	Guanylate cyclase soluble subunit alpha-3	Gucy1a3	0,5378	0,5779	0,5833	1,0745	0,0264	1,0093	0,6401
P20595	Guanylate cyclase soluble subunit beta-1	Gucy1b3	0,4720	0,5538	0,5355	1,1732	0,0043	0,9671	0,4769
BMP									
F1M7M4	BMP-2-inducible protein kinase	Bmp2k		0,5609	0,5247			0,9354	
P38438	TGF-beta receptor type-2	Tgfbr2	0,6032	0,5700	0,5706	0,9451	0,3497	1,0011	0,9861
P26342	Transforming growth factor beta receptor type 3	Tgfbr3	0,6172	0,6319	0,5892	1,0238		0,9325	
P17246	Transforming growth factor beta-1;Latency-associated peptide	Tgfb1		0,4386	0,4195			0,9564	
Q99PD6	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	Tgfb1i1	0,3044	0,3483	0,3472	1,1441	0,3477	0,9967	0,9808
Q07258	Transforming growth factor beta-3	Tgfb3							
D4A8G5	Transforming growth factor- beta-induced protein ig-h3	Tgfbi	0,5077	0,5686	0,5629	1,1201	0,0094	0,9898	0,7924
G3V8X8	Noggin	Nog			0,4555				
O70436	Mothers against decapentaplegic homolog 2	Smad2	0,6249	0,6016	0,6183	0,9627		1,0277	0,5430
P84025	Mothers against decapentaplegic homolog 3	Smad3	0,6253	0,4991	0,6125	0,7983	0,0777	1,2270	0,0395
Q9R1V3	Mothers against decapentaplegic homolog	Smad5;Sm	nad1						

	5;Mothers against decapentaplegic homolog 1								
АроЕ									
P02650	Apolipoprotein E	Apoe	0,6499	0,6234	0,5847	0,9593	0,0870	0,9379	0,0168
G3V7A5	Low-density lipoprotein receptor	Ldlr		0,5661					
D3ZAR1	Low density lipoprotein receptor adapter protein 1	Ldlrap1	0,6067	0,6151	0,6039	1,0138	0,5664	0,9819	0,2828
IGF									
P21744	Insulin-like growth factor- binding protein 4	lgfbp4							
F1LRE2	Insulin-like growth factor- binding protein complex acid labile subunit	Igfals	0,6363	0,6359	0,6465	1,0036	0,8420	1,0111	0,3160
505									
EGF									
G3V6K6	Epidermal growth factor receptor	Egfr	0,6189	0,6056	0,5870	0,9784	0,3375	0,9693	0,2477
PGI									
P83868	Prostaglandin E synthase 3	Ptges3	0,5089	0,5187	0,5155	1,0193	0,0074	0,9938	0,3196
Q62786	Prostaglandin F2 receptor negative regulator	Ptgfrn	0,5075	0,5599	0,5838	1,1033	0,2687	1,0425	0,2376
Q62969	Prostacyclin synthase	Ptgis	0,5010	0,4653	0,4680	0,9287	0,2897	1,0058	0,8809
P97584	Prostaglandin reductase 1	Ptgr1	0,2750	0,2754	0,2779	1,0014	0,9167	1,0091	0,6374
Q5BK81	Prostaglandin reductase 2	Ptgr2	0,2901	0,3306	0,3209	1,1398	0,4243	0,9705	0,7729
Q63921	Prostaglandin G/H synthase	Ptgs1	0,4867	0,5026	0,4651	1,0328	0,6962	0,9254	0,2980
ET-1									

P26684	Endothelin-1 receptor	Ednra			0,6839				
P42893	Endothelin-converting enzyme 1	Ece1	0,5704	0,6050	0,5787	1,0607	0,0667	0,9565	0,0672
Warburg									
P05708	Hexokinase-1	Hk1	0,4791	0,4627	0,4306	0,9658	0,1724	0,9306	0,4505
P27881	Hexokinase-2	Hk2	0,5872	0,5806	0,5283	0,9886		0,9100	0,2045
P27926	Hexokinase-3	Hk3		0,5018	0,4193			0,8356	0,3038
P04642	L-lactate dehydrogenase A chain;L-lactate dehydrogenase	Ldha	0,4450	0,4434	0,4239	0,9963	0,9764	0,9560	0,4368
P42123	L-lactate dehydrogenase B chain	Ldhb	0,3963	0,4094	0,4298	1,0329	0,4028	1,0500	0,1343
Calcium/Ka	alium								
Q64578	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1	Atp2a1	0,2432		0,2198				
F1LPF6	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	Atp2a2	0,5402	0,5050	0,5157	0,9348		1,0211	0,4861
E9PSX6		Atp2a2	0,5222	0,5129	0,5303	0,9821	0,6537	1,0341	0,1851
G3V9U7	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	Atp2a3	0,5478	0,5556	0,5723	1,0142	0,7793	1,0300	0,4601
P11505	Plasma membrane calcium- transporting ATPase 1	Atp2b1	0,4984	0,5000	0,5097	1,0033	0,8303	1,0194	0,2557
Q64568	Plasma membrane calcium- transporting ATPase 3	Atp2b3	0,4872	0,5211	0,5085	1,0695	0,1729	0,9757	0,3601
F1LSX8	Plasma membrane calcium- transporting ATPase 4	Atp2b4	0,3832	0,4595	0,4541	1,1991	0,1098	0,9883	0,8321
P54290	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha- 2/delta-1;Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2-1;Voltage-dependent calcium channel subunit	Cacna2d1	0,2607	0,2627	0,2906	1,0075	0,5455	1,1062	0,4256

	delta-1								
Q66HR5	Calcium-binding and coiled- coil domain-containing protein 1	Calcoco1	0,5891	0,4875	0,5718	0,8276		1,1728	0,4663
Q63450	Calcium/calmodulin- dependent protein kinase type 1	Camk1	0,5572	0,5359	0,5438	0,9617	0,4158	1,0148	0,6142
P15791	Calcium/calmodulin- dependent protein kinase type II subunit delta	Camk2d	0,4902	0,5001	0,4862	1,0202	0,5681	0,9722	0,2205
P11730	Calcium/calmodulin- dependent protein kinase type II subunit gamma	Camk2g	0,5120	0,5147	0,4972	1,0054	0,8058	0,9659	0,1707
Q8K4Y7	Soluble calcium-activated nucleotidase 1	Cant1		0,5948	0,6094			1,0246	
Q9WU49	Calcium-regulated heat stable protein 1	Carhsp1	0,4624	0,5127	0,4719	1,1087	0,0698	0,9205	0,3047
P61023	Calcium-binding protein p22	Chp		0,4630	0,4455			0,9621	0,9355
Q9R010	Calcium and integrin-binding protein 1	Cib1							
Q6P6Q9	Calcium uptake protein 1, mitochondrial	Micu1	0,5273	0,5976	0,5814	1,1332	0,2606	0,9729	0,5523
Q91ZS3	45 kDa calcium-binding protein	Sdf4	0,5981	0,6163	0,6127	1,0303	0,4629	0,9943	0,8303
Q6P9Z6	Tumor-associated calcium signal transducer 2	Tacstd2	0,6253	0,5528	0,5980	0,8842	0,0060	1,0817	0,1159
Q9WTN5	Two pore calcium channel protein 1	Tpcn1							
P06685	Sodium/potassium- transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	0,5075	0,5388	0,5204	1,0616	0,0819	0,9660	0,1587
D3ZSA3	Sodium/potassium- transporting ATPase subunit alpha-2	Atp1a2	0,5961	0,5923	0,5847	0,9938	0,9119	0,9870	0,7830
P07340	Sodium/potassium- transporting ATPase subunit	Atp1b1	0,5870	0,5802	0,5642	0,9885	0,6295	0,9724	0,3277

	beta-1								
Q63377	Sodium/potassium- transporting ATPase subunit beta-3	Atp1b3	0,5024	0,5122	0,5081	1,0196	0,2422	0,9920	0,7184
Q04679	Sodium/potassium- transporting ATPase subunit gamma	Fxyd2							
P62483	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2	Kcnab2	0,5433	0,4694	0,4824	0,8640	0,0973	1,0277	0,5099
Q63734	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 4	Kcnc4	0,4748	0,4884	0,4531	1,0286		0,9278	0,7337
Wachstum	sfaktoren								
G3V6A0	Platelet-derived growth factor receptor alpha	Pdgfra							
G3V633	Vascular endothelial growth factor receptor 1	Flt1	0,4801		0,5301				
O08775	Vascular endothelial growth factor receptor 2	Kdr	0,5242	0,6312	0,5279	1,2041	0,0713	0,8364	0,0086
G3V6B7	Vascular endothelial growth factor receptor 3	Flt4		0,6131	0,6387			1,0419	
P61149	Fibroblast growth factor 1	Fgf1							
Q9JJ10	Proto-oncogene tyrosine- protein kinase Src	Src		0,4418	0,5199			1,1766	0,0718
P47196	RAC-alpha serine/threonine- protein kinase	Akt1	0,5886	0,5371	0,5766	0,9124	0,3881	1,0737	0,2896
D3ZH75		Akt1s1	0,5748	0,5784	0,5602	1,0062	0,7112	0,9685	0,0395
P47197	RAC-beta serine/threonine- protein kinase	Akt2	0,5846	0,5855	0,5897	1,0016		1,0071	
F1LR70	Rho-associated protein kinase 1	Rock1	0,5350	0,5325	0,5433	0,9953	0,8784	1,0203	0,3282
D3ZZU3	Rho-associated protein kinase 2	Rock2	0,5293	0,5323	0,5436	1,0057	0,7555	1,0213	0,0768

MMPs TIMP	°s								
Q10739	Matrix metalloproteinase-14	Mmp14							
P33436	72 kDa type IV collagenase;PEX	Mmp2	0,6241	0,5308	0,5818	0,8505	0,2611	1,0960	0,3000
D3ZYK8	Matrix metalloproteinase-9	Mmp9	0,8284	0,5419	0,6157	0,6542	0,1605	1,1361	0,3413
P30121	Metalloproteinase inhibitor 2	Timp2	0,6161	0,5818	0,5783	0,9444	0,0758	0,9939	0,6556
P48032	Metalloproteinase inhibitor 3	Timp3	0,6204	0,5807	0,5574	0,9361	0,2214	0,9599	0,2747
PDEs									
Q6TUH0	2,5-phosphodiesterase 12	Pde12	0,5542	0,5818		1,0498			
F8WFW5	cGMP-dependent 3,5-cyclic phosphodiesterase	Pde2a	0,5389	0,4508	0,5400	0,8364		1,1980	0,5302
P14270	cAMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase 4D	Pde4d	0,5447	0,4821	0,5039	0,8851	0,1896	1,0452	0,4540
G3V7V8	cGMP-specific 3,5-cyclic phosphodiesterase	Pde5a	0,5476	0,5813	0,5928	1,0615	0,0346	1,0197	0,1935
D3ZRD3		Pde6d	0,5949	0,5872	0,5856	0,9871	0,5821	0,9972	0,9275
Chloride int	tracellular channel proteins								
Q6MG61	Chloride intracellular channel protein 1	Clic1	0,5332	0,5323	0,5238	0,9984	0,9507	0,9841	0,3173
Q5M883	Chloride intracellular channel protein 2	Clic2	0,5335	0,5374	0,5235	1,0073	0,7611	0,9741	0,4000
D3ZY91		Clic3	0,5693	0,5222	0,5238	0,9173	0,1742	1,0032	0,9219
G3V8C4	Chloride intracellular channel protein 4	Clic4	0,4873	0,5433	0,5404	1,1149	0,0335	0,9947	0,7648
Q9EPT8	Chloride intracellular channel protein 5	Clic5	0,2785	0,2651	0,2698	0,9518	0,0751	1,0180	0,2140

8. Literatur

- 1. Wolfgang Clauss, C.C., Humanbiologie kompakt. 2009: Spektrum Akademischer Verlag.
- 2. Weibel, E.R., What makes a good lung? Swiss Med Wkly, 2009. 139(27-28): p. 375-86.
- 3. Bommas-Ebert, U.T., Philipp ; Voß, Rainer, Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie. Vol. 2., aktualisierte und erw. Aufl. 2006: Thieme.
- 4. Zilles, K.T., Bernhard N, Anatomie. 2010, Berlin, Heidelberg: Springer.
- 5. Simonneau, G., et al., Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(25 Suppl): p. D34-41.
- 6. Hoeper, M.M., et al., Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(25 Suppl): p. D42-50.
- 7. Grunig, E., et al., [Non-invasive diagnosis of pulmonary hypertension: ESC/ERS Guidelines with commentary of the Cologne Consensus Conference 2010]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2010. 135 Suppl 3: p. S67-77.
- 8. Chin, K.M. and L.J. Rubin, Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(16): p. 1527-38.
- 9. Newman, J.H., et al., Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions. *J Am Coll Cardiol*, 2004. 43(12 Suppl S): p. 33S-39S.
- 10. Soubrier, F., et al., Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(25 Suppl): p. D13-21.
- 11. Harrison, R.E., et al., Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*, 2003. 40(12): p. 865-71.
- 12. Chaouat, A., et al., Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*, 2004. 59(5): p. 446-8.
- 13. Nasim, M.T., et al., Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*, 2011. 32(12): p. 1385-9.
- 14. Austin, E.D., et al., Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*, 2012. 5(3): p. 336-43.
- 15. Ma, L., et al., A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2013. 369(4): p. 351-61.
- 16. Abenhaim, L., et al., Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med*, 1996. 335(9): p. 609-16.
- 17. Savale, L., et al., Pulmonary hypertension associated with benfluorex exposure. *Eur Respir J*, 2012. 40(5): p. 1164-72.
- 18. Chang, B., et al., Natural history of mild-moderate pulmonary hypertension and the risk factors for severe pulmonary hypertension in scleroderma. *J Rheumatol*, 2006. 33(2): p. 269-74.
- 19. Magliano, M., D.A. Isenberg, and J. Hillson, Pulmonary hypertension in autoimmune rheumatic diseases: where are we now? *Arthritis Rheum*, 2002. 46(8): p. 1997-2009.
- 20. Speich, R., et al., Primary pulmonary hypertension in HIV infection. *Chest*, 1991. 100(5): p. 1268-71.
- 21. D'Alto, M. and V.S. Mahadevan, Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Eur Respir Rev*, 2012. 21(126): p. 328-37.
- 22. Halank, M., et al., Portopulmonary hypertension. J Gastroenterol, 2006. 41(9): p. 837-47.
- 23. Graham, B.B., et al., Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension: pulmonary vascular disease: the global perspective. *Chest*, 2010. 137(6 Suppl): p. 20S-29S.
- 24. Lantuejoul, S., et al., Pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis: a clinicopathologic study of 35 cases. *Am J Surg Pathol*, 2006. 30(7): p. 850-7.
- 25. Preston, I.R., Properly diagnosing pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*, 2013. 111(8 Suppl): p. 2C-9C.
- 26. Fang, J.C., et al., World Health Organization Pulmonary Hypertension group 2: pulmonary hypertension due to left heart disease in the adult--a summary statement from the Pulmonary

Hypertension Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2012. 31(9): p. 913-33.

- 27. Behr, J. and J.H. Ryu, Pulmonary hypertension in interstitial lung disease. *Eur Respir J*, 2008. 31(6): p. 1357-67.
- 28. Chaouat, A., R. Naeije, and E. Weitzenblum, Pulmonary hypertension in COPD. *Eur Respir J*, 2008. 32(5): p. 1371-85.
- 29. Eden, E., et al., GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, 2009. 10: p. 48.
- 30. Kim, N.H., Assessment of operability in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Proc Am Thorac Soc*, 2006. 3(7): p. 584-8.
- 31. Dingli, D., et al., Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders. *Chest*, 2001. 120(3): p. 801-8.
- 32. Peacock, A.J., Pulmonary hypertension after splenectomy: a consequence of loss of the splenic filter or is there something more? *Thorax*, 2005. 60(12): p. 983-4.
- 33. Shorr, A.F., et al., Pulmonary hypertension in advanced sarcoidosis: epidemiology and clinical characteristics. *Eur Respir J*, 2005. 25(5): p. 783-8.
- 34. Fartoukh, M., et al., Severe pulmonary hypertension in histiocytosis X. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(1): p. 216-23.
- 35. Hamaoka, K., et al., Pulmonary hypertension in type I glycogen storage disease. *Pediatr Cardiol*, 1990. 11(1): p. 54-6.
- 36. Theise, N.D. and P.C. Ursell, Pulmonary hypertension and Gaucher's disease: logical association or mere coincidence? *Am J Pediatr Hematol Oncol*, 1990. 12(1): p. 74-6.
- 37. Chu, J.W., et al., High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2002. 122(5): p. 1668-73.
- 38. D'Alonzo, G.E., et al., Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*, 1991. 115(5): p. 343-9.
- 39. Benza, R.L., et al., Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*, 2010. 122(2): p. 164-72.
- 40. Hoeper, M.M., et al., Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: results from the COMPERA registry. *Int J Cardiol*, 2013. 168(2): p. 871-80.
- 41. Humbert, M., et al., Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*, 2010. 122(2): p. 156-63.
- 42. McLaughlin, V.V., et al., Prognosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 2004. 126(1 Suppl): p. 78S-92S.
- 43. McGoon, M.D., et al., Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(25 Suppl): p. D51-9.
- 44. Voelkel, N.F. and R.M. Tuder, Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 1995. 8(12): p. 2129-38.
- 45. Rabinovitch, M., Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*, 2012. 122(12): p. 4306-13.
- 46. Jeffery, T.K. and J.C. Wanstall, Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*, 2001. 92(1): p. 1-20.
- 47. Jones, P.L., K.N. Cowan, and M. Rabinovitch, Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*, 1997. 150(4): p. 1349-60.
- 48. Passman, J.N., et al., A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(27): p. 9349-54.
- 49. Davie, N.J., et al., Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 286(4): p. L668-78.
- 50. Frid, M.G., V.A. Kale, and K.R. Stenmark, Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res*, 2002. 90(11): p. 1189-96.
- 51. Dingemans, K.P. and C.A. Wagenvoort, Pulmonary arteries and veins in experimental hypoxia. An ultrastructural study. *Am J Pathol*, 1978. 93(2): p. 353-68.

- 52. Masri, F.A., et al., Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 293(3): p. L548-54.
- 53. Eddahibi, S., et al., Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2002. 20(6): p. 1559-72.
- 54. Schermuly, R.T., et al., Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*, 2011. 8(8): p. 443-55.
- 55. Christman, B.W., et al., An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 1992. 327(2): p. 70-5.
- 56. Wharton, J., et al., Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172(1): p. 105-13.
- 57. Stewart, D.J., et al., Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med*, 1991. 114(6): p. 464-9.
- 58. Launay, J.M., et al., Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*, 2002. 8(10): p. 1129-35.
- 59. Post, J.M., et al., Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol*, 1992. 262(4 Pt 1): p. C882-90.
- 60. Platoshyn, O., et al., Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. 279(5): p. C1540-9.
- 61. Machado, R.D., et al., Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1 Suppl): p. S32-42.
- 62. Andrae, J., R. Gallini, and C. Betsholtz, Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, 2008. 22(10): p. 1276-312.
- 63. Heldin, C.H. and B. Westermark, Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 1999. 79(4): p. 1283-316.
- 64. Heldin, C.H., A. Ostman, and L. Ronnstrand, Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1998. 1378(1): p. F79-113.
- 65. Yu, Y., et al., PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003. 284(2): p. C316-30.
- 66. Humbert, M., et al., Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*, 1998. 11(3): p. 554-9.
- 67. Perros, F., et al., Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. 178(1): p. 81-8.
- 68. Schermuly, R.T., et al., Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*, 2005. 115(10): p. 2811-21.
- 69. Tuder, R.M., et al., Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol*, 2001. 195(3): p. 367-74.
- 70. Benisty, J.I., et al., Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*, 2004. 126(4): p. 1255-61.
- 71. Xu, W., et al., Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(4): p. 1342-7.
- 72. Warburg, O., On the origin of cancer cells. Science, 1956. 123(3191): p. 309-14.
- 73. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(11): p. 891-9.
- 74. Rabinovitch, M., Elastase and the pathobiology of unexplained pulmonary hypertension. *Chest*, 1998. 114(3 Suppl): p. 213S-224S.
- 75. Lepetit, H., et al., Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2005. 25(5): p. 834-42.
- 76. Stenmark, K.R., K.A. Fagan, and M.G. Frid, Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*, 2006. 99(7): p. 675-91.
- 77. Marshall, B.E., et al., Hypoxic pulmonary vasoconstriction in dogs: effects of lung segment size and oxygen tension. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 1981. 51(6): p. 1543-51.
- 78. Shirai, M., K. Sada, and I. Ninomiya, Effects of regional alveolar hypoxia and hypercapnia on small pulmonary vessels in cats. *J Appl Physiol (1985)*, 1986. 61(2): p. 440-8.
- 79. Forsythe, J.A., et al., Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 1996. 16(9): p. 4604-13.

- 80. Sommer, N., et al., Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J*, 2008. 32(6): p. 1639-51.
- 81. Meyrick, B. and L. Reid, Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol*, 1980. 100(1): p. 151-78.
- 82. Tozzi, C.A., et al., Pressure-induced connective tissue synthesis in pulmonary artery segments is dependent on intact endothelium. *J Clin Invest*, 1989. 84(3): p. 1005-12.
- 83. Kolpakov, V., et al., Effect of mechanical forces on growth and matrix protein synthesis in the in vitro pulmonary artery. Analysis of the role of individual cell types. *Circ Res*, 1995. 77(4): p. 823-31.
- 84. Simonneau, G., et al., Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 2009. 54(1 Suppl): p. S43-54.
- 85. El Chami, H. and P.M. Hassoun, Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*, 2012. 55(2): p. 218-28.
- 86. Pullamsetti, S.S., et al., Inflammation, immunological reaction and role of infection in pulmonary hypertension. *Clin Microbiol Infect*, 2011. 17(1): p. 7-14.
- 87. Balabanian, K., et al., CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 165(10): p. 1419-25.
- 88. Perros, F., et al., Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2007. 29(5): p. 937-43.
- 89. Sanchez, O., et al., Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. 176(10): p. 1041-7.
- 90. Humbert, M., et al., Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 151(5): p. 1628-31.
- 91. Selimovic, N., et al., Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2009. 34(3): p. 662-8.
- 92. Steiner, M.K., et al., Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res*, 2009. 104(2): p. 236-44, 28p following 244.
- 93. Savale, L., et al., Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res*, 2009. 10: p. 6.
- 94. Bogaard, H.J., et al., The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*, 2009. 135(3): p. 794-804.
- 95. Walker, L.A. and P.M. Buttrick, The right ventricle: biologic insights and response to disease: updated. *Curr Cardiol Rev*, 2013. 9(1): p. 73-81.
- 96. Rosenkranz, S., et al., [Right heart catheterization in pulmonary hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2011. 136(50): p. 2601-16; quiz 2617-20.
- 97. Sandoval, J., et al., Survival in primary pulmonary hypertension. Validation of a prognostic equation. *Circulation*, 1994. 89(4): p. 1733-44.
- 98. Sitbon, O., et al., Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol*, 2002. 40(4): p. 780-8.
- 99. Wensel, R., et al., Assessment of survival in patients with primary pulmonary hypertension: importance of cardiopulmonary exercise testing. *Circulation*, 2002. 106(3): p. 319-24.
- 100. Ghofrani H.A., O.D., F. Gerhardt, M. Gorenflo, E. Grünig, W.E. Haefeli, M. Held, M.M. Hoeper, C.-M. Kähler, H. Kaemmerer, H. Klose, V. Köllner, B. Kopp, S. Mebus, A. Meyer, O. Miera, D.Pittrow, G. Riemekasten, S. Rosenkranz, D. Schranz, R. Voswinkckel, H. Olschewski, Therapie der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH); Empfehlungen der Kölner Konsensus-Konferenz 2010. Dtsch Med Wochenschrift, 2010(187): p. 87-101.
- 101. O'Callaghan, D.S., et al., Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*, 2011. 8(9): p. 526-38.
- 102. Rubanyi, G.M. and M.A. Polokoff, Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 1994. 46(3): p. 325-415.
- 103. Abman, S.H., Role of endothelin receptor antagonists in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Annu Rev Med*, 2009. 60: p. 13-23.
- 104. Rubin, L.J., et al., Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2002. 346(12): p. 896-903.
- 105. Galie, N., et al., Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebocontrolled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation*, 2008. 117(23): p. 3010-9.
- 106. Iglarz, M., et al., Pharmacology of macitentan, an orally active tissue-targeting dual endothelin receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. 327(3): p. 736-45.

- 107. Ignarro, L.J., et al., Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. 84(24): p. 9265-9.
- 108. Steinhorn, R.H., Pharmacotherapy for pulmonary hypertension. *Pediatr Clin North Am*, 2012. 59(5): p. 1129-46.
- 109. Wilkins, M.R., et al., Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2008. 32(1): p. 198-209.
- 110. Corbin, J.D., et al., High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 334(3): p. 930-8.
- 111. Galie, N., et al., Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2005. 353(20): p. 2148-57.
- 112. Galie, N., et al., Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2009. 119(22): p. 2894-903.
- 113. Bos, C.L., et al., Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004. 36(7): p. 1187-205.
- 114. Olschewski, H., et al., Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*, 2004. 102(2): p. 139-53.
- 115. Olschewski, H., et al., Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med*, 2002. 347(5): p. 322-9.
- 116. Voswinckel, R., et al., Inhaled treprostinil [corrected] for treatment of chronic pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med*, 2006. 144(2): p. 149-50.
- 117. Galie, N., et al., A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*, 2009. 30(4): p. 394-403.
- 118. Kuwano, K., et al., A long-acting and highly selective prostacyclin receptor agonist prodrug, 2-{4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}-N-(methylsulfonyl)acetam ide (NS-304), ameliorates rat pulmonary hypertension with unique relaxant responses of its active form, {4-[(5,6-diphenylpyrazin-2-yl)(isopropyl)amino]butoxy}acetic acid (MRE-269), on rat pulmonary artery. J Pharmacol Exp Ther, 2008. 326(3): p. 691-9.
- 119. NIH, U., ClinicalTrials.gov. ACT-293987 in pulmonary arterial hypertension [online]. <u>http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01106014?term=griphon&rank=1</u>, 2013.
- 120. Murthy, K.S., et al., VIP-mediated G protein-coupled Ca2+ influx activates a constitutive NOS in dispersed gastric muscle cells. *Am J Physiol*, 1993. 265(4 Pt 1): p. G660-71.
- 121. Petkov, V., et al., Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*, 2003. 111(9): p. 1339-46.
- 122. Leuchte, H.H., et al., Inhalation of vasoactive intestinal peptide in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*, 2008. 32(5): p. 1289-94.
- 123. Ghofrani, H.A. and F. Grimminger, Soluble guanylate cyclase stimulation: an emerging option in pulmonary hypertension therapy. *Eur Respir Rev*, 2009. 18(111): p. 35-41.
- 124. Schermuly, R.T., et al., Expression and function of soluble guanylate cyclase in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2008. 32(4): p. 881-91.
- 125. Ghofrani, H.A., et al., Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*, 2013. 369(4): p. 330-40.
- 126. Cohen, M.H., et al., Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(5): p. 935-42.
- 127. Dagher, R., et al., Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(10): p. 3034-8.
- 128. Hoeper, M.M., et al., Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation*, 2013. 127(10): p. 1128-38.
- 129. Ghofrani, H.A., et al., Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 182(9): p. 1171-7.
- 130. Stenmark, K.R., et al., Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. 297(6): p. L1013-32.
- 131. Voelkel, N.F. and R.M. Tuder, Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J Clin Invest*, 2000. 106(6): p. 733-8.
- 132. Rabinovitch, M., et al., Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol*, 1979. 236(6): p. H818-27.
- 133. Stenmark, K.R., et al., Severe pulmonary hypertension and arterial adventitial changes in newborn calves at 4,300 m. *J Appl Physiol (1985)*, 1987. 62(2): p. 821-30.

- 134. Burke, D.L., et al., Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary arteryspecific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009. 297(2): p. L238-50.
- 135. Ryan, J., K. Bloch, and S.L. Archer, Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *Int J Clin Pract Suppl*, 2011(172): p. 15-34.
- 136. Lalich, J.J. and L. Merkow, Pulmonary arteritis produced in rat by feeding Crotalaria spectabilis. *Lab Invest*, 1961. 10: p. 744-50.
- 137. Urboniene, D., et al., Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. 299(3): p. L401-12.
- 138. Rosenberg, H.C. and M. Rabinovitch, Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*, 1988. 255(6 Pt 2): p. H1484-91.
- 139. Wilson, D.W., et al., Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*, 1989. 38(1): p. 57-80.
- 140. Dumitrascu, R., et al., Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med*, 2008. 8: p. 25.
- 141. Beppu, H., et al., BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287(6): p. L1241-7.
- 142. Said, S.I., et al., Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation*, 2007. 115(10): p. 1260-8.
- 143. Hansmann, G., et al., Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Circulation*, 2007. 115(10): p. 1275-84.
- 144. MacLean, M.R., et al., Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2004. 109(17): p. 2150-5.
- 145. Taraseviciene-Stewart, L., et al., Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*, 2001. 15(2): p. 427-38.
- 146. Wilkins, M.R., et al., From proteins to proteomes: large scale protein identification by twodimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*, 1996. 14(1): p. 61-5.
- 147. Yuan, J.X.J., Textbook of pulmonary vascular disease. 2011, New York: Springer. xxxii, 1658 p.
- 148. Parker, C.E., M.R. Warren, and V. Mocanu, Mass Spectrometry for Proteomics, in Neuroproteomics, O. Alzate, Editor 2010: Boca Raton (FL).
- 149. Karoly Vekey, A.T., Akos Vertes, ed. Medical Applications of Mass Spectrometry. 1 ed. 2007, Elsevier Science Ltd. 606.
- 150. Karas, M. and F. Hillenkamp, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, 1988. 60(20): p. 2299-301.
- 151. Fenn, J.B., et al., Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, 1989. 246(4926): p. 64-71.
- 152. Aebersold, R. and M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003. 422(6928): p. 198-207.
- 153. Steen, H. and M. Mann, The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(9): p. 699-711.
- 154. Olsen, J.V., et al., A dual pressure linear ion trap Orbitrap instrument with very high sequencing speed. *Mol Cell Proteomics*, 2009. 8(12): p. 2759-69.
- 155. Ong, S.E. and M. Mann, Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*, 2005. 1(5): p. 252-62.
- 156. Ong, S.E., et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2002. 1(5): p. 376-86.
- 157. Ong, S.E. and M. Mann, A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc*, 2006. 1(6): p. 2650-60.
- 158. Gruhler, A., et al., Stable isotope labeling of Arabidopsis thaliana cells and quantitative proteomics by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2005. 4(11): p. 1697-709.

- 159. Soufi, B., et al., Stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) applied to quantitative proteomics of Bacillus subtilis. *J Proteome Res*, 2010. 9(7): p. 3638-46.
- 160. Gruhler, A., et al., Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol Cell Proteomics*, 2005. 4(3): p. 310-27.
- 161. Kruger, M., et al., SILAC mouse for quantitative proteomics uncovers kindlin-3 as an essential factor for red blood cell function. *Cell*, 2008. 134(2): p. 353-64.
- 162. Looso, M., et al., Advanced identification of proteins in uncharacterized proteomes by pulsed in vivo stable isotope labeling-based mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, 2010. 9(6): p. 1157-66.
- 163. Doherty, M.K., et al., Turnover of the human proteome: determination of protein intracellular stability by dynamic SILAC. *J Proteome Res*, 2009. 8(1): p. 104-12.
- 164. Schwanhausser, B., et al., Global analysis of cellular protein translation by pulsed SILAC. *Proteomics*, 2009. 9(1): p. 205-9.
- 165. Wisniewski, J.R., et al., Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009. 6(5): p. 359-62.
- 166. Lowry, O.H., et al., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951. 193(1): p. 265-75.
- 167. Neuhoff, V., et al., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, 1988. 9(6): p. 255-62.
- 168. Rappsilber, J., Y. Ishihama, and M. Mann, Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem*, 2003. 75(3): p. 663-70.
- 169. Rappsilber, J., M. Mann, and Y. Ishihama, Protocol for micro-purification, enrichment, prefractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc*, 2007. 2(8): p. 1896-906.
- 170. Cox, J., et al., A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc*, 2009. 4(5): p. 698-705.
- 171. Meyrick, B., W. Gamble, and L. Reid, Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol*, 1980. 239(5): p. H692-702.
- 172. Gygi, S.P., et al., Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 1999. 19(3): p. 1720-30.
- 173. Ideker, T., et al., Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 2001. 292(5518): p. 929-34.
- 174. Doherty, M.K. and R.J. Beynon, Protein turnover on the scale of the proteome. *Expert Rev Proteomics*, 2006. 3(1): p. 97-110.
- 175. Gebauer, F. and M.W. Hentze, Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. 5(10): p. 827-35.
- 176. Cox, J. and M. Mann, Is proteomics the new genomics? *Cell*, 2007. 130(3): p. 395-8.
- 177. Heath, D., et al., The pathology of the early and late stages of primary pulmonary hypertension. *Br Heart J*, 1987. 58(3): p. 204-13.
- 178. Smith, P. and D. Heath, Electron microscopy of the plexiform lesion. *Thorax*, 1979. 34(2): p. 177-86.
- 179. Smith, P., et al., The ultrastructure of plexogenic pulmonary arteriopathy. *J Pathol*, 1990. 160(2): p. 111-21.
- 180. Rothberg, K.G., et al., Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell*, 1992. 68(4): p. 673-82.
- 181. Gratton, J.P., et al., Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro. Evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem*, 2000. 275(29): p. 22268-72.
- 182. Peterson, T.E., et al., Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(9): p. 1521-7.
- 183. Mathew, R., et al., Disruption of endothelial-cell caveolin-1alpha/raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 2004. 110(11): p. 1499-506.
- 184. Larson, D.M., C.C. Haudenschild, and E.C. Beyer, Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circ Res*, 1990. 66(4): p. 1074-80.

- 185. Little, T.L., J. Xia, and B.R. Duling, Dye tracers define differential endothelial and smooth muscle coupling patterns within the arteriolar wall. *Circ Res*, 1995. 76(3): p. 498-504.
- 186. Seiden, J.E., et al., High K(+)-induced membrane depolarization attenuates endotheliumdependent pulmonary vasodilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000. 278(2): p. L261-7.
- 187. Umesh, A., et al., Alteration of pulmonary artery integrin levels in chronic hypoxia and monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Vasc Res*, 2011. 48(6): p. 525-37.
- 188. Berman, M.E., Y. Xie, and W.A. Muller, Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol*, 1996. 156(4): p. 1515-24.
- 189. Chiba, R., et al., Ligation of CD31 (PECAM-1) on endothelial cells increases adhesive function of alphavbeta3 integrin and enhances beta1 integrin-mediated adhesion of eosinophils to endothelial cells. *Blood*, 1999. 94(4): p. 1319-29.
- 190. Bashir, R., et al., A gene related to Caenorhabditis elegans spermatogenesis factor fer-1 is mutated in limb-girdle muscular dystrophy type 2B. *Nat Genet*, 1998. 20(1): p. 37-42.
- 191. Liu, J., et al., Dysferlin, a novel skeletal muscle gene, is mutated in Miyoshi myopathy and limb girdle muscular dystrophy. *Nat Genet*, 1998. 20(1): p. 31-6.
- 192. Illa, I., et al., Distal anterior compartment myopathy: a dysferlin mutation causing a new muscular dystrophy phenotype. *Ann Neurol*, 2001. 49(1): p. 130-4.
- 193. Lennon, N.J., et al., Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J Biol Chem*, 2003. 278(50): p. 50466-73.
- 194. Han, R., et al., Dysferlin-mediated membrane repair protects the heart from stress-induced left ventricular injury. *J Clin Invest*, 2007. 117(7): p. 1805-13.
- 195. Wenzel, K., et al., Dysfunction of dysferlin-deficient hearts. *J Mol Med (Berl)*, 2007. 85(11): p. 1203-14.
- 196. Lang, C.T., et al., Placental dysferlin expression is reduced in severe preeclampsia. *Placenta*, 2009. 30(8): p. 711-8.
- 197. Galvin, J.E., et al., The muscle protein dysferlin accumulates in the Alzheimer brain. *Acta Neuropathol*, 2006. 112(6): p. 665-71.
- 198. Hochmeister, S., et al., Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006. 65(9): p. 855-65.
- 199. Sharma, A., et al., A new role for the muscle repair protein dysferlin in endothelial cell adhesion and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010. 30(11): p. 2196-204.
- 200. Colombatti, A., et al., Glycoprotein 115, a glycoprotein isolated from chick blood vessels, is widely distributed in connective tissue. *J Cell Biol*, 1985. 100(1): p. 18-26.
- 201. Colombatti, A., et al., Monoclonal antibodies against chick gp 115, a matrix glycoprotein with broad distribution. *Coll Relat Res*, 1985. 5(2): p. 181-91.
- 202. Colombatti, A., et al., Widespread codistribution of glycoprotein gp 115 and elastin in chick eye and other tissues. *Coll Relat Res*, 1987. 7(4): p. 259-75.
- 203. Doliana, R., et al., Isolation and characterization of EMILIN-2, a new component of the growing EMILINs family and a member of the EMI domain-containing superfamily. *J Biol Chem*, 2001. 276(15): p. 12003-11.
- 204. Hayward, C.P., et al., The cDNA sequence of human endothelial cell multimerin. A unique protein with RGDS, coiled-coil, and epidermal growth factor-like domains and a carboxyl terminus similar to the globular domain of complement C1q and collagens type VIII and X. *J Biol Chem*, 1995. 270(31): p. 18246-51.
- 205. Sanz-Moncasi, M.P., et al., Identification of a high molecular weight endothelial cell surface glycoprotein, endoGlyx-1, in normal and tumor blood vessels. *Lab Invest*, 1994. 71(3): p. 366-73.
- 206. Bressan, G.M., et al., Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastinmicrofibrils interface. *J Cell Biol*, 1993. 121(1): p. 201-12.
- 207. Zanetti, M., et al., EMILIN-1 deficiency induces elastogenesis and vascular cell defects. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(2): p. 638-50.
- 208. Spessotto, P., et al., beta 1 Integrin-dependent cell adhesion to EMILIN-1 is mediated by the gC1q domain. *J Biol Chem*, 2003. 278(8): p. 6160-7.
- 209. Verdone, G., et al., The solution structure of EMILIN1 globular C1q domain reveals a disordered insertion necessary for interaction with the alpha4beta1 integrin. *J Biol Chem*, 2008. 283(27): p. 18947-56.

- 210. Stegemann, C., et al., Proteomic identification of matrix metalloproteinase substrates in the human vasculature. *Circ Cardiovasc Genet*, 2013. 6(1): p. 106-17.
- 211. Zacchigna, L., et al., Emilin1 links TGF-beta maturation to blood pressure homeostasis. *Cell*, 2006. 124(5): p. 929-42.
- 212. Shimodaira, M., et al., Association study of the elastin microfibril interfacer 1 (EMILIN1) gene in essential hypertension. *Am J Hypertens*, 2010. 23(5): p. 547-55.
- 213. Liu, C. and B. Xi, Pooled analyses of the associations of polymorphisms in the GRK4 and EMILIN1 genes with hypertension risk. *Int J Med Sci*, 2012. 9(4): p. 274-9.
- 214. Kalchman, M.A., et al., HIP1, a human homologue of S. cerevisiae Sla2p, interacts with membrane-associated huntingtin in the brain. *Nat Genet*, 1997. 16(1): p. 44-53.
- 215. Wanker, E.E., et al., HIP-I: a huntingtin interacting protein isolated by the yeast two-hybrid system. *Hum Mol Genet*, 1997. 6(3): p. 487-95.
- 216. Metzler, M., et al., HIP1 functions in clathrin-mediated endocytosis through binding to clathrin and adaptor protein 2. *J Biol Chem*, 2001. 276(42): p. 39271-6.
- 217. Mishra, S.K., et al., Clathrin- and AP-2-binding sites in HIP1 uncover a general assembly role for endocytic accessory proteins. *J Biol Chem*, 2001. 276(49): p. 46230-6.
- 218. Oravecz-Wilson, K.I., et al., Huntingtin Interacting Protein 1 mutations lead to abnormal hematopoiesis, spinal defects and cataracts. *Hum Mol Genet*, 2004. 13(8): p. 851-67.
- 219. Ross, T.S., et al., Fusion of Huntingtin interacting protein 1 to platelet-derived growth factor beta receptor (PDGFbetaR) in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;7)(q33;q11.2). *Blood*, 1998. 91(12): p. 4419-26.
- 220. Rao, D.S., et al., Huntingtin-interacting protein 1 is overexpressed in prostate and colon cancer and is critical for cellular survival. *J Clin Invest*, 2002. 110(3): p. 351-60.
- 221. Rao, D.S., et al., Altered receptor trafficking in Huntingtin Interacting Protein 1-transformed cells. *Cancer Cell*, 2003. 3(5): p. 471-82.
- 222. Mills, I.G., et al., Huntingtin interacting protein 1 modulates the transcriptional activity of nuclear hormone receptors. *J Cell Biol*, 2005. 170(2): p. 191-200.
- 223. Hyun, T.S., et al., HIP1 and HIP1r stabilize receptor tyrosine kinases and bind 3phosphoinositides via epsin N-terminal homology domains. *J Biol Chem*, 2004. 279(14): p. 14294-306.
- 224. Ames, H.M., et al., Huntingtin-interacting protein 1 phosphorylation by receptor tyrosine kinases. *Mol Cell Biol*, 2013. 33(18): p. 3580-93.
- 225. Guignabert, C., et al., Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *Eur Respir Rev*, 2013. 22(130): p. 543-51.
- 226. Haarer, B.K. and J.R. Pringle, Immunofluorescence localization of the Saccharomyces cerevisiae CDC12 gene product to the vicinity of the 10-nm filaments in the mother-bud neck. *Mol Cell Biol*, 1987. 7(10): p. 3678-87.
- 227. Hall, P.A., et al., Expression profiling the human septin gene family. *J Pathol*, 2005. 206(3): p. 269-78.
- 228. Weirich, C.S., J.P. Erzberger, and Y. Barral, The septin family of GTPases: architecture and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(6): p. 478-89.
- 229. Spiliotis, E.T., M. Kinoshita, and W.J. Nelson, A mitotic septin scaffold required for Mammalian chromosome congression and segregation. *Science*, 2005. 307(5716): p. 1781-5.
- 230. Mostowy, S. and P. Cossart, Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012. 13(3): p. 183-94.
- 231. Liu, Z., et al., Borg5 is required for angiogenesis by regulating persistent directional migration of the cardiac microvascular endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 2014.
- 232. Wasik, A.A., et al., Septin 7 forms a complex with CD2AP and nephrin and regulates glucose transporter trafficking. *Mol Biol Cell*, 2012. 23(17): p. 3370-9.
- 233. Roth, A.D., et al., Septin 7: actin cross-organization is required for axonal association of Schwann cells. *Biol Res*, 2013. 46(3): p. 243-9.
- 234. Kim, M.S., et al., SEPT9 occupies the terminal positions in septin octamers and mediates polymerization-dependent functions in abscission. *J Cell Biol*, 2011. 195(5): p. 815-26.
- 235. Li, S., et al., Septin 7 is required for orderly meiosis in mouse oocytes. *Cell Cycle*, 2012. 11(17): p. 3211-8.
- 236. Xie, Y., et al., The GTP-binding protein Septin 7 is critical for dendrite branching and dendriticspine morphology. *Curr Biol*, 2007. 17(20): p. 1746-51.
- 237. Zhu, M., et al., Septin 7 interacts with centromere-associated protein E and is required for its kinetochore localization. *J Biol Chem*, 2008. 283(27): p. 18916-25.

- 238. Engmann, O., et al., Cyclin-dependent kinase 5 activator p25 is generated during memory formation and is reduced at an early stage in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 2011. 70(2): p. 159-68.
- 239. Jia, Z.F., et al., Overexpression of septin 7 suppresses glioma cell growth. *J Neurooncol*, 2010. 98(3): p. 329-40.
- 240. Engidawork, E., et al., Aberrant protein expression in cerebral cortex of fetus with Down syndrome. *Neuroscience*, 2003. 122(1): p. 145-54.
- 241. Lhuillier, P., et al., Absence of annulus in human asthenozoospermia: case report. *Hum Reprod*, 2009. 24(6): p. 1296-303.
- 242. Walsh, T.P., et al., Effect of villin on the kinetics of actin polymerization. *Biochemistry*, 1984. 23(12): p. 2613-21.
- 243. Zhai, L., et al., Tyrosine phosphorylation of villin regulates the organization of the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 2001. 276(39): p. 36163-7.
- 244. Zhai, L., et al., Regulation of actin dynamics by tyrosine phosphorylation: identification of tyrosine phosphorylation sites within the actin-severing domain of villin. *Biochemistry*, 2002. 41(39): p. 11750-60.
- 245. Khurana, S., et al., Autotaxin and Iysophosphatidic acid stimulate intestinal cell motility by redistribution of the actin modifying protein villin to the developing lamellipodia. *Exp Cell Res*, 2008. 314(3): p. 530-42.
- 246. Northrop, J., et al., Different calcium dependence of the capping and cutting activities of villin. *J Biol Chem*, 1986. 261(20): p. 9274-81.
- 247. Walsh, T.P., et al., Calcium dependence of villin-induced actin depolymerization. *Biochemistry*, 1984. 23(25): p. 6099-102.
- 248. Kumar, N., et al., Association of villin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, 2004. 279(4): p. 3096-110.
- 249. Tomar, A., et al., Interaction of phospholipase C-gamma1 with villin regulates epithelial cell migration. *J Biol Chem*, 2006. 281(42): p. 31972-86.
- 250. Pinson, K.I., et al., Targeted disruption of the mouse villin gene does not impair the morphogenesis of microvilli. *Dev Dyn*, 1998. 211(1): p. 109-21.
- 251. Ferrary, E., et al., In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders. *J Cell Biol*, 1999. 146(4): p. 819-30.
- 252. Wang, Y., et al., A novel role for villin in intestinal epithelial cell survival and homeostasis. *J Biol Chem*, 2008. 283(14): p. 9454-64.
- 253. Kersting, S., et al., Antigen transport and cytoskeletal characteristics of a distinct enterocyte population in inflammatory bowel diseases. *Am J Pathol*, 2004. 165(2): p. 425-37.
- 254. Elsasser, H.P., et al., Immunohistochemical demonstration of villin in the normal human pancreas and in chronic pancreatitis. *Histochemistry*, 1991. 95(4): p. 383-90.
- 255. Rimm, D.L., et al., Autoantibodies specific for villin found in patients with colon cancer and other colitides. *Dig Dis Sci*, 1995. 40(2): p. 389-95.
- 256. Xieraili, M., et al., Villin 1 is a predictive factor for the recurrence of high serum alphafetoprotein-associated hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *Cancer Sci*, 2012. 103(8): p. 1493-501.
- 257. Sun, L., et al., High-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: comparative clinicopathological study of large cell neuroendocrine carcinoma and small cell lung carcinoma. *Pathol Int*, 2009. 59(8): p. 522-9.
- 258. Sugita, T., et al., Abnormal alveolar cells in monocrotaline induced pulmonary hypertension. *Exp Lung Res*, 1983. 5(3): p. 201-15.
- 259. Wilson, D.W. and H.J. Segall, Changes in type II cell populations in monocrotaline pneumotoxicity. *Am J Pathol*, 1990. 136(6): p. 1293-9.
- 260. Reid, L., et al., The mysterious pulmonary brush cell: a cell in search of a function. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. 172(1): p. 136-9.
- 261. Meyrick, B. and L. Reid, The alveolar brush cell in rat lung--a third pneumonocyte. *J Ultrastruct Res*, 1968. 23(1): p. 71-80.
- 262. Chang, L.Y., R.R. Mercer, and J.D. Crapo, Differential distribution of brush cells in the rat lung. *Anat Rec*, 1986. 216(1): p. 49-54.
- 263. DiMaio, M.F., et al., Alveolar brush cells in an infant with desquamative interstitial pneumonitis. *Pediatr Pulmonol*, 1988. 4(3): p. 185-91.

- 264. Gordon, R.E. and M. Kattan, Absence of cilia and basal bodies with predominance of brush cells in the respiratory mucosa from a patient with immotile cilia syndrome. *Ultrastruct Pathol*, 1984. 6(1): p. 45-9.
- 265. Kasper, M., et al., Colocalization of cytokeratin 18 and villin in type III alveolar cells (brush cells) of the rat lung. *Histochemistry*, 1994. 101(1): p. 57-62.
- 266. Hofer, D. and D. Drenckhahn, Identification of brush cells in the alimentary and respiratory system by antibodies to villin and fimbrin. *Histochemistry*, 1992. 98(4): p. 237-42.
- 267. Laudi, S., et al., Comparison of lung proteome profiles in two rodent models of pulmonary arterial hypertension. *Proteomics*, 2007. 7(14): p. 2469-78.
- 268. Abdul-Salam, V.B., et al., Proteomic analysis of lung tissues from patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 2010. 122(20): p. 2058-67.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des Respirationstrakts den Menschen	1
Abbildung 2: Aufbau eines Interalveolarseptums	2
Abbildung 3: Aufbau der Gefäßwände von Arterien und Venen	3
Abbildung 4: Vaskuläre Veränderungen bei PAH	9
Abbildung 5: Molekulare Mechanismen des vaskulären Gefäßumbaus	10
Abbildung 6: Aktuelle und neue Therapieansätze zur Behandlung der PAH	16
Abbildung 7: Schematisierter Aufbau eines Massenspektrometers	21
Abbildung 8: Elektrospray Ionisierung (ESI).	22
Abbildung 9: Schematische Darstellung des LTQ Orbitrap Massenspektrometers	23
Abbildung 10: Schematische Darstellung eines SILAC-Experiments	24
Abbildung 11: Versuchsplan des SILAC-Fütterungsversuchs der Kontroll-, Placebo-	
und Imatinib-behandelten Tiere	33
Abbildung 12: Gewichtszunahme der Tiere während des Fütterungsversuchs	48
Abbildung 13: Hämodynamsiche Messungen zur Bestimmung der Ausprägung der PH,	
mit und ohne Imatinib-Behandlung	50
Abbildung 14: Exemplarisches MS ² -Spektrum des Peptids AINTQEVAVK des Proteins	
HIP-1	52
Abbildung 15: Durchschnittliche ¹³ C ₆ -Lysin Inkorporation aller detektierten Proteine	53
Abbildung 16: GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Lungen	
der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten.	55
Abbildung 17: GO-Term Veränderungen der biologischen Prozesse in den Lungen	
der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten.	57
Abbildung 18: GO-Term Veränderungen der molekularen Funktionen in den Lungen	
der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten.	59
Abbildung 19: GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Lungen	
der Imatinib-Ratten verglichen mit den Placebo-Ratten.	60
Abbildung 20: GO-Term Veränderungen der biologischen Prozesse in den Lungen	
der Imatinib-Ratten verglichen mit den Placebo-Ratten.	62
Abbildung 21: GO-Term Veränderungen der molekularen Funktionen in den Lungen	
der Imatinib-Ratten verglichen mit den Placebo-Ratten.	64
Abbildung 22: Heatmap zur veränderten Inkorporation (%) des ¹³ C ₆ -Lysin in den	
Kontroll-, Placebo- und Imatinib-Ratten.	66
Abbildung 23: Heatmap zur veränderten Inkorporation (%) des ¹³ C -Lysin in den	
Kontroll-, Placebo- und Imatinib-Ratten.	67
Abbildung 24: ¹³ C ₆ -Lysin Markierung der Proteine Dysferlin, Emilin-1, HIP-1, Septin-7	
und Villin in den Kontroll-, Placebo- und Imatinib-Ratten.	69
Abbildung 25: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für Dysferlin	71
Abbildung 26: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für Emilin-1	73
Abbildung 27: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für HIP-1.	75
Abbildung 28: Western Blot und immunhistochemische Färbungen für Septin-7.	77
Abbildung 29: Western Blot und Immunhistochemische Färbungen für Villin	79

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie	6
Tabelle 2: Placebo- und Imatinib-Lösung	35
Tabelle 3: GO-Term Veränderungen der zellulären Komponenten in den Lungen	
der Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten.	56
Tabelle 4: GO-Term Veränderungen der Biologische Prozesse in den Lungen der	
Placebo-Ratten verglichen mit den Kontroll-Ratten.	58
Tabelle 5: GO-Term Veränderungen der Biologische Prozesse in den Lungen der	
Imatinib-Ratten verglichen zu den Placebo-Ratten.	63
Tabelle 6: Gewichtszunahme der Ratten in den drei Versuchsgruppen	105
Tabelle 7: Futtermenge pro Tag pro Ratte	106
Tabelle 8: ¹³ C ₆ -Lysin-Inkorporation in bekannte PH-Mediatoren	108

11. Danksagung

Ich bedanke mich bei Prof. Ralph T. Schermuly für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe in Bad Nauheim und Gießen zu promovieren, sowie für die Überlassung dieses Themas, die Unterstützung und Betreuung während der Entstehung der Arbeit, und die Begutachtung dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Soni Savai Pullamsetti für die wissenschaftliche Betreuung, und ins Besondere für die Einführung in das Thema und die Methoden zu Beginn meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. Silke Meiners für die Anfertigung des Zweitgutachtens sowie bei Frau Prof. Dr. Katja Becker und Herrn Prof. Martin Diener für die Bewertung meiner Disputation.

Ein großer Dank geht an Dr. Marcus Krüger für die Planung, Messung, Auswertung und Diskussion der SILAC-Daten. Außerdem danke ich Aaron Ruhs für die Beantwortung aller Hintergrundfragen, die Datenanalyse und die Hilfe bei den Abbildungen. Bei Dr. Anne Konzer, Sylvia Jeratsch, Ellen Borowski und Soraya Hölper möchte ich mich für die Unterstützung bei der Probenaufbereitung im Labor der biomolekularen Massenspektrometrie am MPI bedanken.

Ich danke Dr. Aleksandra Tretyn, Dr. Swati Dabral, Dr. Yves Schymura und Uta Eule für eine wunderbar lehrreiche und witzige Zeit in Bad Nauheim.

Ich bedanke mich bei meinen BFS-Kollegen Dr. Kirsten Murmann, Dr. Astrid Weiss, Dr. Julia Neumann, Janina Kolb, Kerstin Gernert und Mario Böhm für immer gute Laune, viele gemeinsame Mittagessen und Kaffeepausen, Hilfe bei allen Fragen, viele aufmunternde Worte und die Ruhe zum Schreiben in unserem wunderbar bunten Büro.

Und ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Schermuly für die immer freundliche, lustige und konstruktive Zusammenarbeit.

Ich danke Tanja Enders für die tägliche Unterstützung bei den Fütterungsversuchen und Ewa Bieniek für die Färbungen.

Ein besonders großer Dank geht an Frau Dr. Wiebke Janssen für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die ständige Hilfe während der Planung und Entstehung dieser Arbeit, die hämodynamischen Messungen sowie die Beantwortung aller Fragen dazu, das geduldige Korrekturlesen dieser Arbeit und am wichtigsten: DANKE für die stetige Motivation, auch in Form von vielen Kaffeepausen, Gummitieren und Rasgón!

Ich danke Dr. Henning Gall für die Beantwortung der vielen klinischen Fragen und immer hilfreiche Unterstützung vom Beginn dieser Arbeit, und bis heute.

Ein riesengroßer Dank geht an alle meine Freunde, die Hannoveraner, die Au-Pair Mädels und die Gießener, die mich in den schweren und schönen Zeiten meines Lebens begleiten und mir immer zur Seite stehen.

Der allergrößte Dank aber gilt meiner Familie für ihre bedingungs- und grenzenlose Unterstützung. Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für die Freiheit und den Mut bedanken immer das zu tun was ich wollte. Ihr habt mich gelehrt dass das Leben bunt und wandelbar ist und es sich lohnt immer neugierig zu bleiben. 12. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

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