Die Rolle der Serin/Threonin-Proteinkinase DAPK1 in der pulmonalen Hypertonie

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

> vorgelegt von Caroline Anne Smith aus Frankfurt am Main

> > Gießen 2021

Aus dem Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen Exzellenzcluster Kardiopulmonales System Innere Medizin II

Betreuer: Prof. Dr. R. Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. M. Niepmann

Tag der Disputation: 15.11.2021

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	ì	- 1	1	-
			_	_

1.1 PULMONALE HYPERTONIE	- 1 -
1.1.1 DEFINITION	- 1 -
1.1.2 INZIDENZ, PRÄVALENZ, SYMPTOMATIK UND THERAPIE	- 2 -
1.1.3 Klassifikation	- 4 -
1.1.4 PULMONAL ARTERIELLE HYPERTONIE UND DER "CANCE	R-
LIKE"-PHÄNOTYP	-7-
1.2 DEATH-ASSOCIATED PROTEIN KINASE 1 (DAPK1)	· 12 -
1.2.1 DIE DAPK-FAMILIE	- 14 -
1.2.2 DIE DAPK1-STRUKTUR	· 17 -
1.2.3 DIE REGULATION VON DAPK1	- 21 -
1.2.4 SUBSTRATE UND EFFEKTOREN VON DAPK1	- 26 -

<u>1.3 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT</u> - 30 -

2. MATERIAL UND METHODEN _____- 33 -

2.1. MATERIAL ______ FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

2.1.1. LABORTECHNISCHE APPARATUREN & INSTRUMENTE

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DE	FINIERT.
2.1.2 VERBRAUCHMATERIALIEN	37 -
2.1.3 CHEMIKALIEN, REAGENZIEN & LÖSUNGEN	40 -
2.1.4 ZELLKULTURMEDIEN UND WEITERE SUBSTANZEN	44 -
2.1.5 ANTIKÖPER	45 -
2.1.6 PRIMER	47 -
2.1.7 Kits	50 -
2.2. METHODEN	52 -
2.2.1 TIERMODELL	52 -
2.2.2 ZELLKULTUREXPERIMENTE	53 -

2.2.3 PROTEINISOLATION UND WESTERN BLOT ANALYSE_	63 -
2.2.4 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR	73 -
2.2.5 IMMUNOFLUORESZENZ-FÄRBUNGEN	79 -
2.2.6 Statistische Methodik	85 -

3. ERGEBNISSE	- 86
J. LINGLDINIJJL	- 00

3.1 EXPRESSIONSMUSTER VON DAPK1 IN EXPERIMENTELLER	PH
	36 -
3.1.1 DAPK1-Expression IM MONOCROTALIN-RATTENMODE	ELL
8	36 -
3.1.1.1 mRNA- und Proteinexpression in	
Lungenhomogenaten und rSMCs 8	37 -
3.1.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von	
Lungenhomogenaten mit DAPK1 8	39 -
3.1.2 DAPK1-EXPRESSION IM NORMOXIE/HYPOXIE-MODELL	
90 -	
3.1.2.1 mRNA- und Proteinexpression in	
Lungenhomogenaten und mPASMCs 9	90 -
3.1.2.2 mRNA- und Proteinexpression in hPASMCs - 9	93 -
3.1.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen von	
Lungenhomogenaten mit DAPK1 9	94 -
3.2 EXPRESSIONSMUSTER VON DAPK1 IN KLINISCHER PH - 9) 5 -
3.2.1 mRNA- und Proteinexpression in humanem	
Lungenhomogenaten, mikrodissezierten Gefäßen und	d
hPASMCs 9	96 -
3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung von	
Lungenhomogenaten mit DAPK19	98 -
3.3 EINFLUSS VON WACHSTUMSFAKTOREN AUF DAS	
EXPRESSIONSMUSTER VON PDAPK UND DAPK1 IN HPASMO	Cs -
100 -	
3.3.1 DAPK1-Proteinexpression in hPASMCs nach 24-	
stündiger Wachstumsfaktor-Stimulation 10	0 -

3.3.2 pDAPK- und DAPK1-Proteinexpression in	
Stimulation	- 103 -
3.4 EFFEKT VON DAPK1 AUF DIE PROLIFERATION VON	_ 105
HUMANEN PASMCs	- 106 -
3.4.1 BrdU-Proliferationsassay	_ 107 -
4. DISKUSSION	- 108 -
	_ 100
4.1 ZUSAMMENFASSUNG DER HAUPTERGEBNISSE	111 -
4.2 DISKUSSION DER METHODEN	112 -
4.2.1 DAS TIERMODELL	112 -
4.2.2 DAS ZELLKULTURMODELL	120 -
4.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	123 -
4.3.1 DAPK1-EXPRESSIONSMUSTER IN EXPERIMENTELLER	R PH
4.3.2 DAPK1-Expressionsmuster in Klinischer PH	- 131 -
4.3.3 EINFLUSS EINER WACHSTUMSFAKTOR- STIMULATIC	– N AUF
DAS EXPRESSIONSMUSTER VON DAPK1 UND PDAPK IN	
нРАЅМСѕ	- 133 -
4.3.4 EFFEKT VON DAPK1 AUF DIE PROLIFERATION VON	-
HPASMCs	138 -
4.4 FAZIT	140 -
4.5 AUSBLICK	142 -
4.6. KLINISCHE PERSPEKTIVE	144 -
ZUSAMMENFASSUNG	<u>- 148 -</u>
SUMMARY	<u>- 150 -</u>
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	- 153 -

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	<u>- 157 -</u>
TABELLENVERZEICHNIS	158 -
	- 161 -
ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION	- 185 -
DANKSAGUNG	- 187 -

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

1.1.1 Definition

Der Begriff Pulmonale Hypertonie (PH) umfasst eine Vielzahl an Erkrankungen, die alle den hämodynamischen Zustand eines erhöhten Pulmonaldrucks aufweisen. Genauer ist Pulmonale Hypertonie definiert als eine Erhöhung des mittleren PAP (Pulmonal Arterieller Druck) ≥ 25 mmHg in Ruhe, gemessen durch eine Rechtsherzkatheter-Untersuchung [1]. Der Normwert des mPAP in Ruhe liegt bei 14 ± 3 mmHg, die Obergrenze stellt ein mPAP von 20 mmHg in Ruhe dar [2]. Hieraus ergibt sich eine Grauzone des mPAPs von 21-24 mmHg in Ruhe, welche noch nicht genauer klassifiziert ist und eine weitere, sorgfältige Beobachtung erfordert. Der Begriff der belastungsinduzierten PH wird derzeit nicht als Teil der PH-Definition geführt, da ein einheitliches Belastungsprotokoll sowie ein Cut-Off Wert für den mPAP unter Belastung aufgrund

fehlender Daten aktuell nicht genauer definiert werden kann [1][3][4][5][6].

1.1.2 Inzidenz, Prävalenz, Symptomatik und Therapie

Ungefähr 1 % der Weltbevölkerung sind von PH betroffen, in den über 65-jährigen wird sogar eine Prävalenz der PH von rund 10 % angenommen [3][7]. Allerdings unterscheiden sich die verschiedenen Formen der PH in Inzidenz und Prävalenz teils deutlich. So besaß die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) im Jahr 2014 eine Inzidenz von 3,9 Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohner und eine Prävalenz von 25,9 pro 1 Millionen Einwohner in Deutschland Die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie wies in demselben Inzidenz .lahr eine 4 von Neuerkrankungen pro 1 Millionen Einwohner in Deutschland auf [3][8].

Zu Beginn der Erkrankung zeigen Patienten zunächst eine sehr diskrete und unspezifische Symptomatik, welches eine verspätete Diagnosestellung begünstigen kann. Das Kardinalsymptom der PH stellt die zunehmende Belastungsdysphoe dar, die im weiteren Verlauf häufig durch Fatique (Erschöpfung), Angina Pectoris Beschwerden, Synkopen und peripherer Zyanose begleitet wird. Im weiteren Progress der Erkrankung kann es zu einer Rechtsherzinsuffizienz mit der typischen Klinik einer venösen Stauung, Aszites und peripheren Ödemen kommen. Unbehandelt die PH mittlere hat eine Überlebenszeit von 2-3 Jahren und führt durch ein Rechtsherzversagen zum Tode [3][4][9].

Da die PH weiterhin eine unheilbare Erkrankung darstellt, ist das Hauptziel der Behandlung die Eindämmung der Krankheit, d.h. die Stabilisierung des Zustandes Patienten auf einem des zufriedenstellenden klinischen Niveau ohne Anzeichen Rechtsherzversagens eines und idealerweise ohne Fortschreiten der Erkrankung. Die allgemeine Behandlung der PH erfolgt hauptsächlich symptomatisch und richtet sich nach Art und Schweregrad der Erkrankung. So erfolgt gegebenenfalls eine Sauerstofftherapie oder eine Anämie-Behandlung, die Kontrolle eines ausreichend bestehenden Impfschutzes sowie

Rehabilitationsmaßnahmen und Physiotherapie. Neben diesen Maßnahmen gibt es noch die Möglichkeit einer medikamentösen Therapie, die mittels 10 verschiedener Medikamente bestehend aus 5 Substanzklassen durchgeführt wird [3][4][9].

1.1.3 Klassifikation

Die Einteilung der PH erfolgte nach der Nizza-Klassifikation, bei der 5 Gruppen der PH nach klinischer Präsentation, pathologischen Befunden, Eigenschaften hämodynamischen und der Behandlungsstrategie unterschieden werden. Zum einen wird die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) differenziert. auf die im Weiteren genauer eingegangen wird. Zum anderen wird zwischen einer pulmonalen Hypertonie bei Linksherzerkrankungen, einer pulmonalen Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie, einer Chronisch thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) und einer Hypertonie mit unklaren und/oder pulmonale multifaktoriellen Mechanismen differenziert

Tabelle 1: Klassifikation der Pulmonalen

Hypertonie nach Nizza-Konferenz 2018

Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie (Nizza, 2018)
1. Pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) (3 %)
1.1 Idiopathische PAH
1.2 Hereditäre PAH
1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht
1.4 Assoziiert mit:
1.4.1 Bindegewebserkrankungen
1.4.2 Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus
1.4.3 Portaler Hypertension
1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
1.4.5 Schistosomiasis
1.5 Pulmonale veno-okklusive Erkrankung und/oder pulmonale Kapillare Hämangiomatose
1.6 Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
2. Pulmonale Hypertonie bei Linksherzerkrankungen (65 %)
2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion
2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion
2.3 Valvuläre Erkrankungen
2.4 Angeborene/erworbene Linksherz- Einfluss-/Ausflusstrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien

3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie (30 %)

3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

3.2 Interstitielle Lungenerkrankung

3.3 Andere pulmonale Erkrankungen mit gemischter restriktiver und obstruktiver Struktur

3.4 Alveoläre Hypoventilation

3.5 Chronische Höhenkrankheit

3.6 Anlagebedingte Lungenerkrankungen

4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) (2 %)

5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen (<1 %)

5.1 Hämatologische Störungen: chronische hämolytische Anämie,

myeloproliferative Störungen, Splenektomie

5.2 Systemische und metabolische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher,

5.3 Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen unter Dialyse, segmentale pulmonale Hypertonie

5.4 Komplex angeborene Herzerkrankungen

1.1.4 Pulmonal arterielle Hypertonie und der "Cancer-like"-Phänotyp

Die PAH stellt die erste Klassifikationsgruppe der PH dar und wird in 5 weitere Untergruppen unterteilt. Hierzu gehört die idiopathische PAH (IPAH), die hereditäre PAH, welche häufig mit Mutationen im Bone-Morphogenetic-Protein-Receptor Tvp 2 assoziiert ist. sowie die Medikamenten- oder Toxin-induzierte PAH, als auch die mit anderen Erkrankungen (z.B. Kollagenosen, Humane Immundefizienz-Virus (HIV)-Infektion, Schistosomiasis) assoziierte PAH [9][10][11][12][13].

Hämodynamisch charakterisiert wird die PAH durch eine präkapilläre pulmonale Hypertonie mit einer Erhöhung des mPAP \geq 25 mmHg, einem endexpiratorisch pulmonal-kapillärer Verschlussdruck (PAWP) \leq 15 mmHg und einem erhöhten pulmonal vaskulären Widerstand (PVR) > 3 Wood Units [1][3][5][6]. Histopathologisch betrachtet ist die PAH durch das Trias einer pulmonalen Vasokonstriktion, Thrombosen und eines vaskulären Remodelings aller

Gefäßwandschichten gekennzeichnet [4][14][15]. Letzteres involviert typischerweise die kleinen Pulmonalgefäße und setzt sich unter anderen aus einer Media-Hypertrophie, einer exzentrischen und konzentrischen Intimafibrose, sowie sogenannten plexiformen Läsionen zusammen [4][9][11][16]. Diese bestehen aus Endothelzellen. Matrixproteinen und Fibroblasten. welche zusammen eine Obliteration des Gefäßlumens bedingen [17].

Des Weiteren besteht bei der PAH zudem ein Ungleichgewicht von vasokonstriktiven und vasodilatativen Faktoren. welches das histopathologische Trias der PAH zusätzlich verstärkt. Prostazyklin stellt einen zentralen Baustein der vasodilatativen Faktoren dar, und ist bei der PAH vermindert. Gegensätzlich hierzu sind vasokonstriktive Faktoren wie beispielsweise Thromboxan oder Endothelin erhöht [4][18][19]. Eine pulmonale Vasokonstriktion. vaskuläre Proliferation, Thrombosen sowie inflammatorische Prozesse liegen somit der Entwicklung einer PAH zugrunde bzw. begünstigen diese [9].

Zudem zeigt sich, dass die PAH eine Erkrankung darstellt. welche durch eine übermäßige Proliferation und eine verminderte Apoptose aekennzeichnet ist und hierdurch einiae Homologien zu Neoplasien aufweist [20][21]. So haben mehrere Forschungsgruppen demonstrieren können, dass die bei der PAH beobachteten Veränderungen Ähnlichkeit zu den in Malignomen beobachteten Veränderungen aufweisen [21][22][23][24]. Bei diesen Hauptobservationen handelt es sich im Genaueren um folgende: die bereits angesprochene übermäßige Proliferation von glatten pulmonalarteriellen Muskelzellen (SMC) [25][26][27], sowie eine Apoptose-Resistenz der SMC [28] und eine verstärkte Expression von Krebsmarkern in Pulmonalgefäßen [23][29].

Durch Hanahan und Weinberg werden zudem 8 Eigenschaften beschrieben, die für eine Transformation einer gesunden Zelle in eine maligne Zelle benötigt werden. Diese lauten: 1. Autarkie Wachstumssignalen, 2. von Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumsinhibitoren, 3. Umgehung der Apoptose,

- 9 -

4 5 Unbegrenztes Replikationsspotential, Dauerhafte Angiogenese, 6. Gewebsinvasion und Metastasierung, 7. Metabolischenergetische Modifikationen und 8. Umaehuna von Immunantworten[30]. Diese Eigenschaften werden von fast allen Arten von Malignomen geteilt, und geben einen Einblick in die Homologie zwischen PAH und Krebs. So konnte nämlich gezeigt werden, dass pulmonal-vaskuläre Zellen von Patienten mit PAH 7 dieser 8 Eigenschaften teilen und damit einen "Cancer-like Phenotyp" aufweisen (siehe Abbildung 1) [20][31][32].

Schlussendlich handelt es sich bei PAH jedoch nicht um eine Krebserkrankung, da bei der PAH weder eine Gewebsinfiltration noch eine Metastasierung beobachten werden kann.

Diese Eraebnisse führen zu einem neu entstehenden Paradigma in der PAH-Pathologie und könnten die Möglichkeit eröffnen, die zur Krebs Behandlung von verwendeten therapeutischen Strategien zu kombinieren und für die Therapie der PAH einzusetzen. Diesem Ansatz folgend ist es notwendig, bereits bekannte Mechanismen oder Schlüsselenzyme in der Krebsentstehung genauer zu untersuchen, um deren Relevanz bezüglich der Entstehung der PAH nachvollziehen zu können und um eventuelle therapeutische Angriffspunkte zu finden.



Abbildung 1: Der "Cancer-like-Phänotyp" in PAH. Die bei PAH beobachteten Effekte erfüllen sieben der acht von Hanahan und Weinberg vorgeschlagenen Krebseigenschaften. Aus Delom F. Fessart D. et. al.; 2014

1.2 Death-associated Protein Kinase 1 (DAPK1)

1.2 Death-associated Protein Kinase 1 (DAPK1)

DAPK1 ist eine pro-apoptotische Serin/ Threonin-Proteinkinase, die zu der Super-Familie der Calcium/ Calmodulin-regulierten Proteinkinasen gezählt wird, eine Vielzahl zellulärer Prozesse reguliert und deren Aktivitäten in Caspaseabhängigem und unabhängigem Zelltod, Autophagie, Zelladhäsion, Membran-Blebbing und Migration konvergieren [33].

Die Dysfunktion von DAPK1 beziehungsweise die Dysfunktion der in Bezug zu DAPK1 stehenden Signalwege, werden zugleich mit diversen Erkrankungen wie Krebs [34], Hirninfarkt [35] und Inflammation [36] in Verbindung gebracht.

DAPK1 wurde erstmalig 1995 als ein Mediator der IFN-gamma induzierten Apoptose in Hela-Zellen entdeckt [37]. Ihre Rolle als Tumorsupressor wurde

daraufhin durch zwei wesentliche Forschungsergebnisse etabliert: Embryonale Maus-Fibroblasten von DAPK1 -/-Mäusen zeigte aufgrund einer insuffizienten Aktivierung des p19ARF-p53 Signalweges eine verrinaerte apoptotische Antwort auf die Überexpression von Onkogenen wie c-myc oder E2F. Zum anderen stellte fest. dass in Lewisman die Lungenkarzinomzellen ledialich stark metastasierten Klone einen Verlust der DAPK1aufwiesen und dass Expression eine Wiederherstellung von DAPK1 in diesen Zellen die Bildung von Metastasen in Mäusen supprimierte [38][39][40]. Diese Ergebnisse bestärkten die Annahme, dass DAPK1, durch deren Eigenschaft, gegenüber apoptotischen Signalen zu Zellen sensibilisieren, als ein Tumorsuppressor agiert und zudem die zelluläre Transformation in frühen Phasen der Tumorentstehung supprimiert [41][40][42]. Überdies zeigte sich in der Mehrheit anschließender Studien, dass in einem breiten Krebsformen Spektrum von eine signifikant verminderte Expression von DAPK1 vorherrscht, die hauptsächlich auf eine DNA-Methylierung von DAPK1 im Bereich 5'UTR zurück zu führen ist [43]. Diese Daten legen nahe, dass DAPK1 eine wichtige, kausale Rolle in der Tumorentstehung spielen könnte.

1.2.1 Die DAPK-Familie

In den letzten Jahren haben sich zahlreiche Forschungsgruppen den Bemühungen angeschlossen, DAPK1s zelluläre Funktionen, ihre biochemischen Eigenschaften und Struktur sowie ihre Regulation und Substrate zu entschlüsseln. Inzwischen ist bekannt, dass DAPK1 einer Familie eng verwandter Kinasen angehört, die eine hohe Homologie zur Familie der MLCK (Myosin-leichte-Ketten-Kinasen) aufweist [41], mit dem Zelltod in Verbindung gebracht werden und aus folgenden Mitgliedern besteht: DAPK1, DRP-1 (DAPK-related protein-1, auch bekannt als DAPK 2) [44][45], ZIPk (ZIP-Kinase, auch bekannt als DAPK3) [46][47] DRAK1 (DAP-kinase-related apoptosissowie inducing protein kinase 1) und DRAK2 [48]. Die Mitglieder des DAPK-Familie weisen eine hohe Sequenzhomologie in ihren N-terminalen

katalytischen Domänen auf, während sich die Strukturen ihrer C-terminalen Regionen unterscheiden (siehe Abbildung 2) [41][42][44][45][46][47]. So besitzt DAPK1 zu DRP-1 sowie zu ZIPk im Bereich der katalytischen Domäne beispielsweise eine hohe Homologie (80 % Identität auf dem Aminosäuren-Level). Etwas entfernter verwandt hingegen ist DAPK1 mit DRAK1 und DRAK2. dessen katalytische Domänen nur zu etwa 50 % identisch zu DAPK1 sind (50 % Identität Aminosäuren-Level). auf dem Die hoch konservierte katalytische Domäne der DAPKbegründet Familie dadurch verschiedene Eigenschaften, inklusive einiger gemeinsame gemeinsamer Substrate und ähnlicher funktioneller Effekte [42]. Jedoch unterscheiden sich die Familienmitglieder stark in ihren extra-katalytischen Domänen, die ieder Kinase spezielle Eigenschaften verleiht sowie Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation hat



Abbildung 2: Die DAPK-Familie. Dargestellt sind die Proteindomänen der Mitglieder der DAPK-Familie. Die Zahlen über den Proteinen bezeichnen die Aminosäureposition der jeweiligen Domäne. Die Quantitäten innerhalb der katalytischen Domänen den Grad der Aminosäurenidentität qeben gegenüber der katalytischen Domäne von DAPK1 Chromosomenbezeichnungen für die an. menschlichen Orthologe sind angegeben. Abkürzung: NLS, Nuclear localization signal. Aus Bialik, Kimchi: 2006

1.2.2 Die DAPK1-Struktur

1.2.2 Die DAPK1-Struktur

Wie bereits angedeutet besteht DAPK1 aus multiplen Domänen, einschließlich der N-terminalen Kinase-Domäne katalytischen sowie einer Ca2+/Calmodulin autoregulatorischen Domäne. acht Ankyrin-Repeats, einer Zvtoskelett-Bindungsdomäne und einer Death-Domäne, die zusammen an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind und auf die detaillierter nun eingegangen werden soll (siehe Abbildung 3).

Die katalytische Domäne von DAPK1, die am N-Terminus des Proteins lokalisiert ist, setzt sich aus 11 typischen Subdomänen einer Serin/ Threonin-Proteinkinase zusammen.

Weiterhin konnte durch röntgenstrukturanalytische Untersuchungen gesichert werden, dass die Kristallstruktur DAPK1s beeindruckende 1,5 A besitzt und weitere Hinweise bezüglich der Mechanismen der Aktivierung, DAPK1s Interkation mit Substraten und potentiellen Inhibitoren liefert [49]. So konnte ein hoch organisierter, stark positiver "Loop" identifiziert werden, der sich am oberen Pol der katalytischen Domäne befindet und ein einzigartiges Merkmal der DAPK-Familie darstellt und somit als "Fingerabdruck" der Familie angesehen werden kann [41][42][44][49].

Der katalytischen Domäne nachgeschaltet befindet sich die Ca2+/Calmodulin-autoregulatorische Domäne. Sie ist typischerweise innerhalb des katalytischen Spalts positioniert, wodurch sie als ein auto-inhibierendes Pseudosubstrat fungiert. Kommt Interaktion von Calmodulin es zur mit der autoregulatorischen Domäne, so führt dies zu Konformationsänderungen, welche eine Entfernung der Ca2+/Calmodulin-autoregulatorischen Domäne aus dem katalytischen Spalt nach sich zieht und somit den Zugang für Substrate ermöglicht [41][42][50][51]. Auf diese Weise verbindet der Calmodulin-vermittelte Regulationsmechanismus die Aktivität von DAPK1 mit Signalen, die eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration involvieren

Die Steuerung der Zugänglichkeit des katalytischen Spalts wird durch einen zusätzlichen Regulierungsmechanismus unterstützt, der mit einer Auto-Phosphorylierung von Ser308 in der Calmodulin-autoregulatorischen Domäne einhergeht [51]. Diese Phosphorylierung hat eine hemmende Wirkung, da es das Docking der Domäne innerhalb autoregulatorischen der Substratbindungsseite weiter stabilisiert und zudem deren Affinität zu Calmodulin verringert [51]. Somit sind also 2 Schritte erforderlich, um die Kinase vollständig zu aktivieren: die durch erhöhtes intrazelluläres Calcium induzierte Bindung von Calmodulin die Ca/Calmodulinan autoregulatorische Domäne die sowie Dephosphorylierung Ser308. Die von Dephosphorylierung von Ser308 ist ein häufiges Ereignis, dass durch verschiedenste Stimuli. einschließlich $TNF-\alpha$ Stimulation [52]. ER (Endoplasmatisches Retikulum) -Stress [53] oder Hypoxie/Ischämie [54] verursacht wird.

Ein weiteres interessantes Merkmal von DAPK1 besteht darin, dass die katalytische Domäne nur einen kleinen Abschnitt des gesamten Proteins ausmacht. Die verbleibenden Abschnitte des Proteins haben wichtige funktionelle Implikationen,

beispielweise bezüglich der Lokalisation des Proteins innerhalb der **Zelle** oder dessen Regulationsmechanismen. Zwei mutmaßliche P-Loops, deren Funktion derzeit noch unbekannt ist. befinden sich jeweils an den Positionen 639-646, sowie 695-702 Überschneidend mit dem zweiten dieser P-Loops befindet sich die Cytoskeletal-Interacting-Domäne, die die Kinase nachweislich mit dem Actin-Zytoskelett verbindet [55][56].

Der katalytischen Domäne bzw. der Ca/Calmodulin autoregulatorischen Domäne folgt eine Serie aus 8 Ankyrin-Repeats. Diese Ankyrin-Repeats stellen ein Protein-Protein-Interaktionsmotiv dar. das bei zytoskeletalen Proteinen häufig ist und zudem für die richtige Lokalisation des Proteins bezüglich der Actin-Stress-Fasern, sowie für die zellulären Effekte des Proteins erforderlich ist [55]. Der C-Terminus von DAPK1 umfasst zum einen die Death-Domäne als auch das darauffolgende, aus 17 Aminosäuren bestehende Ende des Proteins, das aus zahlreichen Serin-Wiederholungen zusammengesetzt ist. Jenes ist ebenfalls ein häufiger Bestandteil von Proteinen, die über eine Death-Domäne verfügen [57]. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass eine Deletion der Death-Domäne DAPK1s Fähigkeit zur Induktion von Zelltod verringert, was darauf hindeutet, dass die Death-Domäne bezüglich der pro-apoptotischen Funktionen DAPK1s essentiell zu sein scheint [58].

Untersuchungen des C-terminalen Aminosäuren-Endes ergaben, dass dieses eine gegensätzliche intrinsische Eigenschaft aufweist. So führte eine Deletion der letzten 17 Aminosäuren des Proteins zur Steigerung der pro-apoptotischen Effekte von DAPK1 [59]. Dem zufolge hat das C-terminale Ende eine auto-inhibierende Wirkung auf die Kinase und weiteren stellt SO einen wichtigen autoinhibierenden Regulationsmechanismus dar, der für die pro-apoptotischen Funktionen des Proteins relevant ist [42].

1.2.3 Die Regulation von DAPK1

Die konstitutive Anwesenheit des potentiell proapoptotischen Proteins DAPK1 in normalem Gewebe und Zellen setzt eine enge Regulation des Proteins voraus, welche einerseits die Inaktivierung DAPK1s in wachsenden Zellen aufrechterhält und andererseits eine effiziente Aktivierung des Proteins auf pro-apoptotische Signale ermöglicht (siehe Abbildung 3). Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 erläutert, führt die Bindung des Calcium-aktivierten Calmodulins und die Dephosphorylierung von Ser308 zur Aktivierung der Kinase. Die Kombination dieser zwei Regulationsmechanismen verleiht DAPK1 die nötige Spezifität, um eine gezielte Aktivierung der Kinase zu gewährleisten. Ferner wird die Spezifität der DAPK1-Aktivierung durch weitere Mechanismen vervollständigt. So handelt bei der für die es sich beispielsweise Dephosphorylierung von Ser308 verantwortlichen Phosphatase um PP2A (Protein-Phosphatase 2) Die DAPK1-PP2A-Interaktion wird [33][60]. weiterhin durch einen 3. Faktor unterstützt, der DAPK1 direkt bindet, UNC5H (Netrin-1-Rezeptor). Das ungebundene UNC5H bindet DAPK1 und PP2A, was zur Dephosphorylierung von Ser308, zur Aktivierung DAPK1s und DAPK1-abhängiger Apoptose führt [33][61][62]. Dadurch stellt UNC5H einen zusätzlichen Regulationsmechanismus der Dephosphorylierung von Ser308 und damit der Aktivierung von DAPK1 dar.

Zugleich wurde eine 3. Ebene der intramolekularen Regulation der katalvtischen Domäne von DAPK1 identifiziert. Sie involviert die ROC (Ras of Compley proteins) -COR (C-terminal of ROC) -Domäne von DAPK1. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die ROC-COR-Domäne zu einer Bindung und Hydrolyse von GTP kommt sowie dass ein Verlust GTP-Bindung der DAPK1s Fähigkeit zur Ser308 direkt Autophosphorylierung an beeinträchtigt [63]. Demzufolge induziert die Bindung von GTP an die ROC-COR-Domäne eine Inhibierung der Kinase. Somit würde eine Hydrolyse von GTP zu GDP als ein Regulationsmechanismus fungieren, der durch intramolekulare Mechanismen zu einer Aktivierung der Kinase führt.

Zugleich hat die Death-Domäne, wie in Abschnitt 1.2.2 angedeutet, ebenfalls Auswirkungen auf die Aktivität von DAPK1. Bei der Kinase, die an diesem Regulationsweg beteiligt ist, handelt es sich um ERK (extracellular signal-regulated kinase). Die Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-ERK-Signalweges kann je nach Kontext eine hemmende oder aktivierende Wirkung auf DAPK1 ausüben. Zum einen bindet ERK an die Death-Domäne und phosphoryliert DAPK1 an Ser735 innerhalb der ROC-Domäne [64]. Diese Modifikation führt zu einer verstärkten katalytischen Aktivität von DAPK1 bezüglich dessen Substrat MLC (mvosin-lightchain). Ihre hemmende Wirkung übt ERK hingegen über die Aktivierung des Ras-MAPK-FRK-Signalwegs durch PMA (phorbol 12-myristate 13-Dies induziert eine verstärkte acetate) aus. Interaktion zwischen DAPK1 und dem downstream Effektor von ERK, RSK (Ribosomal Protein S6 Kinase). RSK phosphoryliert DAPK1 an Ser289 innerhalb der Ca/Calmodulin-autoregulatorischen Domäne, was, wie sich zeigte, einen inhibitorischen Effekt auf die zelluläre Aktivität von DAPK1 ausübt [65].

Durch diese zahlreichen Studien und die daraus gewonnenen Erkenntnisse kann man schließen, dass verschiedenste Kinasen die katalytischen und zellulären Aktivitäten von DAPK1 durch ihre Wechselwirkungen mit verschiedenen Domänen und Modifikationen durch spezifische Signalproteine regulieren können.



Abbildung 3: Schematische Darstellung der DAPK1-Proteinstruktur sowie des DAPK1-Interactoms stromaufwärts. Dargestellt sind bekannten funktionellen Domänen von DAPK1. Darstellung der verschiedenen Proteine, die mit DAPK1 interagieren und diese regulieren, und der Reize, die den Regulierungsmodus aktivieren, sofern bekannt (gestrichelte Pfeile). Einige Interaktoren modifizieren DAPK1 durch Phosphorylierung Dephosphorylierung (gekrümmte Pfeile), wodurch die katalvtische Aktivität von DAPK1 verstärkt (blau) oder abgeschwächt (rot) wird. (Andere Interaktoren vermitteln die Ubiquitinierung (Ub) von DAPK (grün) und beeinflussen dadurch die Proteinstabilität und den Proteinabbau.) Proteine, von denen gezeigt wurde, dass sie DAPK1 direkt über eine spezifische Region binden, befinden sich oberhalb oder unterhalb dieser Domäne von DAPK1. CaM Auto-Reg.: autoregulatorische Abkürzungen: Calmodulin-Domäne. DD: Death-Domäne. ROC: Ras of complex proteins domain, COR: C-terminal der ROC-Domäne. Aus Bialik, Kimchi; 2013

1.2.4 Substrate und Effektoren von DAPK1

DAPK1 wird mit der Regulation verschiedener in Verbindung zellulärer Prozesse gebracht. einschließlich Kaspase-abhängigem als auch unabhängigem Zelltod. Autophagie oder Zelladhäsion. Die Identifizierung der spezifische Signalwege und der mit DAPK1 interagierenden Proteine, die sich stromabwärts von DAPK1 befinden, ist für das Verständnis der molekularen Mechanismen der Funktionen von DAPK1 von entscheidender Bedeutung. Die große Mehrheit der DAPK1-Funktionen wird durch die Zielproteine Phosphorylierung verschiedener vermittelt, so dass ein erheblicher Teil des DAPK1-Interactoms aus seinen Substraten besteht (siehe Abbildung 4). Hier soll nur auf einige Komponenten des DAPK1-Interactoms eingegangen werden, die an den pro-apoptotischen Funktionen von DAPK1 beteiligt sind.

In Bezug auf seine pro-apoptotische Funktionen partizipiert DAPK1 beispielsweise durch seine Wechselwirkung mit dem N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Glutamatrezeptor an zerebralen Ischämieinduzierten neuronalen Schädigungen [35].

Weiterhin hat DAPK1, welches wie bereits erläutert über seine verschiedenen Domänen mit dem Aktin-Zvtoskelett verbunden ist. ebenfalls einiae Zytoskelett-assoziierte Substrate, einschließlich MLC [55][56] und Tropomyosin [66]. Diese tragen dessen Zytoskelett-bezogenen Wirkungen, zu einschließlich Membran-Blebbing und Zellmotilität, durch Stressfaserformationen bei. Beclin 1 [67] und PKD (Protein Kinase D) [68], beides Substrate von DAPK. vermitteln hingegen DAPKs Effekte bezüglich Autophagie. Beide Proteine interagieren mit und werden von DAPK1 phosphoryliert, was zu deren Aktivierung führt.

relevanter **Bestandteil** Fin zusätzlicher des nachgeschalteten DAPK1-Interactome ist Pin 1 (Peptidyl-propyl-Isomerase NIMA interacting-1). DAPK1 phosphoryliert Pin1 an Ser71 und hemmt so dessen Prolyl-Isomerase-Aktivität und nukleare Lokalisation [33][69]. Weiterhin hemmt DAPK1 die Fähigkeit Pin1 von onkogene Transkriptionsfaktoren zu aktivieren sowie die Transkription von Cyclin D1 und die Cyclin D1Proteinstabilität zu erhöhen. Interessanterweise fördert die Überexpression von Pin1 Tumorwachstum. Somit stellt DAPK1, als einer der endogenen Inhibitoren von Pin1, ein potentieller Inhibitor der Zellzyklusprogression dar.

Schlussendlich ist ein weiteres Protein zu nennen, das eine zentrale Rolle in DAPK1s proapoptotischen Funktionen spielt: p53. Die Aktivierung des Tumorrepressorproteins p53 führt zu einer Erhöhung der DAPK1-Expression [70], Inaktivierung von eine DAPK1 die während Induktion des p19ARF / p53-Signalwegs reduziert und so den p53-abhängigen Apoptoseweg einschränkt [40][71]. Hieraus lässt sich ein Feedback-Loop antizipieren, in dem sich DAPK1 und p53 gegenseitig aktivieren und folglich der Verlust von DAPK1 zu einer Dämpfung von p53abhängigen pro-apoptotischen Signalen führen kann.

Das DAPK1-Interactome ist, wie aus den hier präsentierten Daten ersichtlich, groß und multifunktional. Jedoch kann es bei weitem nicht als vollständig angesehen werden, da es bis dato weiterhin viele ungeklärte Funktionen DAPK1s gibt, die noch keinem spezifischen Substrat oder Effektor zugeordnet werden konnten und weiterer Forschung bedürfen.



Abbildung 4: Das DAPK1-Interactom stromabwärts. Schema der Effektoren und Substrate von DAPK1 und der von ihnen vermittelten Signalwege (schwarze Linien). Kinase / Substrat-Wechselwirkungen werden durch rote Linien und P. kinase-unabhängige Wechselwirkungen nur durch eine rote Linie angezeigt. Gestrichelte rote Linien führen zu indirekten Effektoren und Bahnen, bei denen der direkte Interaktor / das Substrat noch nicht bekannt ist. Schwarz gestrichelt Linien sind bekannte Funktionen, die durch DAPK1-Effektoren vermittelt werden. für die nicht bestätigt wurde, dass sie DAPK1-abhängig sind. Die Effektoren sind nach verwandten Funktionen gruppiert gekennzeichnet: und farblich Immunreaktion (Purpurschattierungen), Zytoskelettfunktionen (Blautönen), Onkogenese (Grüntönen), Autophagie und Zelltod (Rosa) führen. Aus Bialik, Kimchi; 2013

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Serin/Threonin-Proteinkinase DAPK1 Die stellt einen wichtigen pro-apoptotischen Tumorsupressor dar, der bei der Regulation zellullärer Prozesse beteiligt ist, die unter anderem zu Kaspaseabhängigem unabhängigem **Zelltod** und (Apoptose), Autophagie und Migration führen können. Die kausative Rolle von DAPK1 in der Tumor-Entstehung und -Progression war Gegenstand zahlreicher Studien. So konnte gezeigt werden, dass in einem breiten Spektrum von Krebsformen eine Verminderung der Expression von DAPK1 vorliegt [43]. PH weist diesbezüglich deutliche Homologien zu Neoplasien auf und teilt eine Vielzahl an Eigenschaften, denen bei der Krebsentstehung eine zentrale Bedeutuna zukommen. So weisen beide Krankheitsentitäten beispielsweise ein erhöhtes Proliferations- und vermindertes Apoptoseverhalten auf [20][21].

Welche Rolle DAPK1 jedoch in PH spielt, wurde bisher nicht untersucht und soll Gegenstand dieser
Arbeit sein Ziel dieser Arbeit war es daher zu eruieren, ob es in PH zu einer dysregulierten Expression von DAPK1 kommt und ob diese eine Reihe nachgeschalteten Signalwegen von beeinflusst, welche mit der Vermeidung der Apoptose oder unkontrollierter Hyperproliferation von Lungengefäßzellen in Zusammenhang stehen. Hierfür sollte das Expressionsmuster von DAPK1 in klinischer PH experimenteller und sowie anschließend der Einfluss von DAPK1 auf das Proliferationsverhalten von PASMCs (Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells) untersucht werden.

Der erste Abschnitt der Arbeit fokussierte sich deshalb zunächst auf die Beleuchtung der DAPK1-Expression in experimenteller PH anhand des MCTund des chronischen Hypoxie-Tiermodells. Hierfür wurden Immunofluoreszenzfärbungen, qRT-PCR-Analysen und West-Blot-Analysen durchgeführt.

Im darauffolgenden Teil wurde das nun Expressionsmuster von DAPK1 in klinischer PH untersucht. Zur Komplementierung der Daten wurde in diesem Rahmen der Fffekt von Wachstumsfaktor-Stimulationen auf die DAPK1Phosphorylierung sowie die DAPK1-Expression in hPASMCs analysiert.

Abschließend erfolgte die Untersuchung des Einflusses von DAPK1 bezüglich des Proliferationsverhalten in hPASMCs. Dabei sollte vorrangig untersucht werden, ob eine Inhibierung von DAPK1 mittels siRNA einen Einfluss auf die Proliferationsrate hPASMCs ausübt. Als in geeignete Methoden kam hier das Proliferationsassay mit Bromdesoxuridin (BrdU) zum Einsatz.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Labortechnische Apparaturen & Instrumente

Tabelle 2: Labortechnische Apparaturen &Instrumente

Terminus	Herkunft
BTD fixed block system for microtubes	Grant Instruments, Shepreth, UK
CELLGARD NU-480	ibs tecnomara, Fernwald
Direct-Q® Wasseraufbereitungssys tem	Merck KGaA, Darmstadt
Entwicklungsmaschine CP 1000	Agfa, Mortsel, Belgien
Eppendorf Research® plus, 12-Kanal, 10 – 100 µL	Eppendorf AG, Hamburg

Eppendorf Research® plus, 0.5 – 10 μL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 10 – 100 μL	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research® plus, 100 – 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, DE
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000	KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Heracell™ 150i (5 % CO2, 21 % O2, 37°)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Heracell™ 150i (5 % CO2, 5 % O2, 37 °)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Magnetrührer IKA C- MAG HS7	IKA, Staufen
Magnetrührer MR-Hei- Mix S	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer MR-Hei- Standard	Heidolph, Schwabach
Magnetstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe

Mikroplatten Lesegerät Infinite M200	TECAN, Männedorf, Schweiz
Mikroskop DM IL in Zellkultur	Leica, Wetzlar, DE
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Mx3000P qPCR System	Aligent, Kalifornien, USA
Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab, VWR Life Science Competence, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH
pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
PowerPac™ HC High- Current Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Shaker WT16	Biometra GmbH, Göttingen

Shaker WT17	Biometra GmbH, Göttingen
Sicherheits- Absaugsystem VACUSAFE Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage (Präzisionswaage)	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Waage XS205 Dual Range (Analysenwaage)	Mettler Toledo, Ohio, USA
Wasserbad in Zellkultur	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
XCell SureLock [™] Electrophoresis Cell	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Zentrifuge Rotina 420R	Andreas Hettich GmbG & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco Biofuge	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA

2.1.2 Verbrauchmaterialien

Tabelle 3: Verbrauchmaterialien

Terminus	Herkunft
15 ml Gefäß	Greiner, Kremsmünster, Österreich
50 ml Gefäß	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® ULTRA plus	Langenbrink, Bern, Schweiz
Alufolie	Carl Roth, Karlsruhe
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Illinois, USA
Deckgläser	Langenbrink, Bern, Schweiz
Grade 3MM Chr Blotting Paper	GE Healthcare, Illinois, USA
Hypercassette	GE Healthcare, Illinois, USA
Nitrocellulose Membrane	Bio-Rad, Kalifornien, USA

Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht,
0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Deutschland
Mikroreaktionsgefäße, DNase/RNase frei 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NuPAGE Novex 3-8	Gibco, Life
%Tris-Acetat Gel 1,5	Technologies,
mm	Carlsbad, USA
NuPAGE Novex 3-8	Gibco, Life
%Tris-Acetat Gel 1,0	Technologies,
mm	Carlsbad, USA
Objektträger	Langenbrink, Bern, Schweiz
Parafilm M 100 mm x 38	Bemis Company Inc.,
m	Wisconsin, USA
Pasteur-Pipetten Glas	VWR, Pennsylvania,
230 mm	USA
Pasteur-Pipetten Plastik,	VWR, Pennsylvania,
5 ml steril	USA
Pasteur-Pipetten Plastik,	VWR, Pennsylvania,
5 ml lose	USA
Pipettenspitze 10 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sarogold®-foil	Carl Roth, Karlsruhe
Supported Nitrocellulose Membrane	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Zellkultur 6 cm Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur 10 cm Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur 6-Well-Platten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur 24-Well- Platten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur 96-Well- Platten	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber, klein 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, normal 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner, Kremsmünster, Österreich

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien & Lösungen

Tabelle 4: Chemikalien, Reagenzien &

Lösungen

Terminus	Herkunft
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma, Missouri, USA
Acrylamid [30 %]	Carl Roth, Karlsruhe
APS [10 %]	Sigma, Missouri, USA
beta-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Serva, Heidelberg
BSA Standard Quick Start (Bovine Serum Albumin)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Deutschland
Cell Lysis Buffer (10 x)	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA
DAPI	Sigma, Missouri, USA
GeneAmp [™] dnTP Blend (10 mM)	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Destilliertes Wasser	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA

DPBS ohne Ca & Mg	PAN Biotech, Aidenbach
Ethanol 70 %	Fischar Otto GmbH & Co. KG, Deutschland
Ethanol 96 %	Sigma, Missouri, USA
Ethanol >99,8 %	Sigma, Missouri, USA
Formaldehyd	Sigma, Missouri, USA
Gelatin	Sigma, Missouri, USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HCI	Sigma, Missouri, USA
KCL (3 M)	Mettler Toledo, Ohio, USA
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Methanol	Sigma, Missouri, USA
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl 0,9 %	Sigma, Missouri, USA
NaOH > 98 %	Sigma, Missouri, USA
NuPAGE LDS-Loading Dye 4 x	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA

NuPAGE Sample Reducing Agent	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
NuPAGE Tris-Acetat Buffer 20 x	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
Penicillin- Streptomycin, 10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, DE
pH Puffer 4,0; 7,0; 9,2	Mettler Toledo, Ohio, USA
Precision Plus Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories, Inc., Deutschland
ProLong Gold Antifade Mountant	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
RIPA Lysis and Extraction Buffer	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA

RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Röntgenentwicklerlösu ng UNIMATIC-D	Calbe Chemie GmbH, Salbe
Röntgenfixierlösung UNIMATIC-F	Calbe Chemie GmbH, Salbe
SDS [20%] (Lösung)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Stripping buffer	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
TEMED	Sigma, Missouri, USA
Tergitol NP-40	Sigma, Missouri, USA
TRIS base	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma, Missouri, USA
Trypan Blue Solution	Sigma, Missouri, USA
Tween 20	Sigma, Missouri, USA
Xylol rein	Carl Roth, Karlsruhe
Ziegen Serum	Sigma, Missouri, USA

2.1.4 Zellkulturmedien und weitere Substanzen

Tabelle 5: Zellkulturmedien und weitere

Substanzen

Terminus	Herkunft
DPBS	PAN Biotech, Aidenbach, DE
DMEM/F-12	Gibco, Life Technologies, Carlsbad, USA
FCS	Biowest Sigma
IL-6	PeproTech, Hamburg, DE
Opti MEM I reduced Medium	Life Technologies
PDGF-ß	PeproTech, Hamburg, DE
siRNA A-control; siRNA DAPK1	Santa Cruz Biotechnology
SmBM Basal Medium	Lonza, Basel, Schweiz
SmGM-2 Bulletkit (+ Supplementmix)	Lonza, Basel, Schweiz
TNF-α	PeproTech, Hamburg, DE

2.1.5 Antiköper

2.1.5.1 Antiköper für die Western Blot

Analysen:

Tabelle 6: Primärantikörper für Western Blot

Analysen

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Anti-DAP Kinase 1 (MN 610290)	Maus	1:1000 [5 %ig BSA]	BD Biosciences
Anti-DAP Kinase 1 (MN 222088)	Hase	1:1000 [5 %ig BSA]	US Biological
Anti-DAP Kinase 1 pSer308 (MA1- 24738)	Maus	1:1000 [5 %ig BSA]	Thermo Scientific
Anti-Pan- Actin	Hase	1:1000 [5 %ig BSA]	Cell Signaling Technology

Tabelle 7: Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Rabbit IgG HRP	Esel	1:10000 [5 %ig Milch]	GE Healthcare, Illinois, USA
Mouse IgG HRP	Schaf	1:10000 [5 %ig Milch]	GE Healthcare, Illinois, USA

2.1.5.2 Antikörper für Immunofärbungen:

	Tabelle 8	8: Antikörper	für Immuno	färbungen
--	-----------	---------------	------------	-----------

Antikörper	Firma	Verdünn ung	Verwendung
Anti-α- SMA	Sigma, Missouri, USA	1:50 (Goat buffer)	Immunohisto chemie
DAPI	Sigma, Missouri, USA	1:50 (Goat buffer)	Immunohisto chemie/ Immunofluor eszenz

Anti-DAP Kinase 1	BD Bioscience s	1:50 (Goat buffer)	Immunofluor eszenz
Anti-DAP Kinase 1	US Biological	1:150 (Goat buffer)	Immunohisto chemie
Anti-DAP Kinase1 pSer308	Thermo Scientific	1:50 (Goat buffer)	Immunofluor eszenz
Alexa Flour Goat Anti- Rabbit IgG 594	Life Technologi es, Darmstadt, DE	1:200 (Goat buffer)	Immunohisto chemie
Alexa Fluor Goat Anti- Mouse IgG 488	Life Technologi es, Darmstadt, DE	1:200 (Goat buffer)	Immunofluor eszenz

2.1.6 Primer

Tabelle 9: Primersequenzen für qRT-PCR

Gen	Sequenz	Spezies
18S Forwa rd	5'- CTCAACACGGGAAACC TCAC-3'	Human

18S Rever se	5'- CGCTCCACCAACTAAG AACG-3'	
18S Forwa rd 18S Rever se	5'- CGCGGTTCTATTTTGTT GGT-3' 5'- AGTCGGCATCGTTTATG GTC-3'	Maus
18S Forwa rd 18S Rever se	5'- CTCAACACGGGAAACC TCAC-3' 5'- CGCTCCACCAAACTAA GAACG-3'	Human/Maus/ Ratte
18S Forwa rd 18S Rever se	5'-CGC GGT TCT ATT TTG TTG GT-3' 5'-AGT CGG CAT CGT TTA TGG TC-3'	Ratte
DAPK 1 Forwa rd DAPK 1 Rever se	5'- AGACATGTGGAGCATT GGGG-3' 5'- ATCCTTGACCAGCAGC CTTC-3'	Ratte

DAPK 1a Forwa rd DAPK 1a Rever se	5'- AAGATCAAGTGCTGCC TGCT-3' 5'- GGCTGGTAGATCATGA CGGG-3'	Human
DAPK 1b Forwa rd DAPK 1b Rever se	5'- TGAGTGTTGCCAGAAG CGAT-3' 5'- CAGGCCTGGGACATTG TCAT-3'	Human
DAPK 1 Forwa rd DAPK 1 Rever se	5'- GCCCAAACCTCGGATC AAGA-3' 5'- TGACTATCTCCGGAGC CACA-3'	Maus
DAPK 2 Forwa rd DAPK 2	5'- TGCACCCCAACATCATC ACG-3' 5'- GTTCTCCTCCGGACAC TAGC-3'	Maus

Rever se		
DAPK 3 Forwa rd DAPK 3 Rever se	5'- GGCTGAGGACGCTCCT GT-3' 5'- CCAAGCTCCTCTCCCAT CTC-3'	Maus

2.1.7 Kits

Tabelle 10: Kits

Terminus	Herkunft
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Illinois, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU	Roche, Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay Kit II	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA

M-MLV Reverse Transkiptase	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Pierce™ ECL Plus Western Blotting Susbtrate	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNeasy Plus micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific, Massachusetts, USA

2.2. Methoden

2.2.1 Tiermodell

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden die Tierversuche durch das Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen GI 20/10 Nr.44/2013 genehmigt. Die Arbeit mit den Mäusen inklusive der Entnahme der Mäuselungen erfolgte vor Beginn dieser Arbeit freundlicherweise durch Christina Vroom.

2.2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden weiße CD[®] - Sprague-Dawley (SD) IGS – Ratten des Stammes 1925 verwendet. Die Lieferung dieser erfolgte durch die Firma Charles River Laboratories, Massachusetts, Vereinigte Staaten mit Sitz in Sulzfeld.

2.2.1.2 Das MCT-Rattenmodell

Im MCT-Modell wird durch Injektion mit dem Alkaloid Monocrotalin, welches aus der Pflanze Crotalaria Spectabilis gewonnen wird. die progressive Entwicklung einer PH in unterschiedlichen Tierspezies induziert. Nach Injektion kommt es zur Metabolisierung von MCT zu MCTP und damit zur Aktivierung des Alkaloids durch das sich in der Leber befindliche Enzym Cytochrom-P450. Die Injektion von MCT wird heutzutage durch eine einmalige subkutane oder intraperitoneale Verabreichung durchgeführt. So wurden den Ratten am Tag 0 60 mg/kg MCT subkutan injiziert, bezüglich der Kontrollgruppe erfolgte die Verwendung einer äguivalenten Menge Kochsalzes. Nach durchgeführter Injektion erfolgte ein tägliches Scoring bezüglich des Allgemeinzustandes, des Verhaltens sowie des Körpergewichts. Anschließend erfolgte am 35. Tag die Entnahme der Lungen.

2.2.2 Zellkulturexperimente

Die Verwendung von Zellkulturen sowie die Durchführung von Zellkulturexperimenten im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Ethikkommission unter dem Aktenzeichen 10/06 genehmigt.

2.2.2.1 Zellkulturbedingungen

Sämtliche Zellkulturarbeiten und Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank und unter Verwendung steriler Arbeitsmaterialien und Reagenzien durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Zellinkubator bei einer Temperatur von 37,5 °C, einer O₂-Konzentration von 21 %, sowie einer CO₂-Konzentration von 5 %.

2.2.2.2 Kultivieren und Splitten von humanen PASMC

Zur Kultivierung der hPASMCs wurde zunächst das Wachstumsmedium (engl. Growth Medium, GM) angesetzt. 500 ml des Basalmediums (engl. Basal BM) hierfür Medium. wurden mit einer Wachstumsfaktormischung bestehend aus humanen epidermalen Wachstumsfaktor, Insulin, humanem Fibroblasten-Wachstumsfaktor und fetalem Kälberserum aus dem SmGM-2 Supplement Kit der Firma Lonza versetzt. Das zusätzlich dem Kit in enthaltene Gentamicin/Amphotericin B wurde nicht verwendet. kältekonservierte hPASMC-Phiole Die wurde daraufhin für einen kurzen Zeitraum aufgetaut,

anschließend wurden die hPASMCs einer 10 cm Zellkulturplatte mit 9 ml GM beigefügt und in dem Zellinkubator zur weiteren Inkubation platziert. Das Wachstumsmedium (GM) wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt, bis eine 80 % Konfluenz erreicht und das Splitten der Zellen somit möglich war. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die 10 cm Zellkulturplatte in einem zweimaligen Durchgang mit Trypsin/EDTA gewaschen. Es erfolgte die erneute Gabe von 1 ml Trypsin/EDTA und die Inkubation für 2 min. Die Kontrolle der Zellablösung Zellkulturplatte zunächst von der wurde Bei mikroskopisch gesichert. noch nicht vollständiger Zellablösung wurde gegebenenfalls eine erneute Inkubation für 1 min durchgeführt. Um die Reaktion durch Trypsin/EDTA zu stoppen erfolgte anschließend die Hinzugabe einer adäguaten Menge GM und die Überführung der durch das Trypsin/EDTA von der Zellkulturplatte gelösten Zellen in ein 50 ml Falcon Tube. Dieses wurde bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin abgesaugt und das sich auf dem Boden befindliche Zellpellet durch sanfte Resuspension in GM gelöst. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypan Blue wurde die absolute Zellzahl der hPASMCs bestimmt und die Zellen je nach Versuchsaufbau auf 10cm- bzw. 6cm-Platten oder 6-Well-, 24-Well- bzw. 96-Wellplatten kultiviert. Im weiteren Verlauf wurde das GM nach 24 Stunden abgesaugt und durch BM ausgetauscht, nach weiteren 24 Stunden wurde anschließend das jeweilige Experiment durchgeführt.

2.2.2.3 Kultivieren und Splitten von murinen SMC

Für weitere Zellkulturversuche wurden sowohl gesunde, als auch mit Monocrotalin (MCT) behandelte mSMC aufgetaut und auf 10 cm Platten ausgesät. Diese wurden mit Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM), dem zusätzlich fetales Kälberserum und Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin) beigefügt wurde, kultiviert und inkubiert. Der Mediumwechsel erfolgte äguivalent zu den hPASMCs alle 2-3 Tage.

2.2.2.4 Normoxische und hypoxische Exposition von Zellen

Für einzelne Versuche wurden mPASMCs und hPASMCs unter hypoxischen Bedingungen (O₂-Konzentration 5 %, CO₂-Konzentration 5 %, 37° C) in einem Heracell[™] 150i Inkubator kultiviert. Die Inkubation erfolgte je nach Versuchsaufbau für 3, 6, 12, 14, 24 oder 72 Stunden.

2.2.2.5 Stimulation mit Wachstumsfaktoren

Gesunde hPASMCs wurden im Rahmen der **Zellkulturversuche** verschiedenen mit Wachstumsfaktoren stimuliert Bei diesen Wachstumsfaktoren handelte es sich um folgende: PDGF-ß (Endkonzentration: 30 ng/ml), TNF-a (Endkonzentration: 10 ng/ml), II -6 (Endkonzentration: 50 ng/ml) und GM. Zunächst wurden die hPASMCs über 24 Stunden einer "Serum-Starvation" mittels BM unterzogen, woraufhin sie anschließend mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte ie nach Versuchsaufbau für einen festgelegten Zeitraum von 5 min, 10 min, 15 min, 30 min. 60 min oder 24 Stunden unter Inkubation. Anschließend wurden eine nach Abschnitt 2.2.2 beschriebene Protein-Isolation und Western-Blot Analyse durchgeführt.

2.2.2.6 Transfektion von siRNA

Bei Small interfering RNA (siRNA) handelt es sich um einzel- oder doppelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle, die eine Länge von 20 - 25 Basenpaaren aufweisen und für die RNA-Interferenz genutzt werden.

siRNA codiert keine Proteine, sondern bindet an komplementäre einzelsträngige Ribonukleinsäure-Moleküle (mRNA), wodurch deren normale Funktionen unterbunden wird. Dies führt zu einer gezielten Degradation der mRNA bzw. zu einer verminderten Produktion des durch die mRNA kodierten Proteins. Hierdurch ist es möglich, Rückschlüsse auf die Funktionen des Proteins bzw. des Gens zu schließen. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Transfektion von siRNA DAPK1 (+ siNC) mit hPASMCs durchgeführt, in der Absicht die Auswirkungen einer verminderten DAPK1-Expression bezüglich der Zellproliferation zu Hierfür wurden pro Well untersuchen. 4000

hPASMCs der Passage 6 auf 15 Wells einer 96-Well-Platte gesplittet. Am darauffolgenden Tag wurde dann die Transfektion der siRNA DAPK1 (200 nM) sowie der siNC (Negativkontrolle) durchgeführt. Zunächst wurden zwei 1,5 ml Gefäße mit einer Lösung aus 2 µl Lipofectamin 2000 und 2000 µl OPTIMEM Medium (Lösung 1) angesetzt. Zudem wurde eine Lösung aus 4 µl siRNA DAPK1 und 200 µl OPTIMEM (Lösung 2a) und eine Lösung aus 4 µl siNC und 200 µl OPTIMEM (Lösung 2b) hergestellt.

Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösungen 2a und 2b jeweils mit der Lösung 1 kombiniert. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Nun wurden 50 µl der Lösungen 2a oder 2b auf zuvor festgelegte Wells der 96-Well-Platte pipettiert und für 6 Stunden in dem Heracell™ 150i Zellinkubator kultiviert, ehe eine 24-stündige Serum-Starvation der Zellen erfolgte. Danach wurden die hPASMCs für eine 16-stündigen Zeitraum mit GM stimuliert, um daraufhin den BrdU Proliferationsassay zu starten.

2.2.2.7 BrdU-Proliferationsassay

Um die Wirkung von DAPK1 auf die Proliferation von hPASMCs zu untersuchen, wurde wie in Abschnitt 2.2.1.6 beschrieben zunächst eine Transfektion mit siRNA DAPK1 unternommen. Anschließend wurde ein Proliferationsassay unter Verwendung des BrdU Kits durchgeführt und analysiert.

Bei Bromdesoxyuridin (BrdU) handelt es sich um ein Pyrimidinanalogon des Nukleosids Thymidin. In proliferierenden Zellen erfolgt in der S-Phase des Zellzyklus zunächst eine Replikation der DNA, bevor die eigentliche Zellteilung stattfindet. BrdU kann von diesen vitalen, proliferierenden Zellen aufgenommen und während der S-Phase des Zellzyklus anstelle des Nukleosids Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Mittels spezifischer Antikörper gegen BrdU kann hieraufhin die erfolgte DNA-Synthese und die damit verbundene Proliferation der **Zellen** immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Vorbereitungen:

Als erstes wurde die BrdU Working Solution, die Anti-BrdU POD Stock Solution und der Washing Buffer hergestellt. Die BrdU Working Solution setzt sich aus dem BrdU Reagent und SMBM zusammen, die im Verhältnis von 1:100 vermengt werden. Die Anti-BrdU POD Stock Solution wird hergestellt, indem dem Anti-BrdU-POD Stock 1,1 ml destilliertes Wasser beigefügt wird. Das Washing Buffer wurde mit 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Nach der besagten Transfektion mit siRNA DAPK1 und siNC sowie nach einer 16-stündigen Stimulationsphase mit GM wurden die hPASMCs nach folgendem Protokoll behandelt:

Tabelle11:ProtokolldesBrdU-Proliferationsassays

Hinzugabe von 10 µl BrdU Working
 Solution pro Well und Inkubation f
ür 4
 Stunden

-	Medium	durch	Abklopfen	entfernen und
	einmalig	es Was	schen der V	Vells mit 100 µl
	Washing	Buffer		

-	Fixation	der	Zelle	n m	it 2	00 µ	l Fix	Der	nat
	Solution	pro	Well	für	30	min	bei	RT	in
	Dunkelh	eit							

- Herstellung der Anti-BrdU-POD Working Solution, durch Verdünnung der Anti-BrdU POD Stock Solution um dem Faktor 1:100 mit der Antibody Dilution Solution
- Entfernung der FixDenat Solution und Hinzugabe von 100 µl Anti-BrdU-POD Working Solution pro Well
 - Inkubation für 90 min bei RT in Dunkelheit
 - 4-maliges Waschen der Wells mit Washing Buffer
 - Hinzugabe von 100 µl Substrate Solution pro Well und Inkubation f
 ür 2-5 min bei RT in Dunkelheit

Die Messung der Lichabsorption wurde mit Hilfe des Mikroplatten-Lesegeräts bei 370 nm (Referenzwellenlänge 492 nm) und der Software i-Control gemessen.



Abbildung 5: Protokoll des BrdU-Proliferationsassays. Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Schritte des BrdU-Proliferationsassays.

2.2.3 Proteinisolation und Western Blot Analyse

Der Western Blot ist ein molekularbiologisches Verfahren, das dem Nachweis von Proteinen dient, welche im Rahmen dieser Arbeit durch Protein-Isolationen aus Zellen gewonnen wurden. So wurden Proteine aus hPASMCs. zum Teil nach Stimulation von Wachstumsfaktoren, sowie aus gesunden und mit Monocrotalin behandelten Lungenhomogenaten isoliert. Weiterhin wurden Western Blots mit Proteinproben von, mit NOX/HOX Bedingungen stimulierten mSMC. hPASMCs und Lungenhomogenaten sowie von gesunden und kranken (IPAH) Lungenhomogenaten und hPASMCs durchgeführt.

2.2.3.1 Protein-Isolation aus Zellen

Als erster Schritt wurde der für die Protein-Isolation benötigte Lysis Buffer hergestellt. Dieser setzt sich aus 1 ml RIPA-Buffer sowie 10 µl Protease- und 10 µl Phosphatase-Inhibitor zusammen.

Zur Proteinisolation der jeweiligen Zellen wurde Medium abgesaugt, ehe daraufhin das ein einmaliger Waschvorgang mit 1 ml DPBS erfolgte. Anschließend wurden den Zellkulturplatte jeweils 200 µl des Lyses Buffers hinzugegeben. Die Zellen wurden nun mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturplatte gelöst und in ein auf Eis gekühltes 1.5 ml Gefäß pipettiert, woraufhin eine 30-minütige Inkubation auf Eis erfolgte, ehe das Lysat für 15 min bei 12000 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abschließend in ein neues 1,5 ml Gefäß transferiert und entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

2.2.3.2 Protein-Bestimmung und -Normalisation

Um die Proteinkonzentration der Proben zu bestimmen wurde das DC Protein Assay Kit II gemäß Hersteller-Protokoll angewandt. Die hierfür als Standard verwendete BSA- Verdünnungsreihe ist in Tabelle 12 dargestellt. Alle Standards und Proben wurden in 1,5 ml Gefäßen angesetzt.

Tabelle	12:	Erstellung	der	Standards	für	die
Protein-	Estir	mation				

	BSA (2mg/ ml)	RNas e-free H₂O	Lyse s Buffe r	Endkonze n- tration
Standart 0	0 µl	5 µl	5 µl	0 µg/µl
Standart 1	1,25 µl	3,75 µl	5 µl	0,5 µg/µl
Standart 2	2,5 µl	2,5 µl	5 µl	1 µg/µl
Standart 3	5 µl	0 µl	5 µl	2 µg/µl
Proben	-	5 µl	-	-

Sowohl den Standards als auch den Proben wurden nun jeweils 25 µl des Reagenz A und 200 µl des Reagenz B hinzugegeben. Anschließend wurden

die Proben und die Standards durch kurzes Vortexen durchmischt, ehe 2 x 200 ul einer ieden Lösung in 2 Wells einer 96-well-Platte pipettiert wurden und diese für 15 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert wurde. Die unterschiedliche Lichtabsorption der Proben wurde mithilfe eines Mikroplatten Lesegeräts und der Software "i-control" bei 750 nm gemessen. Die Protein-Normalisation wurde durch Orientierung an der niedrigsten Konzentration und anschließender Verdünnung mit RNAse-free-Water erreicht. Zudem wurden die Proben mit einem Verhältnis von 4:1 mit NuPAGE LDS-Loading Dye und einem Verhältnis von 10:1 mit NuPAGE Sample Reducing Agent versehen und für 10 min bei 95°C denaturiert. Im Anschluss wurden die Proben bei -80°C eingefroren.

2.2.3.3 Herstellung der verwendeten Materialien für die Western Blot Analyse

Die Herstellung der für den Western Blot benötigten Materialien sind aus folgenden Tabellen zu erheben [72].
Tabelle 13: Herstellung des 8 %igen Trenngels

Ingrediens	Volumen
TRIS-HCI [1,5M, pH 8,8]	1,5 ml
Acrylamid [30 %]	1,6 ml
SDS [10 %]	60 µl
APS [10 %]	30 µl
TEMED	6 µl
A. dest.	2,8 ml

Tabelle 14: Herstellung des 6 %igen Sammelgels

Ingrediens	Volumen
TRIS-HCI [1,5M, pH 6,8]	625 µl
Acrylamid [30 %]	500 µl
SDS [10 %]	25 µl
APS [10 %]	12,5 µl
TEMED	2,5 µl
A. dest.	1,34 ml

Tabelle 15: Herstellung des Running-Buffers

Ingrediens	Volume/Masse für 2 L
TRIS	6 g
Glycin	28,8 g
SDS [10 %]	20 ml
A. dest.	1980 ml

Tabelle 16: Herstellung des Blotting-Buffers

Ingrediens	Volume/Masse für 2 L	
TRIS	12 g	
Glycin	6 g	
Methanol	400 ml	
A. dest.	1600 ml	

Tabelle 17: Herstellung der 5 % Milchlösung und des 5 % BSA

Ingrediens	Volume/Masse für 100 ml
Milchpulver oder BSA	5 g
1x TBS/T	100 ml

Tabelle 18: Herstellung des 20x TBS

Ingrediens	Endkonzentration	Volume/Masse für 1 L	
TRIS	20 mM	48,8 g	
NaCl	150 mM	160 g	
A. dest ca. 950 ml			
Einstellung des pH-Wertes auf 7,6 erfolgte mittels eines pH-Meters und HCI			

Tabelle 19: Herstellung des 1x TBS/T

Ingrediens	Volumen für 1 L	
20x TBS	50 ml	
Tween	1 ml	
A. dest.	1000 ml	

2.2.3.4 Western Blot Analyse

Für die Durchführung der Western Blot Analyse wurden zum einen Gele und Running Buffer wie in den Abschnitt 2.2.3.3 beschriebenen Tabellen selbst hergestellt, zum anderen wurden NuPAGE Novex 3-8 %Tris-Acetat Fertig-Gele sowie der NuPAGE Tris-Acetat Running- Buffer 20x verwendet.

Nach dem Aufbauen der SDS-PAGE Apparatur und der Zugabe des Running-Buffers wurden die Wells zunächst durch vorsichtiges Pipettieren gewaschen. Dann erfolgte das Beladen der Gelkammern, angefangen mit 5 µl des Precision Plus Dual Color- Markers. Je nach Probe wurden zwischen 10 - 60 µl Proteinprobe in die folgenden Wells pipettiert. Eine Spannung von 75 V wurde angelegt, bis die Elektrophorese den Übergang von Sammel- zu Trenngel erreicht hatte, ehe die Spannung auf 100-120 V erhöht wurde, um die Elektrophorese anschließend bei einer Größe von 25 kDA zu stoppen. Nach Absolvierung der Elektrophorese erfolgte das Blotting. Dieses wurde mit Hilfe des Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Systems durchgeführt. Hierbei werden die im Rahmen der Elektrophorese getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membrane übertragen. Nach dem Zusammensetzen der Blotting-Kammer sowie der Blotting-Kasette mit dem enthaltenen Gel und der Hinzugabe von Blotting-Buffer wurde eine Spannung von 100 V für Dauer von 1.5 Stunden angelegt. Nach die Abschluss des Blottings wurde die Membran mittels 5 % Michlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt und daraufhin über Nacht bei 4°C auf einem langsamen Schüttler mit den primären Antikörpern inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte mittels TBS/T zunächst ein 3-maliger Waschvorgang für jeweils 5 min. Die Membran wurde nach dem Waschvorgang mit einer zum Primärantikörper passenden Sekundärantikörper-Milchlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem langsamen Schüttler inkubiert. Es schloss sich ein weiterer Waschvorgang von 1 Stunde an, in dem alle 10 min ein Wechsel des TBS/T erfolgte, wobei die letzten zwei Waschvorgänge mittels TBS durchgeführt wurden. Die Lumineszenz der Proteine wurde gemäß Herstellerprotokoll mit Hilfe des ECL Prime Western Blotting Detection Reagent Kits durchgeführt. Der ECL-Buffer setzte sich in dem Verhätlnis von 1:1 aus der Solution A und Solution B zusammen, wurde auf die Membran aufgetragen und für 5 min lichtgeschützt inkubiert. Die Entwicklung wurde mit Amersham Hyperfilm

ECL-Filmen und einer Entwicklungskasette mit verschiedenen Belichtungszeiten durchgeführt und erfolgte mit Hilfe der AGFA Entwicklungsmaschine CP 1000 in einer Dunkelkammer.

Zur Sicherung einer äquivalenten Proteinmenge jeder Probe, wurde stets das Housekeeping-Gen Pan-Actin als Ladekontrolle mitbestimmt, da es von jeglichen Versuchsbedingungen unbeeinflusst bleibt.

2.2.3.5 Stripping

Um Membranen für weitere Proteinuntersuchungen erneut nutzen zu können, bestand die Möglichkeit des Strippings. Hierbei wurde die jeweilige Membran mit Stripping Buffer für 15 min bei Raumtemperatur und unter Schwenken inkubiert. Nun wurde die Membran 3-mal für jeweils 5 min mit TBS/T gewaschen. So konnte die Membran anschließend einer erneuten Inkubation mit einem Primärantikörper unterzogen werden.

2.2.4 RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR

2.2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation von hPASMCs wurde gemäß des Herstellerprotokolls mithilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurde zunächst der RTL-Buffer hergestellt, indem 5 ml des RTL-Buffers 50 μ l beta-Mercaptoethanol beigefügt wurden. Des Weiteren wurde der RDD-Buffer angesetzt, der sich aus 350 μ l RDD, sowie 50 μ l RNase-free-Water zusammensetzt. RPE-Buffer wurde aus 11 ml RPE-Buffer und 44 ml Methanol hergestellt. 70 %iges ribonukleinasefreies Ethanol wurde hergestellt, indem 35 ml 99,9 %iges Ethanol mit 15 ml RNAsefree-Water gemischt wurden.

Das Medium, der sich auf 6 cm Zellkulturplatten befindlichen hPASMCs wurde abgesaugt und die Zellkulturplatten auf Eis gekühlt. Nach einmaligem Waschen der Zellkulturplatte mit DPBS erfolgte die Hinzugabe von 500 µl des angesetzten RTL-Buffers und das Lösen der Zellen vom Plattenboden mit Hilfe eines Zellschabers. Das Lysat wurde anschließend auf eine Qia-Shredder-Säule (in ein 2 ml Sammelgefäß auf eine RNeasy Mini Spin-Säule) pipettiert und für 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert.

Dem Lysat wurde ein aquivalentes Volumen an 70 % Ethanol beigefügt (500 µl) und durch sanftes pipettieren vermischt.

Daraufhin wurden 700 µl dieser Lösung auf eine RNeasy-Säule transferiert und für 15 Sekunden bei 10000 rpm zentrifugiert sowie der entstandene Durchfluss entfernt.

500 µl des RW1-Buffers wurden auf die Spin-Säule pipettiert. Nachfolgend erfolgte eine erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10000 rpm und ein erneutes Entfernen des Durchflusses. Nun wurden 80 µl des zuvor angesetzten RDD-Buffers auf die Membran der Spin-Säule pipettiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit enthaltener DNase.

Im Anschluss wurden der Spin-Säule erneut 500 µl des RW1-Buffers hinzugefügt und ein weiteres Mal eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10000 rpm sowie die Entfernung der Durchfluss durchgeführt. Nach der Zugabe von 500 µl des RPE-Buffers erfolgte eine Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10000 rpm und die Entfernung des Durchflusses. Dieser Schritt wurde einmalig wiederholt.

Die Säule wurde nun in ein 1,5 ml Gefäß übertragen und die Membran mit 30 µl RNAse-free-Water behandelt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einmaligem Zentrifugieren für 3 Minuten bei 8000 rpm lag die RNA im Durchfluss vor.

Die RNA-Kozentrationsbestimmung erfolgte mit dem Nanodrop ND-1000 Spektralphotometer.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte nach einem hausinternen Protokoll und gliedert sich in 2 Arbeitsabschnitte auf.

Schritt 1: RNA-Abschätzung und -Normalisierung: Im ersten Schritt wurde die Konzentration der zu untersuchenden RNA-Proben mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers bestimmt. Orientierend an der Vorgabe von 800 ng RNA pro Probe erfolgte die Normalisierung der Proben auf 7 μ l mittels RNAse-free-H₂O.

Schritt 2: Herstellung des Master-Mix 1 bestehend aus RNA, dNTP-Mix und Primer:

Tabelle 20: Master-Mix 1

Ingrediens	Volumen
RNA + RNase-free Water	7 μΙ
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Random Hexamer Primer (RHP)	2 μΙ

Anschließend wurde eine 5-minütige Inkubation bei 70° C in einem Thermocycler durchgeführt, ehe der Master Mix 1 für 1 Minute auf Eis gekühlt und für 10 Sekunden bei 6000 rpm und in Raumtemperatur zentrifugiert wurde.

Schritt 3: Herstellung des Master-Mix 2 und Hinzugabe in Master Mix 1:

Tabelle 21: Master-Mix 2

Ingrediens	Volumen
10x M-MLV Reverse Transkriptase Buffer	2 µl
M-MLV Reverse Transkriptase	1 µl
RNAse-free H ₂ O	7 μΙ

Der Master-Mix 2 wurde dem Master Mix 1 hinzugefügt und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. In einem Thermocycler folgte nun eine 90minütige Inkubation bei 37° C und eine 10-minütige Inkubation bei 80° C. Schlussendlich wurden das Reaktionsgemisch für 10 Sekunden bei 6000 rpm und in Raumtemperatur zentrifugiert.

2.2.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

FürdiequantitativeEchtzeit-Polymerasekettenreaktion(qRT-PCR)wurdedasiTaqUniversalSYBRGreenSupermixKitverwendet.AlsHousekeeping-Genkam18S-rRNA(18SSSUrRNAPrimer)zumEinsatz.

Für jeden Primer wurde ein PCR-Reaktionsgemisches, bestehend aus den in Tabelle 22 aufgeführten Komponenten hergestellt. Daraufhin wurde die 96-well-Platte mit jeweils 2 µl cDNA pro well versetzt, ehe 23 µl des PCR-Reaktionsgemisches hinzugegeben wurde.

Tabelle	22:	Zusammensetzung	des	PCR-
Reaktior	nsgem	lisches		

Ingrediens	Volumen
iTaq Universal SYBR Green Supermix	12,5 µl
Forward Primer [10 µM]	0,25 µl
Reverse Primer [10 µM]	0,25 µl
RNAse-free H ₂ O	10 µl

Nach kurzer Zentrifugation für 30 Sekunden bei 6.000 rpm und Raumtemperatur erfolgte das Überführen in das qRT-PCR-Gerät "MxPro Mx3000P qPCR System". Das Programm für die qRT-PCR ist in Tabelle 23 ersichtlich. Die Aufzeichnung und Analyse der Daten erfolgte mittels des Computer-Programm "MxPro Mx3000P 4.1".

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Anlagerung	58 °C	40 s	35
Elongation	72 °C	1 min	35
finale Verlängerung	59-95 °C	2 min	1
Abkühlung	25 °C	-	1

Tabelle 23: qRT-PCR-Programm

2.2.5 Immunofluoreszenz-Färbungen

2.2.5.1 Immunofluoreszenz-Färbungen von hPASMCs

Die Immunofluoreszenz (IF) stellt eine biochemische Analysemethode dar, bei der Antigene mit Hilfe von durch Fluorochrom markierte Antikörper luminesziert werden. Die Immunofluoreszenz wurde im Rahmen der Stimulationsversuche mit den in Abschnitt 2.2.1.5 genannten Wachstumsfaktoren an hPASMCs durchgeführt. Die Stimulation erfolgte je nach Versuchsaufbau für 30 min und 24 Stunden.

Im Rahmen dessen wurden gesunde hPASMCs auf zuvor mit Gelatine beschichtete Deckgläser einer 24-Well-Platte kultiviert. Im Vorfeld wurden hierfür Deckgläser in eine 24-Well-Platte passende gegeben, jeweils 500 µl Gelatine hinzugefügt und diese für 2 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde die Gelatine abgesaugt und die 24-Well-Platte für 30 min mit UV-Licht bestrahlt. Nach Durchführung einer 24-stündigen Serum-Starvation schloss sich die zeitlich mit festgelegte Stimulation Wachstumsfaktoren an Nun wurden die Glasplatten auf eine neue 24-Well-Platte transferiert und für 5 min unter Schwenkung mit DPBS gewaschen. Die 15-minütige Fixieruna der 4 hPASMCs erfolgte mittels %igem Paraformaldehyd, ehe sich ein erneuter Waschvorgang von 5 min anschloss. Die 24-Well-Platte wurde danach mit DPBS über Nacht bei 4°C gelagert. Zur Permeabilisierung wurden den Wells der 24-Well-Platte jeweils 200 µl Triton (0,5 %) hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation wurden die hPASMC für 30 min mit Goat-Buffer geblockt

und über Nacht bei 4°C und unter Lichtschutz mit Antikörperlösung (1:50) einer inkubiert. Die hPASMCs mit unterlaufener 24-stündiger Stimulation erhielten eine DAPK1-Antikörperlösung. die hPASMCs mit unterlaufener 30-minütiger Stimulation erhielten pDAPK1eine Antikörperlösung. Am Folgetag wurden die Deckgläschen 3-malig für eine Dauer von jeweils 5 Minuten mit einem Waschpuffer bestehend aus 10 % DPBS und 0.1 % igem NP40 (40:1) gewaschen, danach die Inkubation mit 70 um ul des korrespondierenden sekundären Antikörpers für 45 Minuten in Dunkelheit durchzuführen Bei dem mit einer Verdünnung 1:200 verwendeten von sekundären Antikörper handelte es sich um Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse. Es erfolgte ein 2-malig wiederholter Waschvorgang mithilfe des Waschpuffers für jeweils 5 min, gefolgt von der Anfärbung der Zellkerne mittels 200 µl DAPI für 10 min in Dunkelheit. Nachdem die Deckgläser mit destilliertem Wasser gewaschen wurden erfolgte der Transfer der Deckgläser auf Objektträger. Hierfür wurde vorher ein Tropfen des ProLong Gold Antifade Mountant auf den Objektträger aufgetragen und die Deckgläser anschließend mit Zellseite nach unten auf den Objektträgern positioniert. Diese wurden zur Fixation der Deckgläser über Nacht in Dunkelheit aufbewahrt und Schluss endlich bei 4°C gelagert.

Die Auswertung erfolgte mit dem KEYENCE BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der BZ-II Viewer und der BZ-II Analyzer Software.

2.2.5.2 Immunofluoreszenz-Färbung von Paraffin-Sektionen

Zur Komplementierung der Daten und zum Nachweis des guantitativen Unterschieds der Expression von DAPK1 zwischen gesundem und erkrankten Lungengewebe, sowie zwischen NOX/HOX behandeltem Lungengewebe wurden Immunofluoreszenz-Färbung Paraffinvon Sektionen durchgeführt.

Hierbei wurde nach folgendem Protokoll verfahren:

Schritt 1: Deparaffinierung

Tabelle 24: Deparaffinierung

Deparaffinierung:	Zeit
-------------------	------

Xylol I	10 min
Xylol II	5 min
100 %iger Ethanol	5 min
96 %iger Ethanol	3 min
70 %iger Ethanol	3 min
A. dest	3 min

Schritt 2: Antigen Retrieval

Tabelle 25: Antigen Retrieval

Antigen Retrieval	Zeit
Citrat Buffer 10x	10 min

Schritt 3:

Nach der Durchführung einmaligen eines Waschvorgangs mittels DPBS wurde die Paraffin-Sektion mit einem Liquid-Blocker umrandet und anschließend für 30 min mit Goat-Buffer geblockt. primäre Antikörperlösung Nun wurde die aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert. Als Antikörper kamen Anti-DAPK1 (1:150) und Anti-SMA- α (1:50), gelöst in Goat-Buffer zum Einsatz.

Schritt 4:

Am Folgetag wurde die Paraffin-Sektionen zunächst mit einem 3-maligen Waschvorgang von jeweils 5 min mit DPBS gewaschen, ehe die sekundäre Antikörperlösung für 45 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubiert wurde. Als sekundäre Antikörper wurde zum einen Alexa Fluor 488 Goat Anti-Mouse IaG gegen SMA- α wirkend und zum anderen Alexa Fluor 594 Goat Anti-Rabbit IgG gegen DAPK1 wirkend verwendet. Diese wurden in einer Verdünnung von 1:400 (1:200) in Goat-Buffer erstellt.

Schritt 5:

Nach erfolgtem 4. Schritt wurden alle weiteren Schritte in Dunkelheit durchgeführt. Die Paraffin-Sektionen wurden erneut 3-malig für 5 min mit DPBS gewaschen, ehe sie für 15 min mit DAPI bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert wurden. Zum Schluss erfolgte eine weitere Waschung mittels destilliertem Wasser. Den Paraffin-Sektionen wurde nun ein Tropfen des ProLong Gold Antifade Mountant aufgetragen und mit einem Glasplättchen verschlossen. Die Auswertung erfolgte mit dem KEYENCE BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der BZ-II Viewer und der BZ-II Analyzer Software

2.2.6 Statistische Methodik

Mit Hilfe der Software GraphPad Prism 6.00 wurden die Anfertigung der graphischen Darstellungen und statistische Analysen vollzogen, wobei die Daten stets als Mittelwerte mit Standardfehlern Zur Auswertung wurden. der angegeben Ergebnisse wurden beim Vergleich von zwei Stichproben der t-Test, beim Vergleicher mehrerer Stichproben der Newman-Keuls Test verwendet. Das Signifikanzniveau α wurde bei 0.05 festgelegt. Signifikante Unterschiede wurden mit einem * markiert. Hierbei wurden Ergebnisse je nach p-Wert mit einem bis vier * versehen (p-Wert von $\leq 0.05 = *$; p-Wert von ≤ 0.01 **; p-Wert von ≤ 0.001 ***; p-Wert von ≤ 0,0001= ****). Ergebnisse mit einem p-Wert > 0,5 wurden als nicht signifikant definiert. Die Anzahl der durchgeführten Versuche wurden mit der Ziffer "n" gekennzeichnet.

3. Ergebnisse

3.1 Expressionsmuster von DAPK1 in experimenteller PH

Um ein besseres Verständnis für die Regulationsmechanismen und das Expressionsmuster von DAPK1 in experimenteller Pulmonaler Hypertonie (PH) zu erhalten, wurden Western Blot- und qRT-PCR-Anaylsen sowie Immunofluoreszenz-färbungen mit verschiedenen experimentellen Modellen der PH durchgeführt.

3.1.1 DAPK1-Expression im Monocrotalin-Rattenmodell

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde das DAPK1-Expressionsmuster im Monocrotalin-Rattenmodell untersucht. Hierfür kamen sowohl gesunde-, als auch MCT-Lungenhomogenaten und -PASMCs von Ratten zum Einsatz, mit denen Immunofluoreszenzfärbungen, sowie Analysen bezüglich der DAPK1-Expression auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt wurden.

3.1.1.1 mRNA- und Proteinexpression in Lungenhomogenaten und rSMCs

Im ersten Schritt erfolgte mit Hilfe der gRT-PCR die Expressionsanalyse von DAPK1 auf mRNA-Ebene. In der Untersuchung Rattenvon Lungenhomogenaten ließ sich keine signifikante Reduktion der DAPK1 Expression nachweisen. So zeigte die durchgeführten gRT-PCR-Analyse keine deutliche Verminderung der DAPK1-Expression MCT-Rattenmodel beim bezogen auf die Kontrollgruppe. Jedoch zeigte die mit rSMCs durchgeführte gRT-PCR eine deutliche Reduktion der Expression von DAPK1 im MCT-Rattenmodel im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Als nächstes wurde die DAPK1-Expression auf Proteinebene überprüft. Dies erfolgte mit Lungenhomogenaten der Ratten. die mittels Western Blottings unter Verwendung von Pan-Actin Ladekontrolle untersucht als wurden Der Versuchsaufbau des Western-Blots wird in Abschnitt 2.2.3.4 beschrieben. Der in Abbildung 6 repräsentativ dargestellte Western Blot zeigt eine deutliche Reduktion der DAPK1-Expression auf Proteinebene innerhalb der Monocrotalin-Gruppe bezogen auf die Kontrollgruppe.



Abbildung 6: DAPK1 mRNA- und Proteinexpression im Monocrotalin-Rattenmodel

a. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S rRNA von gesunden- und MCT-Lungenhomogenaten der Ratte. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben (n=3)

b. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S rRNA von gesunden- und MCT-PASMC der Ratte. (n=3) **c.** Repräsentativer Western Blot von gesunden- und MCT-Lungenhomogenaten der Ratte mit Pan-Actin als Ladekontrolle (n=3)

3.1.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von Lungenhomogenaten mit DAPK1

Um die Untersuchung der DAPK1-Expression im MCT-Rattenmodel zu komplementieren, wurden zudem Immunfluoreszenzfärbungen mit gesunden und MCT-Lungenschnitten der Ratte durchgeführt. Auch hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der DAPK1-Expression, welche im Bereich der SMCs der Lungengefäße am deutlichsten ersichtlich ist und in Abbildung 7 durch repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt wird.



Abbildung 7: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von Lungenschnitten mit DAPK1 im Monocrotalin-Rattenmodel Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von

gesunden- und MCT-Lungenschnitten der Ratte rot: α -SMA, grün: DAPK1. Scale bar: 50 µm.

3.1.2 DAPK1-Expression im Normoxie/Hypoxie-Modell

Anschließend wurde das DAPK1-Expressionsmuster in experimenteller PH anhand des Normoxie/Hypoxie-Modells untersucht. Hierbei wurden die Mäuse bzw. die PASMCs je nach Versuchsaufbau für einen bestimmten Zeitraum einer chronischen Hypoxie unterzogen, ehe ebenfalls Western Blot- und qRT-PCR-Analysen, sowie Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt wurden.

3.1.2.1 mRNA- und Proteinexpression in Lungenhomogenaten und mPASMCs

In diesem Teil der Arbeit wurde die mRNA- und Proteinexpression von DAPK1 in Lungenhomogenaten mSMCs des und Normoxie/Hypoxie-Modells untersucht. Auch hierbei diente Pan-Actin erneut als Ladekontrolle. Mittels gRT-PCR erfolgte die Expressionsanalyse von DAPK1 auf mRNA-Ebene. Betrachtet man die Lungenhomogenate, so kommt es hier zu einer signifikanten Reduktion der Expression von DAPK1

auf 1/10 im Vergleich zur normoxischen Kontrollaruppe. Gleichermaßen wie bei dem Monocrotalin-Rattenmodel ist zudem eine starke Reduktion der DAPK1-Proteinexpression in Hvpoxie-Lungenhomogenaten erkennen zu bezogen auf die normoxische Kontrollgruppe.

Betrachtet die gRT-PCR-Analyse der man mPASMCs, so stellt sich hier interessanter weise sowohl bei der 24-stündigen als auch 72-stündigen Steigerung der DAPK1-Hypoxiedauer eine Expression um das 2,5-fache bezogen auf die normoxischen Kontrollgruppe dar. Jedoch zeigt sich bei der Proteinexpression von DAPK1 in mSMCs nach jeweiliger chronischer Hypoxie eine deutliche Veraleich Reduktion im zur normoxischen Kontrollgruppe. Diese Reduktion korreliert linear mit der Hypoxiedauer und ist nach 72-stündiger Hypoxie am deutlichsten zu detektieren.



Abbildung 8: DAPK1 mRNA- und Proteinexpression in Lungenhomogenaten und mPASMCs im Normoxie/Hypoxie-Modell

a. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-Lungenhomogenaten der Maus. (n=4) **b.** Repräsentativer Western Blot von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-Lungenhomogenaten der Maus mit Pan-Actin als Ladekontrolle. **c.** Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-PASMC der Maus. (n=3) **d.** Repräsentativer Western Blot von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-mSMC der Maus mit Pan-Actin als Ladekontrolle. (n=2)

3.1.2.2 mRNA- und Proteinexpression in hPASMCs

Bei Betrachtung der DAPK1-Expression auf mRNA-Ebene ist bei den hPASMCs eine signifikante Steigerung zu detektieren. Bei der Proteinexpression von DAPK1 in hPASMCs nach jeweiliger chronischer Hypoxie ist jedoch eine deutliche Reduktion im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe zu beobachten. Der Einfluss der chronisch induzierten Hypoxie bezüglich der **DAPK1-Proteinexpression** Verminderung der scheint nach 12 Stunden sein Maximum erreicht zu haben.





Abbildung 9: DAPK1 mRNA- und Proteinexpression in hPASMC im Normoxie/Hypoxie-Modell

a. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-PASMC des Menschen. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben. (n=2) **b.** Repräsentativer Western Blot von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-hPASMC mit

3.1.2.3 Immunfluoreszenzfärbungen von Lungenhomogenaten mit DAPK1

Die abschließend durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung mit normoxischen und hypoxischen Lungenschnitten der Maus vervollständigte das Bild des Normoxie/Hypoxie-Modells und bestätigten das erneut Expressionsmuster von DAPK1 in experimenteller PH Denn auch hier konnte eine deutliche der DAPK1-Expression beobachtet Reduktion werden, welche wie bei dem MCT-Rattenmodell vornehmlich an den SMCs der Lungengefäße deutlich wird. Abbildung 10 zeigt repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen.



Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbungen von Lungenschnitten mit DAPK1 im Normoxie/Hypoxie-Mausmodell. Repräsentative Immunfluoreszenzufnahmen von normoxisch (NOX) und hypoxischen (HOX)-Lungenschnitten der Maus. rot: α-SMA, grün: DAPK1. Scale bar: 50 μm.

3.2 Expressionsmuster von DAPK1 in klinischer PH

Um nun zu bestätigen, dass auch humane PASMC und Lungenhomogenate DAPK1 exprimieren, und um das Expressionsmuster genauer zu untersuchen, wurde Material von gesunden als auch von erkrankten Spendern verwendet, um Expressionsanalysen auf Protein- und mRNA- Ebene durchzuführen und diese durch Immunfluoreszenzfärbungen zu vervollständigen.

3.2.1 mRNA- und Proteinexpression in humanem Lungenhomogenaten, mikrodissezierten Gefäßen und hPASMCs

Mithilfe der **aRT-PCR** erfolgte die Expressionsanalyse von DAPK1 in humanen Lungenhomgenaten, mikrodissezierten Gefäßen (MDV) sowie PASMCs auf mRNA-Ebene. Diese wurde wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben durchgeführt. Bezüglich des DAPK1-Gens ist eine signifikante Erniedrigung der mRNA-Expression von erkrankten IPAH-hPASMCs. sowie Lungenhomogenaten als auch mikrodissezierten Gefäßen ersichtlich. So zeigte sich eine Erniedrigung der mRNA-Expression um das 10fache bei erkrankten IPAH- Lungenhomogenaten im Vergleich zu gesunden Lungenhomogenaten. Betrachtet man die hPASMCs, so kommt es zu einer Reduktion der DAPK-Expression um 80 %, bei den MCV zeigt sich eine Reduktion um 85 %.

Für die Expressionsanalysen auf Proteinebene wurden Western Blot-Analysen mit humanen gesunden Donor- und erkrankten PASMCs durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine signifikant verminderte DAPK1-Expression auf Proteinebene gegenüber gesunden hPASMC.



Abbildung 11: DAPK1 mRNA-Expression in humanen Lungenhomogenaten, mikrodissezierten Gefäßen und hPASMCs sowie DAPK1 Proteinexpression in hPASMCs

a. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S von gesunden und erkrankten humanen Lungenhomogenaten (Donor n=10, IPAH n=9), b. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S von gesunden und erkrankten humanen mikrodissezierten Gefäßen (MDV). (Donor n=4, IPAH n=5). c. Relative DAPK1 mRNA-Expression in Relation zu 18S von gesunden und erkrankten humanen PASMC. (Donor n=5. IPAH n=10). Alle Werte wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben. d. Repräsentative Western Blots von humanen gesunden Donor- und erkrankten IPAH- PASMC mit Pan-Actin als Ladekontrolle (n=3) e. Densitometrische Quantifikation der DAPK1-Expression bezogen auf die Pan-Actin Expression * p<0,1. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben.

3.2.2 Immunfluoreszenzfärbung von Lungenhomogenaten mit DAPK1

In einem nächsten Schritt wurden für die Immunfluoreszenzfärbung mit DAPK1 Lungenschnitte verwendet. In Abbildung 12 sind repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt.

Vergleicht man die gesunden Donor- mit den erkrankten IPAH- Lungenschnitten so zeigt sich, dass die Expression der Kinase DAPK1 im Bereich der erkrankten IPAH-Lungengefäße insgesamt vermindert ist. Dies ist vor allem im Bereich der SMCs deutlich zu sehen. Die durch die PAH bedingte Verdickung aller Wandschichten, vor allem aber der SMCs der Pulmonalgefäße ist ebenfalls zu detektieren.



Abbildung 12: Repräsentative Immunfluoreszenzfärbung von Lungenschnitten mit DAPK1

Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von gesunden Donor- und erkrankten IPAH-Lungenschnitten. (n=4) rot: α-SMA, blau: DAPI, grün: DAPK1. Scale bar: 50 μm.

3.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf das Expressionsmuster von pDAPK und DAPK1 in hPASMCs

In diesem Teil der Arbeit wurde die Wirkung von Wachstumsfaktoren auf das Expressionsmuster von pDAPK und DAPK1 in hPASMCs untersucht. Hierzu wurde im Rahmen der Versuche zum einen die Proteinexpression von pDAPK und DAPK1 mittels Western Blotting analysiert, zum anderen erfolgten Immunfluoreszenzfärbungen.

3.3.1 DAPK1-Proteinexpression in hPASMCs nach 24-stündiger Wachstumsfaktor-Stimulation

Zunächst erfolgte die Analyse der Proteinexpression von DAPK1 nach 24-stündigen Stimulation mit Wachstumsfaktoren. Hierfür wurde zuerst eine 24-stündige Serum-Starvation der hPASMCs durchgeführt, ehe die 24-stündige Stimulation mit Hilfe der Wachstumsfaktoren erfolgte, woraufhin sich die Protein-Lysierung und -Normalisierung sowie die Western Blot Analyse

anschloss. Bei den Wachstumsfaktoren handelte es sich um folgende: Platelet derived growth factor-ß Tumornekrosefaktor- α $(PDGF-\beta),$ $(TNF-\alpha)$. Interleukin-6 (II-6) und Growth Medium (GM). Letzteres setzte sich wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben aus einem Basalmedium und verschiedenen Wachstumsfaktoren zusammen. Betrachtet man die Proteinexpression von DAPK1 in hPASMCs, so stellt sich diese bei der Stimulation mit den Wachstumsfaktoren PDGF- β , TNF- α , II-6 und GM im Vergleich zur Kontrolle vermindert dar. Dies scheint bei PDGF- β - und TNF- α -Stimulation am stärksten ausgeprägt zu sein.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen mit DAPK1 wurden gesunde hPASMCs zunächst für 24 Stunden einer Serum-Starvation unterzogen und anschließend wie in Abschnitten 2.2.5.1 beschrieben mit den Wachstumsfaktoren PDGF- β , TNF- α , II-6 und GM für 24 Stunden stimuliert und anschließend gefärbt.

Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der Stimulation mit den Wachstumsfaktoren sowie der Kontrollgruppe mit BM sind in Abbildung 13 dargestellt. In der Kontrolle ist eine deutliche Anfärbung der Zellen mit dem DAPK1-Antikörper zu erkennen, die sich vor allem auf das Zytoplasma der Zellen fokussiert.

Auffallend bei der Stimulation der gesunden hPASMCs mit den Wachstumsfaktoren PDGF- β , TNF- α , II-6 und GM ist eine Signalreduktion und damit eine verminderte Expression von DAPK1. Interessanter Weise kommt es zudem zu einer Verschiebung des Expressionsmusters von DAPK1. Das vorher vordringlich im Zytoplasma befindliche DAPK1 ist nun hauptsächlich in Nukleus zu detektieren.

24 h

а



Abbildung 13a: DAPK1- Proteinexpression in hPASMCs nach Growth Factor-Stimulation

Repräsentative Western Blots von unstimulierten und für 24 Stunden stimulierten hPASMC mit Pan-Actin als Ladekontrolle (n=3). BM= Basalmedium, GM= Grwoth Medium Endkonzentrationen: PDGF -ß: 30 ng/ml, TNF-a: 10 ng/ml), IL-6: 50 ng/ml)


Abbildung 13b: DAPK1- Proteinexpression in hPASMCs nach Growth Factor-Stimulation Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von gesunden hPASMCs nach erfolgter 24-stündiger Stimulation mit den Growth Factors PDGF-β, TNF-α, II-6 und GM (n=3) blau DAPI, grün: DAPK1. Scale bar: 50 μm.

3.3.2 pDAPK- und DAPK1-Proteinexpression in hPASMCs nach Wachstumsfaktor- Timepoint-Stimulation

Da die Phosphorylierung von DAPK1 typischerweise zu einem früheren Zeitpunkt stattfindet, wurden anschließend Stimulationen zu verschiedenen Zeitpunkten mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren durchgeführt, um die Proteinexpression von pDAPK und DAPK1 genauer zu analysieren. Hierfür wurde nach durchgeführter Serum-Starvation eine Stimulation mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor für 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, sowie 60 min absolviert.

Abbildung 14 zeigt die Expression von pDAPK und DAPK1 auf Proteinebene in hPASMCs, bezogen auf die Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem jeweiligen Wachstumsfaktor, untersucht durch Western Blottina unter der erneuten Verwendung von Pan-Actin als Ladekontrolle. Die DAPK1-Proteinexpression der durch die Wachstumsfaktoren PDGF- β , TNF- α , II-6 und GM stimulierten hPASMCs ist gegenüber der Kontrolle Die Stimulation leicht erniedriat. mit den Wachstumsfaktoren PDGF- β , TNF- α , II-6 und GM bewirkt darüber hinaus eine Induktion der Phosphorylierung von DAPK1, die nach 5 bis 10-Stimulationsdauer in Western Blot minütiger ist die sichtbar wird. So Induktion der Phosphorylierung von DAPK1 durch einer II-6-Stimulation nach 10 min nachweisbar und erreicht sein Maximum bei 60 min. Die Phosphorylierung von DAPK1 bei PDGF-ß-Stimulation ist nach 10 min sichtbar und erreicht bei 30 min ihr höchstes Ausmaß, wohingegen die Induktion der Phosphorylierung von DAPK1 bei einer TNF- α - und GM-Stimulation bereits nach 5 min eintritt und ihr Maximum bei 15 min erreicht.



Abbildung 14: pDAPK- und DAPK1-Proteinexpression in hPASMCs nach Growth Factor-Timepoint-Stimulation

Repräsentative Western Blots von unstimulierten und timepoint-stimulierten hPASMCs mit Pan-Actin als Ladekontrolle (n=11). Endkonzentrationen: PDGF -ß: 30 ng/ml, TNF-a: 10 ng/ml), IL-6: 50 ng/ml)

3.4 Effekt von DAPK1 auf die Proliferation von humanen PASMCs

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Rolle von DAPK1 bezüglich des Proliferationsverhalten von humanen PASMCs untersucht. Hierbei sollte beleuchtet werden, inwieweit eine Inhibierung von DAPK1 mittels siRNA die Proliferationsrate in humanen PASMC beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Transfektion von hPASMCs siRNA-DAPK (200 mM) und siRNA-NC mit durchgeführt, um eine gezielte Abschaltung des Gens bzw. eine verminderte Produktion des durch mRNA kodierten Proteins hervorzurufen die Anschließend wurde der BrdU-Proliferationsassav verwendet, um hieraus Rückschlüsse auf den Effekt einer DAPK1-Inhibierung auf das Proliferationsverhalten ziehen zu können.

3.4.1 BrdU-Proliferationsassay

Es erfolgte zunächst die Transfektion von gesunden hPASMCs mit siRNA DAPK1 und siRNA NC, ehe die erste Gruppe dieser hPASMCs lediglich mit BM versetzt und die zweite Gruppe mit GM stimuliert wurde Der BrdU-Proliferationsassay wurde daraufhin wie in Abschnitt 2.2.2.7 beschrieben angewendet. Im Bereich der BM-Gruppe zeigt sich keine signifikante Änderung der Proliferationsrate, allerdings geringe Abnahme war eine der Proliferationsrate der siRNA-DAPK1 Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Bezüglich der GM-Gruppe konnte eine leichte, jedoch ebenfalls nicht signifikante Zunahme der Proliferationsrate in der siRNA-DAPK1 Gruppe notiert werden, welche durch Zunahme der Absorptionswerte auffiel.



Abbildung 15: BrdU-Proliferationsassay von hPASMCs nach Transfektion mit siRNA DAPK1 und siRNA NC

A. Repräsentative Western Blot von siRNA NC und siRNA DAPK1 mit den Konzentrationen 50 nM, 100 nM und 200 nM in hPASMCs mit Pan-Actin als Ladekontrolle. *B.* Absorptionswerte von hPASMC nach Transfektion mit siRNA-DAPK1 (200 nM) und siRNA-NC. Die erste Gruppe der hPASMCs wurde mit BM versetzt, die zweite Gruppe wurde mit GM stimuliert.

4. Diskussion

Die pulmonale Hypertonie ist eine Erkrankung multifaktorieller Genese, die eine schlechte Prognose hat und in ihren verschiedenen Formen mehr als 100 Millionen Menschen weltweit betrifft. Obwohl die molekulare Pathogenese noch größtenteils unbekannt ist, konnten bereits einige molekulare sowie zelluläre genetische. Abnormitäten in der PH identifiziert werden. Diese Erkenntnisse führten zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten. So werden PH-Patienten aktuell mit einer Kombination von Medikamenten 5 pharmakologischen Substanzklassen aus Diese sich therapiert. setzten aus Calciumkanalblockern, Prostazyklin-Analoga, Endothelin-1-Rezeptor-Anatagonisten, sGC Guanylatzyklase)-Stimulatoren (lösliche und Phosphodiesterase (PDE5)-Inhibtoren zusammen bleibt [5][73][74]. Jedoch auch diese Behandlungsstrategie unzureichend, da die Mortalitätsrate zum einen weiterhin hoch ist und die funktionalen hämodvnamischen und Beeinträchtigungen in einer Vielzahl von Patienten weitreichend bleiben, welches überdies die Notwendigkeit unterstreicht, neue therapeutische Ziele zu identifizieren [75][76][77][78].

Ein weiteres pathophysiologisches Merkmal der Erkrankung ist ein cancer-like, pro-proliferativer und Apoptose-resistenter Phänotyp, wodurch die PH einige Analogien zu Neoplasien aufweist [21][79]. Auch wenn die PH keine Krebserkrankung darstellt und PH-Zellen eher als ein intermediärer Zelltyp zwischen normalen Zellen und Krebszellen angesehen werden können, so könnten diese Ähnlichkeiten zwischen PH und Krebs jedoch zu einem besseren Verständnis der bei der PH beobachteten zellulärer Dysregulationen beitragen [20].

Die pro-apoptotische Proteinkinase DAPK1 ist an einer Vielzahl von zellulären Signalwegen beteiligt und fungiert als Tumorsupressor, indem sie unter anderem durch Caspase-abhängige Mechansimen zur Apoptose führt. Zudem ist bekannt, dass DAPK1 in zahlreichen Krebsarten eine verminderte Expression aufweist, wodurch die Progression der Erkrankung weiter vorschreitet [33][40]. Die Darlegung von DAPK1s potentieller Kontribution zu der Pathophysiologie der PH könnte die Möglichkeit eröffnen, neue Ansatzpunkte in dessen Behandlung aufzudecken.

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die Rolle der Proteinkinase DAPK1 in Pulmonaler Hypertonie und die sich daraus ergebenden potentiell therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten wurden bis dato nicht genauer ergründet. In dieser Arbeit wurde deshalb erstmalig das Expressionsmuster von DAPK1 in pulmonaler Hypertonie detailliert erforscht und ein Einblick auf dessen Effekt bezüglich des Proliferationsverhaltens von hPASMCs gegeben.

Im Rahmen des Versuchsaufbaus der experimentellen PH konnte gezeigt werden, dass es sowohl im MCT-Rattenmodel als auch im chronischen Hypoxie-Model zu einer teils signifikanten Reduktion der Expressions und damit einer Herunterregulation von DAPK1 im Vergleich zur Kontrollgruppe kommt. Dies ließ sich ebenfalls durch Immunfluoreszenzaufnahmen veranschaulichen. Diese Daten wurden durch Untersuchungen von klinischer PH vervollständigt, die ebenfalls eine Verminderung der DAPK1-Expression in IPAH-Patienten zeigten und den Effekt einer Wachstumsfaktor-Stimulation auf das Expressionsmuster von DAPK1 darlegte.

Weiterhin wurde der Einfluss einer DAPK1-Inhibition mittels siRNA auf das Proliferationsverhalten von hPASMCs analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von DAPK1 keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten von hPASMCs hat.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Das Tiermodell

Die Verwendung von Tiermodellen hat wesentlich zum gegenwärtigen Verständnis der Pathophysiologie der PH beigetragen und die Untersuchung experimenteller Behandlungsoptionen ermöglicht. So werden zwei klassische und am häufigsten verwendete Tiermodelle der PH unterschieden: das MCT-Modell sowie das chronisch Hypoxie-Modell.

4.2.1.1 Das MCT-Modell

Im MCT-Modell wird durch Injektion mit dem Alkaloid Monocrotalin, welches aus der Pflanze Crotalaria Spectabilis gewonnen wird. die progressive Entwicklung einer PH in unterschiedlichen Tierspezies induziert. Nach Injektion kommt es zur Metabolisierung von MCT zu MCTP und damit zur Aktivierung des Alkaloids durch das sich in der Leber befindliche Enzym 25.01.22 16:00:00Cytochrom-P450. Obwohl die genauen Mechanismen, durch die MCT eine PH hervorruft, noch nicht genau bekannt sind, geht man davon aus, dass die aktivierte Form von MCT einen direkten Endothelschaden induziert, der die weitere Progression zu einer PH triggert [75][80][81][82]. So kommt es histopathologisch zu einer Intimahyperplasie, Mediahypertrophie sowie zu einer Verdickung der Adventitia. Zusammen mit einer Muskularisierung von ZUVOR nichtmuskularisierten Arterien führen diese

Veränderungen zu einem erhöhten pulmonalarteriellen Druck mit einer rechtsventrikulären Hypertrophie, welche mit der humanen Manifestation der Erkrankung korrelieren [75][80][81]. Die PH ist in dem MCT-Modell zudem durch eine vermehrte Apoptoserate in Endothelzellen, eine vermehrte Proliferationsrate in PASMCs und eine erhöhte Apoptoseresistenz in PASMCs gekennzeichnet [82][83][84]. Die Injektion von MCT wird heutzutage durch eine einmalige subkutane oder intraperitoneale Verabreichung durchgeführt. Dies mach das MCT-Modell zu einer technisch einfachen. günstigen, qut reproduzierbaren und damit für ein großes Spektrum an Forschungsgruppen zugängliches Tiermodell. Die präferierte Tierspezies für das MCT-Modell der PH stellt die Ratte dar. Dies liegt unter anderen daran, dass die Reaktion des Organismus auf die MCT-Injektion aufgrund von Unterschieden in der hepatischen Metabolisierung durch das Cytochrom-P450 von Spezies zu Spezies variieren. So scheinen Mäuse beispielweise nicht in der Lage, Monocrotalin zu einem aktiven Metaboliten zu verstoffwechseln und eine höhere Resistenz gegenüber der Substanz aufzuweisen als Ratten. Diese Abhängigkeit von dem Cytochrom-P450-Metabolismus stellt einen negativen Aspekt des Tiermodells dar [75][81][82]. Den zuvor erläuterten histopathologischen Befunden im MCT-Modell ist hinzuzufügen, das keine plexiformen Läsionen vorzufinden sind, was der histopathologischen Situation der humanen PAH widerspricht. Berichte von Forschern, die aufzeigten, dass das MCT-Modell zudem zu einer Myokarditis, zu Leber- und Nierenerkrankungen sowie zu veno-okklusiven Veränderungen führen kann, sind nicht außer acht zu lassen und ebenfalls uncharakteristisch für die humane PH. Ein weiterer Negativpunkt für dieses Tiermodel stellt die Reversibilität und Prävention der induzierten PH durch eine Vielzahl an experimentellen und therapeutischen Behandlungen dar. Hierbei kritisch zu betrachten ist, dass es sich dabei teils um Substrate wie Dexfenfluramin oder Elastase handelt, bei denen man davon ausgeht, dass sie zur Entstehung einer humanen PH beitragen [75][80][85][86]. Aufgrund dieser Eigenschaften wird das MCT-Modell von einigen Forschern eher als akut toxisches

Krankheitsmodell angesehen. Jedoch gibt es einige Ansätze, um das MCT-Modell zu verbessern. So konnte gezeigt werden, dass bei der Kombination einer MCT-Injektion mit einer zusätzlich durchgeführten Pneumonektomie plexiforme Läsionen nachweisbar waren [75][81][87].

4.2.1.2 Das chronische Hypoxie-Modell

Bei dem chronischem Hypoxie-Modell wird durch eine 2-wöchige normo- oder hypobare Hypoxie eine PH in einer Vielzahl von Tierarten hervorgerufen. Bei den hierbei am häufigsten verwendeten Tierarten handelt es sich vornehmlich um Ratten und Mäuse [75][81]. Verglichen mit dem MCT-Modell weist das chronische Hypoxie-Modell eine innerhalb Reproduzierbarkeit qute eines Tierstammes und eine hohe Ähnlichkeit bezüglich der strukturellen Veränderungen in fast allen Säugetieren auf, wobei sich das Ausmaß der PH entwickelten unterscheiden kann. Histopathologisch einer kommt es ZU Muskularisierung von kleinen zuvor nichtmuskularisierten Arterien, moderaten 7Ur Verdickung von muskulären Widerstandsgefäßen

sowie signifikanten 711 einer Verdickung, Fibrosieruna und Versteifuna von aroßen proximalen Pulmonalarterien [81] [88]. Dies histopathologischen Veränderungen führen zu einer Erhöhung des mPAP und zur Ausbildung einer rechtsventrikulären Hypertrophie, wie es auch bei humaner PH zu beobachten ist. Somit stellt die hohe Vorhersagbarkeit und aute Reproduzierbarkeit einen großen Vorteil des chronischem Hypoxie-Modells dar. Ein weiterer Vorteil dieses Modells ist sein physiologischer Stimulus, der ebenfalls in einem Teil der humanen PH zu finden ist [81]. Die bei humaner PH und besonders bei der PAH auftretenden nichtreversiblen Intimafibrosen und plexiforme Läsionen sind bei diesem Tiermodell nicht zu finden, was eine deutliche I imitation Modells des darstellt [75][81][80][89][90]. Ebenfalls anzumerken ist, dass die durch chronische Hypoxie induzierte PH durch die Wiederherstellung normoxischer Bedingungen reduzierbar und sogar reversibel zu sein scheint. So könnte das chronische Hypoxie-Modell als ein Model für weniger schwere Formen der PH, jedoch nicht der PAH, angesehen werden und hat vor allem Relevanz für PH-Formen der WHO Gruppe 3, also PH. die mit Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie assoziiert sind Diese Limitation scheint in neueren Tiermodellen der PH bedacht zu werden. So wird PH in einem aktuellen Modellversuch durch chronische Hypoxie sowie durch einen VEGF-Inhibitor hervorgerufen, was histopathologisch zu pulmonal-arteriellen Veränderungen führt, die den plexiformen Läsionen in humaner PH ähneln [91]. Ebenfalls ist zu beobachten, dass es zu einer Irreversibilität der PH und einer Unempfindlichkeit gegenüber therapeutischer Behandlung kommt. Diese Beobachtungen stellen wichtige Merkmale des Modellversuchs dar und deuten darauf hin, dass es sich hierbei um ein Modell handeln könnte. das stärkere Ähnlichkeit mit der humanen PH aufweist [80][81].

Die Heterogenität der PH beim Menschen und die Schwierigkeiten bei deren Therapie machen die PH zu einer sehr komplexen Erkrankung. Dies deutet die Notwendigkeit, aber auch die Ansprüche für den Einsatz von Tiermodellen und die stetige Entwicklung verbesserter Modelle an. Jedoch ist

ebenfalls ersichtlich, dass es derzeit kein perfektes präklinisches Modell für humane PH gibt, welches alle klinisch pathologischen Merkmale der verschiedenen Gruppen der humaner PH akkurat reproduziert. Die derzeitig zu vermerkenden Fortschritte bei der Behandlung von PH zeigen, dass die wissenschaftlichen Ergebnisse, die auf Tiermodellen basieren. letztlich einer zu dramatischen Verbesserung der Versorgung von führen PH-Patienten können Sowohl die kombinierte Anwendung verschiedener Tiermodelle als auch die stetige Entwicklung und Verbesserung von Tiermodellen sind deswegen essentiell und erlauben uns neue Hypothesen bezüglich der und der Therapie der PH zu Pathogenese beleuchten [75][80][81].

Da im Zuge dieser Arbeit der Fokus auf das Expressionsmuster von DAPK1 in PH gelegt wurde, wurden sowohl das chronische Hypoxie-Modell als auch das MCT-Modell als Tiermodell gewählt, um so erste Eindrücke bezüglich der DAPK1-Expression in PH zu erlangen und diese durch weitere klinische PH-Modelle zu vervollständigen. Im weiteren Verlauf der Forschung könnten weitere Tiermodelle ergänzend eingesetzt werden.

4.2.2 Das Zellkulturmodell

Zellkulturstudien stellen eine wertvolle Ergänzung zu In-vivo-Experimenten dar und ermöglichen eine kontrollierte Manipulation und Analyse der Zell-Funktionen und -Prozesse. Ein zentraler Vorteil in der Arbeit mit dem Zellkulturmodell ist seine Einfachheit im Vergleich zu Untersuchungen mit komplexen Organen, die sich normalerweise aus vielen verschiedenen Zelltypen zusammensetzen. So ist es mit der Zellkultur möglich, in einer genau definierten Umgebung eine kleine Anzahl von Zellen eines einzigen Typs zu beobachten, die durch Erweiterung einer ursprünglichen Population werden Zudem können die gewonnen physiologisch-chemischen Rahmenbedingungen innerhalb der Kultur, wie Hormonspiegel, Gehalt an Nährstoffen, pH-Wert, Temperatur oder Osmolarität im in-vitro System präzise kontrolliert werden. Im Rahmen der pathophysiologischen Prozesse der PH kommt es nachweislich zu einer erhöhten Proliferationsrate und Apoptoseresistenz unter anderem in SMCs, was maßgeblich zur Progression der Erkrankung beiträgt [25][26][28][92]. Neben der Analyse und Beschreibung der der PH zugrunde liegenden Mechanismen in vivo besteht daher der Bedarf an in-vitro-Systemen, mit denen die Mechanismen. molekularen die an der physiologischen und pathophysiologischen Funktionen Regulierung der der alatten Gefäßmuskelzellen (SMC) beteiligt sind, weiter untersucht werden können. In diesem Sinne konzentrierte sich diese Arbeit auf Zellkulturuntersuchungen mit PASMCs.

Zu den Einschränkungen der Zellkultur zählen jedoch das begrenzte Vermehrungspotenzial der meisten Zellen, die Möglichkeit einer unerwarteten Infektion mit Viren, Mikroorganismen oder eine Kreuzkontamination mit anderen Zelltypen. Die zur Vermehrung von Zellen verwendeten Medien sind reich an Nährstoffen und unterstützen daher das Wachstum einer Vielzahl von Organismen. erfordern die Dementsprechend meisten Kulturverfahren sterile Bedingungen. Die Aufrechterhaltung dieses sterilen aseptischen **Zustands** stellt eine Herausforderung der Zellkulturmodells dar Oft werden zusätzlich Antibiotika eingesetzt. um das Wachstum unerwünschter mikrobieller Kontaminanten 711 hemmen. Eine andere Schwierigkeit bei einigen kultivierten Zellen ist ihre Neigung, ihre Morphologie, Funktionen oder den Genbereich, den sie exprimieren, zu verändern. Daher ist ein standardisiertes Vorgehen bezüglich des Umgangs mit Zellen erforderlich. Weitere Limitationen des Zellkulturmodells setzten sich aus den Grundprinzipien des Modells selbst zusammen. So stellen die Schwierigkeiten beim Erfassen von interzellulären Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Zelltypen eine zu nennende Limitation des Modells dar. Im Falle dieser Arbeit können hierdurch beispielsweise die von Eddahibi et. al.: 2006 beschriebenen Wechselwirkungen zwischen PASMCs und PECs (Pulmonale Endothelzellen) nicht weiter eruiert werden [92]. Folglich bleiben die möglichen Effekte einer interzellulären Kommunikation verschiedener Zellen hinsichtlich der DAPK1-Expression im Rahmen der Zellkulturversuche dieser Arbeiten unberücksichtigt.

Das Zellkulturmodell sollte demnach als ein wichtiger Teil einer komplexen Methodik angesehen werden, mit Hilfe derer zentrale Themen der Forschung eruiert werden können.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 DAPK1-Expressionsmuster in experimenteller PH

Die vorliegende Arbeit konnte aufzeigen, dass es zu einer Herunterregulation der DAPK1-Expression in experimenteller PH kommt. So zeigte sich sowohl im MCT-Rattenmodell als auch im chronischen Hypoxie-Modell, dass es in Lungenhomogenaten und genauer in pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMCs) zu einer Veränderung des Expressionsmuster von DAPK1 im Sinne einer Reduktion kommt. Dies ließ sich ebenfalls durch Immunfluoreszenzfärbungen bestätigen, welche zeigten, dass die DAPK1-Expression im Bereich der erkrankten Lungengefäße insgesamt vermindert ist. Hierdurch lässt sich eine potentiell zentrale Rolle von DAPK1 bezüglich der pathophysiologischen Prozesse im Zusammenhang mit der Entstehung von PH vermuten. Einen wichtigen Bestandteil der Pathophysiologie der PH stellt unter anderem die PASMCs Apoptose-Resistenz in dar [20][21][28][93][94]. Anzumerken ist, dass DAPK1 erstmalig im Zusammenhang mit IFN-gamma induzierter Apoptose entdeckt wurden und seitdem zahlreiche über Signalkaskaden mit proapoptotischen Zelltod-Entscheidungen in Verbindung gebracht wird [37]. Beispielsweise konnten Yamamoto M. und Llambi F. in zwei Studien demonstrieren, dass die Expression von zu einem verstärkten DAPK1 Ceramidund UNC5H-induzierten Zelltod führt [61][95]. Bei genauerer Betrachtung der vielfältigen Substrate und Effektoren von DAPK1 sind einige für die Vermittlung der pro-apoptotischen Signalkaskaden DAPK1s von zentraler Bedeutung. So führt DAPK1 durch dessen Substrat Beclin 1 zu Autophagie [96]. Zur Verstärkung der zellulären Effekte von DAPK1 bezüglich der Apoptose dient des Weiteren die der

DAPK-Familie zugehörige ZIP-Kinase (DAPK3). Die Verstärkung der Zelltod-stimulierenden Funktionen von DAPK1 wird durch die Phosphorylierung von ZIPK und die weitere Förderung ihrer zytoplasmatischen Retention erreicht [33][97]. Ein weiterer Signalweg, über den DAPK1 ihre pro-apoptosichen Eigenschaften vermittelt, involviert die Proteinkinase D (PKD). Die in Dirkx et. al., 2012 beschriebene Interaktion zwischen DAPK1 und PKD führt in Kardiomyozyten zur JNK-Aktivieruna und folglich zur programmierten Nekrose, wodurch DAPK1 mit einem weiteren Zelltod-Signalweg verbunden ist [98][99][100]. Zugleich führt die Inaktivierung von DAPK1 zu einer Reduktion der Induktion von p19ARF/p53 und einer Einschränkung des p53abhängigen Apoptoseweges [70][40]. Folglich kann der Verlust von DAPK1 zu einer Dämpfung von p53 abhängigen pro-apoptotischen Signalen führen.

Eine verminderte Expression von DAPK1 bzw. dessen Deaktivierung könnte so über verschiedene nachgeschaltete Signalwege mit der Apoptose-Resistenz von PASMCs in PH zusammenhängen und die Progression der Erkrankung maßgeblich beeinflussen.

Auffallend bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit ist, dass es im chronischen Hypoxie-Modell von humanen und murinen PASMCs zu einer Steigerung der Expression von DAPK1 auf mRNA-Ebene, jedoch zu einer Reduktion des Expressionsmusters auf Proteinebene kommt. Zunächst soll genauer auf die Steigerung der Expression von DAPK1 auf mRNA-Ebene eingegangen werden.

In der von Ting-Fang Chou et. al im Jahr 2016 veröffentlichen Studie beschreiben die Autoren zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen DAPK1 und dem Hypoxia-inducible factor 1α (HIF- 1α). Demnach kommt es im Rahmen einer Th17-Zellen-Inhibition durch DAPK1 zu einer zytosolischen Interaktion zwischen DAPK1 und HIF- 1α , die zu einer Herunterregulation und Degradation von HIF- 1α führt [101]. HIF- 1α fungiert als Hauptregulator der zellulären und systemischen homöostatischen Reaktion bezüglich Hypoxie durch Aktivierung der Transkription zahlreicher Gene, die beispielsweise

am Energiestoffwechsel oder Apoptose beteiligt sind, und anderen Genen, deren Proteinprodukte die Sauerstoffzufuhr erhöhen oder die metabolische Anpassung an eine Hypoxie erleichtern. Jedoch wurde auch gezeigt, dass eine verlängerte HIF-1α-Aktivierung zu großen strukturellen Veränderungen insbesondere in der Lunge beitragen kann, welche zur Entwicklung einer PH führen können. So tragen die durch Hypoxie aktivierten HIF-1 α -Signalwege zur Pathogenese von PH bei, indem sie die Expression mehrerer Gene regulieren, die für das Remodeling pulmonal-vaskuläre und das Fortschreiten kritisch der Erkrankung sind [102][103][104]. Ausgehend von Chou et. al., 2016 und ihrer Darstellung des Zusammenhangs zwischen DAPK1 und HIF-1 α könnte man vermuten. dass in konträrer Richtung, also zwischen HIF-1 α und DAPK1, ebenfalls eine Interaktion im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus existiert. Das durch die chronische Hypoxie aktivierte und übermäßig exprimierte HIF-1α könnten demnach zu einer gesteigerten DAPK1-Expression auf mRNA-Ebene führen. Inwiefern dies

zutrifft und ob eine längere Hypoxiedauer, wie sie bei den Lungenhomogenaten der Mäuse erfolgte. auch bei den PASMCs im Verlauf eine Reduktion der DAPK1-Expression auf mRNA Fhene herbeiführt, bleibt im Rahmen dieser Arbeit ungeklärt und stellt eine klare Limitation dieser da. Anzumerken ist weiterhin, dass ein Vergleich des **DAPK1-Epressionsmusters** auf mRNA-Ebene zwischen Lungenhomogenaten und PASMCs aufgrund des unterschiedlichen Versuchsaufbaus der unterschiedlichen Hypoxiedauer und nur eingeschränkt möglich ist.

Ein Expressionsverlust von DAPK1 hingegen wird hauptsächlich durch eine Hypermethylierung des Promotors induziert, welche im Bereich 5'UTR des DAPK1-Genes stattfindet und zu einem Gen-Silencing der Kinase führt [41][38][43][105]. Neben dieser Hypermethylierung als häufiger Initiator des Expressionsverlusts von DAPK1 wird ebenfalls eine homozvaote Deletion beschrieben [106][107]. Diesen beiden Regulationsmechanismen ist allerdings gemeinsam, dass sie einer zu verminderten Expressions auf mRNA- als auch auf Proteinebene von DAPK1 führen. Dies spiegelt sich iedoch nicht im chronischen Hypoxie-Modell von humanen und murinen PASMCs wider. So scheint der Expressionsverlust von DAPK1 im chronischen Hypoxie-Modell der hPASMCs und mPASMCs nicht durch eine Hypermethylierung des Promotors bedingt zu sein. Stattdessen lässt sich vermuten, dass der Stimulus einer chronischen Hypoxie zu einer Degradation der Proteinkinase DAPK1 führt, welches den Expressionsverlust auf Proteinebene, nicht jedoch auf mRNA-Ebene erklären würde. Dies würde sich mit den Erkenntnissen decken, die Jin, Blue und Gallagher; 2006 in ihrer Studie aufzeigten. Studie determinierten In der sie. welche für die Mechanismen Veränderung des Expressionsniveaus von DAPK1 während einer TNFoder Ceramid-induzierten Apoptose verantwortlich sind. Es wurde festgestellt, dass die DAPK1-Aktivität zum einen durch den Phoshorylierungsstatus, zum anderen aber auch durch eine proteasomale Degradation moduliert wird. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ergebnissen weiterer Studien, nach denen DAPK1 mit DIP1/MIB1 (DAPK-interacting protein-1/MindBomb) in Wechselwirkung tritt, welches eine E3-Ligase darstellt, die neben ihren vielfältigen anderen Funktionen die Poly-Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von DAPK1 vermittelt [108]. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte weiterhin verifiziert werden, dass es zwischen HSP90 (Heat Shock Protein 90) und DAPK1 zu einer Bindung und einer damit einhergehenden Stabilisierung von DAPK1 kommt. Die Inhibition von HSP90 führt folglich zu einer Degradation von DAPK1 in einer Proteasomen-abhängigen Weise [109].

Diese Forschungsergebnisse werfen die Möglichkeit auf, durch die Kontrollierung der DAPK1-Degradierung und der damit einhergehenden DAPK1-Stabilität einen neuen Mechanismus zu etablieren, der den Proteinspiegel von DAPK1 und somit seine Gesamtaktivität zu regulieren vermag.

4.3.2 DAPK1-Expressionsmuster in klinischer PH

von DAPK1 Dem Expressionsmuster wurde anschließend detaillierter klinischer in PH Die erschlossenen nachgegangen. zuvor Ergebnisse einer Herunterregulierung von DAPK1 in experimenteller PH korrelieren hierbei mit den Ergebnissen in klinischer PH. Auch hier ist eine Herunterregulation der DAPK1-Expression auf mRNA- und Proteinebene festzustellen

Dies ähnelt den Erkenntnissen von Inbal B, Cohen O et. al., welche ebenfalls eine Verminderung der Expression von DAPK1 beobachteten und dessen Zusammenhang mit der Krebsentstehung bereits früh demonstrieren konnten und so die Identifikation von DAPK1s Rolle als Tumorsuppressor einleiteten [38][39][40]. Weitere Forschungen festigten die Annahme, dass DAPK1 als ein Tumorsuppressor agiert und zudem die zelluläre Transformation in frühen Phasen der Tumorentstehung supprimiert [41][40][42]. Katzenellenbogen, Baylin und Herman konnten des Weiteren zeigen. dass in Übereinstimmung mit den experimentellen Nachweisen für die Tumorsuppressor-Funktion von DAPK1 ein breites Spektrum von Krebsformen eine signifikant verminderte Expression von DAPK1 aufweist [43][110][111][112][113][114][115][116]. Aufgrund zahlreicher Überlappungspunkte, unter denen der deregulierte zelluläre Metabolismus, die anhaltende Proliferation und die Umgehung der Apoptose eine zentrale Rolle spielen, hat sich die PAH nunmehr als krebsähnliche Erkrankung etabliert [94][117].

So unterbreiteten Rai et. al.; 2007 erstmalig ein Krebs-Paradigma für die PH, durch welches das Konzept der "quasi-malignen" Zelle beschrieben wurde [21]. Weiterhin konnten wie in Abschnitt 1.1.4 bereits erläutert 7 der durch Hanahan und Weinberg; 2011 beschriebenen 8 Eigenschaften, die kennzeichnend für die Transformation und Entstehung von Neoplasien sind, ebenfalls in pulmonalen Gefäßzellen von PH-Patienten nachgewiesen werden. Die Fähigkeit von Neoplasien zur Invasion und Metastasierung konnte nicht in PH nachgewiesen werden und stellt somit eine Diskrepanz zwischen beiden Erkrankungen dar. Diese und weitere Ergebnisse zahlreicher

Forschungen demonstrieren somit, dass der PH-Phänotyp einige Parallelen zu Neoplasien und der [20][21][30]. Krebsentstehung aufweist Hinzukommend konnte nachgewiesen werden. dass in plexiformen Läsionen sowohl von IPAH-Patienten als auch von assoziierten PAH-Formen die Tumorsuppressor-Proteine p27, Peroxisom proliferator-activated receptor-y und Caveolin nicht oder vermindert nur exprimiert werden [17][118][119].

Somit könnte die Expressionsveminderung des Tumorsuppressors DAPK1, die sowohl in Neoplasien als auch in PH nachgewiesen werden konnte, demnach ein wichtiger Bestandteil der pathophysiologischen Prozesse darstellen, die zu den neoplasie-ähnlichen Eigenschaften in PH führen.

4.3.3 Einfluss einer Wachstumsfaktor-Stimulation auf das Expressionsmuster von DAPK1 und pDAPK in hPASMCs

Entzündungsprozesse sind bei verschiedenen Formen der PH von herausragender Bedeutung und

zunehmend als werden wichtige pathogene Komponenten des pulmonal-vaskulären Remodelings erkannt. Beispielweise weist eine Teilmenge von PH-Patienten erhöhte Werte von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 oder IL-6 auf [120]. Bei genauerer Betrachtung von IL-6 konnte eine Induktion der Entwicklung und Progression eines pulmonal-vaskulärem Remodeling sowie der PH durch pro-proliferative und anti-apoptotische Mechanismen nachgewiesen werden [121]. Auch eine Überexpression des Tumor-Nekrose-Faktors TNF- α wird mit pulmonalvaskulärem Remodeling und der Entstehung einer schweren PH assoziiert [122]. Zudem sind mehrere Wachstumfaktoren, einschließlich des Plateletderived growth factors (PDGF-ß) an der abnormen Proliferation und Migration von pulmonal-arteriellen Gefäßzellen beteiligt, wirken als Mitogene für SMCs, Fibroblasten und ECs und verursachen eine Apoptose-Resistenz [123]. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden. das PDGF-ß ein Schlüsselmediator in der Progression einiger fibroproliferativen Erkrankungen wie Lungenfibrose und PH darstellt [124]. Dies wurde in der Studie von Perros et. al. 2008 demonstriert, in der eine erhöhte PDGF-ß-Expression in Patienten mit schwerer PH nachgewiesen werden konnte [125].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Korrelation zwischen einer Stimulation mit den oben genannten Wachstumsfaktoren und der DAPK1-Expression in hPASMCs erujert. Hierbei konnte determiniert werden, dass es bei einer PDGF- β -. TNF- α - sowie IL-6-Stimulation zu einer Reduktion der DAPK1-Expression und zudem zu einer Phosphorvlierung und damit einer Inaktivierung der Proteinkinase kommt, welche jedoch bei der TNF- α Stimulation am geringsten ausgeprägt war. Auch in der Literatur sind deutliche Diskrepanzen bezüglich der Effekte einer TNF- α Stimulation auf DAPK1 festzutellen. Einerseits berichten Cohen O. et. al 1999 von einer DAPK1-induzierten Apoptose nach TNF- α Stimulation, was jedoch im Widerspruch mit der Studie von Lin Y. et. al 2007 steht. Diese und weitere Studien zeigten, das DAPK1 sogar eine Überlebensrolle für Zellen bezüglich der TNF- α -Signalkaskade spielen könnte [58][126][52][108]. Diese Diskrepanz könnte durch die Kombination von TNF- α mit Cycloheximiden bedingt sein. Weitere Untersuchungen müssten angeschlossen werden, um ein genaueres Bild über die Wirkungsmechanismen einer TNF- α Stimulation bezüglich der DAPK1-Expression in humanen PASMCs zu erlangen, jedoch geben die Daten dieser Arbeit erste Hinweise bezüglich einer Korrelation zwischen einer PH-typischen Wachstumsfaktor-Stimulation und einer Veränderung des DAPK1-Expressionsmusters in hPASMCs wieder

Zusammenfassend sind weitere Studien erforderlich, um die genauen Mechanismen, die der Überaktivierung abnormalen einiaer durch Wachstumsfaktoren stimulierten Signalwege in PH zugrunde liegen, besser zu verstehen und zu eruieren. welche Rolle DAPK1 in diesen Signalwegen in PH spielt.

Bei Betrachtung der Immunfluoreszenzfärbungen von mit Wachstumsfaktoren stimulierten hPASMCs ist im Vergleich zu unstimulierten hPASMCs zum einen eine Verminderung der DAPK1-Expression auffallend, zum anderen weisen die Daten darauf hin, dass DAPK1 in stimulierten hPASMCs vorwiegend im Nukleus lokalisiert ist, während eine DAPK1-Expression in den Nuklei der unstimulierten hPASMCs nahezu fehlend ist.

Diese Verschiebung der DAPK1-Expression vom Zytoplasma Richtung Nukleus kann Auswirkungen auf die Aktivität der Proteinkinase haben, da wie in Bialik, Bresnick und Kimchi; 2003 beschrieben, die Lokalisation des Proteins eine entscheidende Rolle in dessen Interaktion mit dem Zytoskelett und Zytoskelett-assoziierten Substraten wie MLC und Tropomyosin spielt. MLC und Tropomyosin tragen durch Stressfaserformationen DAPK1s 711 Zytoskelett-bezogenen Wirkungen, einschließlich Membran-Blebbing und Zellmotilität bei. So besitzt DAPK1 eine Cytoskeletal-Interacting-Domain sowie Protein-Protein-8 Ankyrin-Repeats. die ein Interaktionsmotiv darstellen und für die richtige Lokalisation der Proteinkinase DAPK1 sowie für zellulären Effekte des Proteins erforderlich sind. Daher ist die genaue intrazelluläre Lokalisierung von DAPK1 für die Exposition gegenüber seinen Substraten entscheidend

Zudem könnte diese Verlagerung der Lokalisation des Enzyms innerhalb der Zelle die Rolle von DAPK1 bei der Initiierung einer unkontrollierten Zellzyklus-Regulation vermuten lassen.

4.3.4 Effekt von DAPK1 auf die Proliferation von hPASMCs

Da ein weiterer wichtiger Bestandteil der PH-Pathophysiologie in der erhöhten Proliferationsrate hPASMCs besteht, wurde abschließend von untersucht. inwiefern sich DAPK1 auf das Proliferationsverhalten von hPASMCs auswirkt. Hierbei konnte keine Korrelation zwischen einer Inhibition von DAPK1 und einer Veränderung der Proliferationsrate von hPASMCs detektiert werden. Dies deckt sich jedoch nicht mit der zuvor formulierten Hypothese einer gesteigerten Proliferationsrate von hPASMCs nach Inhibition von DAPK1. Diese Hypothese lässt sich aufgrund einiger Substrate und Signalkaskaden DAPK1s formulieren. So stellt das ribosomale Protein S6 ein weiteres Substrat von DAPK1 da, welches nach erfolgter Phosphorylierung mit Zellwachstum und
Zellgrößen-Determination in Verbindung gebracht wird [127]. Weiterhin phosphoryliert DAPK1 Pin1, was zu einer Inhibition seiner Prolylisomerase-Aktivität führt und womit DAPK1 als ein negativer Regulator der Zellzyklusprogression fungiert [69]. Beide Moleküle verknüpfen DAPK1 somit mit seinen potenziellen anti-proliferativen und antimigratorischen Funktionen.

Inwiefern und ob DAPK1 tatsächlich Auswirkungen auf die Proliferationsrate von hPASMCs hat, muss in weiteren Untersuchungen genauer eruiert werden.

4.4 Fazit

dieser Arbeit konnte erstmalig Im Zuge ein Zusammenhang zwischen den Expressionsmuster von DAPK1 und PH dargestellt werden. Anhand der hier gewonnenen Daten ist ersichtlich, dass es sowohl in experimenteller als auch in klinischer PH zu einer Reduktion der DAPK1-Expression kommt. So ist bei dem verwendeten MCT-Rattenmodel eine Verminderung der DAPK1-Expression sowohl auf sowie mRNA-Ebene auf Proteinebene sich ebenfalls nachweisbar. welche in den Immunfluoreszenzfärbungen widerspiegelt. Das im Rahmen der experimentellen PH durchgeführte chronische Hypoxie-Modell zeigte hingegen eine Steigerung der DAPK1-Expression auf mRNA-Ebene, jedoch eine Verminderung der DAPK1auf Proteinebene auf Expression bezogen PASMCs. Diese Auffälligkeit deutet zum einen auf einen Mechanismus der neuen Expressionsverminderung von DAPK1 hin. Ob es sich bei diesem um eine Form der Degradation der Proteinkinase handelt, bleibt weiter zu analysieren. Zum anderen wirft es die Frage nach der Ätiologie der gesteigerten Expression auf mRNA-Ebene auf. Diese könnte mithilfe von HIF-1 α zu beantworten sein, erfordert jedoch weitere Forschung.

Des Weiteren konnte eine Korrelation zwischen einer Wachstumsfaktorstimulation mit dem Wachstumsfaktoren PDGF-ß, TNF-α, II-6 sowie mit GM und einer Expressionsminderung und Phosphorylierung von DAPK1 ermittelt werden.

Im Hinblick auf die Wirkungen von DAPK1 auf das Proliferationsverhalten von hPASMCs konnte trotz dafürsprechender Indizien kein Zusammenhang zwischen einer Inhibition von DAPK1 und einer Veränderung der Proliferation festgestellt werden. Weitere Untersuchungen des Proliferationsverhaltens bezüglich DAPK1 sind durchzuführen. ein detaillierteres und um abschließendes Bild von dessen Zusammenhang zu erhalten

Schlussendlich deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass DAPK1 eine wichtige Rolle bezüglich der pathophysiologischen Prozesse, vor allem hinsichtlich der Apoptoseresistenz, und der Entwicklung von PH spielen könnte. Die einzelnen zugrunde liegenden Mechanismen und Signalkaskaden sind in weiteren Untersuchungen zu eruieren.

4.5 Ausblick

Die Deaktivierung bzw. der Expressionsverlust von DAPK1 scheint eine Reihe von nachgeschalteten Signalwegen zu steuern, die mit der Vermeidung der Apoptose von hPASMCs in Zusammenhang stehen könnten. Die aus dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der DAPK1-Signalweg im Rahmen der PH defekt ist, was das Fortschreiten der Krankheit implizieren kann.

In zukünftigen Untersuchungen sollten die zugrunde liegenden Wirkungsmechanismen einer DAPK1-Expressionsverminderung in PH weiter analysiert werden. So sollte im Detail untersucht werden, welche Downstream-Signalkaskaden und Mechanismen für die Expressionssteigerung auf mRNA-Ebene und den Expressionsverlust auf Proteinebene in PASMC des chronischen Hypoxie-Modells von Relevanz sind. Hierbei sollte genauer auf die Interaktion von DAPK1 und HIF-1α eingegangen werden und auch Untersuchungen zum Nachweis einer Degradation DAPK1s durchgeführt werden. Weiterhin sollte in diesem Rahmen das DAPK1 mRNA Expressionsmuster in den anderen Zellreihen der Lunge beleuchtet werden.

Zudem zeigt die Expressionsverminderung von DAPK1 nach 24-stündigen Wachstumsfaktor-Stimulation von hPASMCs vielversprechende Ergebnisse. Die DAPK1-Expression sollte nach zeitlich unterschiedlich erfolgter Wachstums-Stimulation detaillierter analysiert werden. Man könnte beispielsweise eruieren, inwiefern eine längere Stimulation, beispielsweise 48 oder 72 Stunden, eine weitere Reduktion der DAPK1-Folge hat. Bezüglich Expression zur der DAPK1 Auswirkungen auf das von Proliferationsverhalten könnte des Weiteren untersucht werden, ob eine DAPK1-Inhibition Veränderungen einer durch Wachstumsfaktoren induzierten Proliferation mit sich bringt. Auch sollte nachgewiesen werden, ob DAPK1 zu einer verminderten Apoptoseresistenz in hPASMC führt, z.B. indem man die Korrelation einer Inhibierung von DAPK1 und einer Steigerung der Apoptose-Resistenz untersucht. Schlussendlich könnte das Expressionsmuster von DAPK1 auch bei weiteren, ebenfalls an der Pathogenese der PH beteiligten Zelltypen adressiert werden.

4.6. Klinische Perspektive

Diese ersten vielversprechenden Ergebnisse deuten darauf hin. dass DAPK1 ein entscheidender Regulator der Schicksalsentscheidungen von glatten Muskelzellen ist und dass eine Modulation der Expression oder Aktivierung von DAPK1 zu einer Verminderung der Progression des vaskulären Remodelings in PH beitragen könnte. Demnach stellt DAPK1 ein attraktives und neues Therapieziel in der Behandlung der PH dar.

Die genauen Analysen des strukturellen Aufbaus und insbesondere der katalytischen Domäne von DAPK1 führten zu der Möglichkeit der Entwicklung

Moleküle. die spezifisch für DAPK1 kleiner ausgerichtet sind [38][42][128][129]. Betrachtet man die Reagenzien, die zu einer Aktivierung von DAPK1 führen, werden zwei verschiedene Strategien verwendet. Bei der ersten Strategie handelt es sich um eine Hochregulierung der DAPK1-Expression, welche durch Interaktion mit der Translation, Transkription oder Degradation der Kinase hervorgerufen wird. Zweitere wird durch eine Dephosphorylierung von Ser308 der Calmodulinautoregulatorischen Domäne von DAPK1 bedingt, welche eine Aktivierung der Kinase zur Folge hat. Insgesamt wird von 14 Reagenzien berichtet, die eine Aktivierung von DAPK1 bewirken. Dabei steigern 9 dieser Reagenzien die Proteinexpression von DAPK1, indem sie entweder die mRNA-Expression erhöhen oder den Abbau der Kinase hemmen. Zwei Reagenzien können die DAPK1-Aktivität über eine Desphosphorylierung an Ser308 aktivieren, und 3 sind zu beiden Mechanismen in der Lage. Bei beispielsweiser Betrachtung des DAPK1-Aktivators 5-aza-2'-deoxycytidine konnte gezeigt werden, dass es bei der Behandlung bestimmter Krebsformen mit dem besagten

Aktivator zu einer Demethylierung und Re-Expression von DAPK1 kam, jedoch nicht in allen Fällen [42][130]. Bisher erhöht jedoch keines dieser Reagenzien spezifisch die DAPK1-Expression, was es schwierig macht, die Rolle von DAPK1 bei den zellulären Wirkungen dieser Reagenzien zu interpretieren.

[38]. Trotz der großen Anzahl von Reagenzien, die DAPK1 aktivieren können, gibt es daher noch keinen potenziellen klinischen Kandidaten, der DAPK1 spezifisch aktiviert. Es sind somit weitere Experimente erforderlich, um den Zusammenhang zwischen den klinischen Ergebnissen solcher Reagenzien und DAPK1 zu verstehen.

offensichtliches Fin weiteres Problem bei Adressierung von DAPK1 als ein therapeutisches Ziel stellen die Nebenwirkungen dar. Dies gilt für viele multifunktionelle Proteine, da es schwierig ist, das Nebenwirkungsprofil einer therapeutischen Interaktion mit diesen Proteinen vorauszusagen. So ist bei DAPK1 beispielweise zu beachten, dass die Entwicklung und der Einsatz spezifischer Reagenzien aufgrund der Ähnlichkeiten vor allem Bereich der katalytischen Domäne im

möglicherweise multiple Mitglieder der DAPK-Familie tangieren könnte. Weitere Untersuchungen mit Hilfe von Tiermodellen, die eine spezifische Induktion von DAPK1 in bestimmten Geweben ermöglichen kann, könnten nützlich sein, nicht nur zur Untersuchung der Wirksamkeit und Toxizität, sondern auch für die endgültige Validierung von DAPK1 als ein therapeutisches Ziel in der PH.

Zusammenfassend stellt DAPK1 ein interessantes therapeutisches Ziel in PH dar. Um eine bessere Strategie zur zielgerichteten Applikation von DAPK1 in der klinischen Anwendung zu erreichen, müssen vertiefte Kenntnisse der DAPK1-Funktionen gewonnen werden. Die Entwicklung spezifischer Reagenzien zur Aktivierung DAPK1 befinden sich noch in Vorstufen, jedoch zeichnen sich bereits heute vielversprechende Kandidaten ab.

Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie stellt eine progressive Erkrankung multifaktorieller Genese dar, welche eine schlechte Prognose besitzt und durch das Trias pulmonalen einer Vasokonstriktion. Thrombosen und eines vaskulären Remodelings Gefäßwandschichten gekennzeichnet ist. aller Aufgrund zahlreicher Gemeinsamkeiten, unter denen eine anhaltende Proliferation und die Umgehung der Apoptose in PASMCs eine zentrale Rolle spielen, hat sich die PH als krebsähnliche Erkrankung etabliert. Die Proteinkinase DAPK1 ist an einer Vielzahl pro-apoptotischer Signalwege beteiligt und fungiert als ein Tumorsupressor, indem unter anderem durch einen Kaspasees abhängigen Mechanismen zur Apoptose führt. Beitrag DAPK1s potentieller zu der Pathophysiologie der PH und die sich daraus ergebenden potentiellen Behandlungsmöglichkeiten wurde bisher nicht genauer untersucht und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Hierfür wurde das Expressionsmuster von DAPK1 sowohl in experimenteller als auch in klinischer PH untersucht, welches mittels West-Blot-Analysen, aRT-PCR-Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen untersucht wurde. Zur Komplementierung der Daten wurde in diesem Fffekt Rahmen der von Wachstumsfaktor-Stimulationen auf die DAPK1-Phosphorylierung DAPK1-Expression in sowie die hPASMCs analysiert. Anschließend wurde der Einfluss von DAPK1 auf das Proliferationsverhalten von PASMCs untersucht. Hierbei das kam Proliferationsassay mit Bromdesoxyuridin (BrdU) zum Finsatz

Versuchsaufbaus Rahmen des Im der experimentellen PH zeigte sich sowohl im MCT-Rattenmodel als auch im chronischen Hypoxie-Model eine teils signifikante Reduktion der Expressions von DAPK1. Diese Daten wurden durch Untersuchungen von klinischer PH vervollständigt, die ebenfalls eine Verminderung der DAPK1-Expression in IPAH-Patienten zeigten und den Effekt einer Wachstumsfaktor-Stimulation auf das Expressionsmuster von DAPK1 darlegte. Weiterhin wurde der Einfluss von DAPK1 auf das Proliferationsverhalten von hPASMCs analysiert. Hierbei konnte kein signifikanter Einfluss auf das Proliferationsverhalten von hPASMCs festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig ein Zusammenhang zwischen DAPK1 und PH etabliert werden. Dies deutet darauf hin, dass DAPK1 eine wichtige Rolle bezüglich der pathophysiologischen Prozesse in PH spielen könnte und demnach ein attraktives und neues therapeutisches Ziel in PH darstellt.

Summary

Pulmonary hypertension is a progressive disease of multifactorial genesis, which has a poor prognosis and is characterized by the triad of pulmonary thrombosis vascular vasoconstriction. and remodeling of all vascular wall layers. Due to many similarities, including sustained proliferation and evasion of apoptosis in PASMCs, PH has established itself as a cancer-like disease. The protein kinase DAPK1 is involved in a variety of proapoptotic signaling pathways and acts as a tumor suppressor, leading to apoptosis, including through caspase-dependent mechanism. DAPK1's а potential contribution to the pathophysiology of PH and the resulting potential treatment options has not been further investigated and is the subject of this work.

For this purpose, the expression pattern of DAPK1 was investigated in both experimental and clinical PH, performed by Western blot analysis, qRT-PCR analysis and immunofluorescence staining. To complement the data, the effect of growth factor stimulation on DAPK1 phosphorylation and DAPK1

expression in hPASMCs was analyzed. Subsequently, the influence of DAPK1 on the proliferative behavior of PASMCs was investigated. Here, the proliferation assay with bromodeoxyuridine (BrdU) was used.

The setup of experimental PH showed a partly significant reduction in the expression pattern of DAPK1 both in the MCT rat model and in the chronic hypoxia model. These data were completed with studies of clinical PH that also demonstrated a reduction in DAPK1 expression in IPAH patients and demonstrated the effect of growth factor stimulation on the expression pattern of DAPK1. Furthermore, the influence of DAPK1 on the proliferation behavior of hPASMCs was analyzed. No significant influence on the proliferation behavior of hPASMCs was observed.

In summary, in the context of this work, a connection between DAPK1 and PH was established for the first time. This suggests that DAPK1 may play an important role in the pathophysiological processes in PH and thus represents an attractive and novel therapeutic target in PH.

Abkürzungsverzeichnis

±	Plus/Minus
<	kleiner
>	größer
≤	kleiner oder gleich
2	größer oder gleich
μl	Mikroliter
APS	Ammoniumpersulfat
BM	Basalmedium (engl. Basal Medium)
BMPR2	Knochenmorphogenetisches Protein Rezeptor Typ 2 (engl. <i>bone</i> <i>morphogenetic protein receptor type</i> 2)
BrdU	Bromdesoxuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
Cm	Zentimeter
CO2	Kohlenstoffdioxid
CTEPH	Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie
CYP 3A4	Cytochrom P ₄₅₀ 3A4

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DAPK1	Death-associated protein kinase 1
d.h.	Das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Dulbeccos phosphate buffered saline</i>)
DRAK 1 & 2	DAP-kinase-related apoptosis- inducing protein kinase 1 & 2
DRP-1	DAPK-related protein-1
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retiukulum
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal Calf Serum</i>)
GM	Wachstumsmedium (engl. <i>Growth Medium</i>)
h	Stunde
H2O	Wasser
HIF-α	Hypoxia-inducible factor 1α
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
hPASMC	humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (engl. <i>human pulmonary</i> <i>artery smooth muscle cells</i>)
IPAH	Idiopathische pulmonale Hypertonie

II-6	Interleukin-6
kDa	Kilodalton
MCT	Monocrotalin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Min	Minute(n)
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
ml	Milliliter
mPAP	mittlerer pulmonal arterieller Drucks
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
Ng	Nanogramm
NO	Stickstoffmonoxid
O2	Sauerstoff
Ρ.	Passage
PAH	Pulmonal Arterielle Hypertonie
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. <i>Pulmonary artery smooth muscle cells</i>)
PAWP	pulmonal-kapillärer Verschlussdruck
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDE	Phosphodiesterase
PGDF	Plättchen-abgeleitetem Wachstumsfaktor (engl. Platelet-derived growth factor)
PH	Pulmonale Hypertonie

PMA	phorbol 12-myristate 13- acetate
PP2A	Protein-Phosphatase 2
PVR	pulmonal vaskulären Widerstand
qRT-PCR	quantitative Echtzeit- Polymerasekettenreaktion
RIPA	Radioimmunpräzipitations- Assay
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
RSK	Ribosomal Protein S6 Kinase
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS- PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
SMA	Smooth Muscle Aktin
SMC	Smooth Muscle cells
TBS	TRIS buffered saline
TBS/T	TRIS buffered saline in TWEEN 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrose-Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat

UNC5H	Netrin-1-Rezeptor
VEGF	Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle
z.B.	Zum Beispiel
ZIPK	ZIP-Kinase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Der "Cancer-like-Phänotyp" in PAH
Abbildung 2	Die DAPK-Familie
Abbildung 3	Schematische Darstellung der DAPK1- Proteinstruktur sowie des DAPK1- Interactoms stromaufwärts
Abbildung 4	Das DAPK1-Interactom stromabwärts
Abbildung 5	Protokoll des BrdU-Proliferationsassays
Abbildung 6	DAPK1 mRNA- und Proteinexpression im Monocrotalin-Rattenmodel
Abbildung 7	Immunofluoreszenzfärbung mit DAPK1 im Monocrotalin-Rattenmodel

Abbildung 8	DAPK1 mRNA- und Proteinexpression in Lungenhomogenaten und mPASMCs im Normoxie/Hypoxie-Modell
Abbildung 9	DAPK1 mRNA- und Proteinexpression in hPASMC im Normoxie/Hypoxie-Modell
Abbildung 10	Immunofluoreszenzfärbung mit DAPK1 im Normoxie/Hypoxie-Mausmodell
Abbildung 11	DAPK1 mRNA-Expression in humanen Lungenhomogenaten, mikrodissezierten Gefäßen und hPASMCs sowie DAPK1 Proteinexpression in hPASMCs
Abbildung 12	Immunofluoreszenzfärbung von Lungenschnitten mit DAPK1
Abbildung 13	DAPK1- Proteinexpression in hPASMCs nach Growth Factor-Stimulation
Abbildung 14	pDAPK- und DAPK1-Proteinexpression in hPASMCs nach Growth Factor- Timepoint-Stimulation
Abbildung 15	BrdU-Proliferationsassay von hPASMCs nach Transfektion mit siRNA DAPK1 und siRNA NC

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klassifikation der Pulmonalen Hypertonie nach Nizza-Konferenz 2018
Tabelle 2	Labortechnische Apparaturen & Instrumente

Tabelle 3	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 4	Chemikalien, Reagenzien & Lösungen
Tabelle 5	Zellkulturmedien und weitere Substanzen
Tabelle 6	Primärantikörper für Western Blot Analysen
Tabelle 7	Sekundärantikörper für Western Blot Analysen
Tabelle 8	Antikörper für Immunofärbungen
Tabelle 9	Primersequenzen für qRT-PCR
Tabelle 10	Kits
Tabelle 11	Protokoll des BrdU-Proliferationsassays
Tabelle 12	Erstellung der Standards für die Protein- Estimation
Tabelle 13	Herstellung des 8 %igen Trenngels
Tabelle 14	Herstellung des 6 %igen Sammelgels
Tabelle 15	Herstellung des Running-Buffers
Tabelle 16	Herstellung des Blotting-Buffers
Tabelle 17	Herstellung der 5 % Milchlösung und des 5 % BSA
Tabelle 18	Herstellung des 20x TBS
Tabelle 19	Herstellung des 1x TBS/T

Tabelle 20	Master-Mix 1
Tabelle 21	Master-Mix 2
Tabelle 22	Zusammensetzung des PCR- Reaktionsgemisches
Tabelle 23	qRT-PCR-Programm
Tabelle 24	Deparaffinierung
Tabelle 25	Antigen Retrieval

Literaturverzeichnis

1. Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, Langleben D, Manes A, Satoh T, Torres F, Wilkins MR, Badesch DB. Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. Journal of the American College of Cardiology. 2013 Dec;62(25):D42–50.

2. Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. European Respiratory Journal. 2009 Oct 1;34(4):888–94.

3. Hoeper MM, Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonale Hypertonie. Dtsch Arztebl Int. 2017;(114):73–84.

4. Herold G. und M. Innere Medizin 2015. 407–410 p.

5. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS)Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). European Heart Journal. 2016 Jan 1;37(1):67–119.

6. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Noordegraaf AV, Beghetti M, Ghofrani A, Sanchez MAG, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M. 2015 ESC/ERS Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension. Revista Española de Cardiología (English Edition). 2016 Feb;69(2):177.

7. Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, Jing Z-C, Gibbs JSR. A global view of pulmonary hypertension. Lancet Respir Med. 2016;4(4):306–22.

8. Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. International Journal of Cardiology. 2017 Mar 2;203:612–3.

9. Longo DL, editor. Harrison's principles of internal medicine. 18th ed. New York: McGraw-Hill; 2012. 2 p.

10. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. Journal of the American College of Cardiology. 2013 Dec;62(25):D34-41.

11. Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Annual review of pathology. 2007;2:369–99.

12. Montani D, Günther S, Dorfmüller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, Jaïs X, Savale L, Artaud-Macari E, Price LC, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O. Pulmonary arterial hypertension. 2013;28.

13. Simonneau G, Montani D, Celermajer DS, Denton CP, Gatzoulis MA, Krowka M, Williams PG, Souza R. Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. European Respiratory Journal. 2019 Jan;53(1):1801913.

14. Chan SY, Loscalzo J. Pathogenic mechanisms of pulmonary arterial hypertension. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2008 Jan;44(1):14–30.

15. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. Journal of the American College of Cardiology. 2004 Jun;43(12):S13–24.

16.Guignabert C, Dorfmuller P. Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. 2013 Sep 13;34(05):551–9.

17. Cool CD, Stewart JS, Werahera P, Miller GJ, Williams RL, Voelkel NF, Tuder RM. Three-Dimensional Reconstruction of Pulmonary Arteries in Plexiform Pulmonary Hypertension Using Cell-Specific Markers. The American Journal of Pathology. 1999 Aug;155(2):411–9.

18. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. N Engl J Med. 1992 Jul 9;327(2):70–5.

19.Galié N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. Cardiovasc Res. 2004 Feb 1;61(2):227–37.

20. Delom F. Pulmonary Arterial Hypertension and Cancer: An Update on Their Similarities. Annual Research & Review in Biology. 2014 Jan 10;4(1):20–37.

21. Rai PR, Cool CD, King JAC, Stevens T, Burns N, Winn RA, Kasper M, Voelkel NF. The Cancer Paradigm of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2008 Sep 15;178(6):558–64.

22. Tuder RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. Clin Chest Med. 2001 Sep;22(3):405–18. 23. Adnot S, Eddahibi S. Lessons from oncology to understand and treat pulmonary hypertension. Int J Clin Pract Suppl. 2007 Dec;(158):19–25.

24. Sakao S, Taraseviciene-Stewart L, Cool CD, Tada Y, Kasahara Y, Kurosu K, Tanabe N, Takiguchi Y, Tatsumi K, Kuriyama T, Voelkel NF. VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34 ⁺ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells. The FASEB Journal. 2007 Nov;21(13):3640–52.

25. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Dartevelle P, Hamon M, Adnot S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. Journal of Clinical Investigation. 2001 Oct 15;108(8):1141–50.

26. Marcos E, Fadel E, Sanchez O, Humbert M, Dartevelle P, Simonneau G, Hamon M, Adnot S, Eddahibi S. Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia in Various Forms of Human Pulmonary Hypertension. Circulation Research. 2004 May 14;94(9):1263–70.

27. Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJB, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L, Granton J, Stewart DJ. Bone Morphogenetic Protein Receptor-2 Signaling Promotes Pulmonary Arterial Endothelial Cell Survival: Implications for Loss-of-Function Mutations in the Pathogenesis of Pulmonary Hypertension. Circulation Research. 2006 Feb 3;98(2):209-17.

28. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX-J. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2003 Sep;285(3):L740–54.

29. McMurtry MS. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. Journal of Clinical Investigation. 2005 Jun 1;115(6):1479–91.

30. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011 Mar;144(5):646– 74.

31. Bonnet S. Michelakis ED. Porter CJ. Andrade-Navarro MA. Thébaud B. Bonnet S. Haromy A. Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An Abnormal Mitochondrial-Hypoxia Inducible Factor-1a–Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Pulmonary Sensina and Triggers Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats: Similarities to Human Pulmonary Arterial Hypertension. Circulation. 2006 Jun 6;113(22):2630-41.

32. Sakao S, Tatsumi K. Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: Multiple cancerlike pathways and possible treatment modalities. International Journal of Cardiology. 2011 Feb;147(1):4–12. 33. Bialik S, Kimchi A. The DAP-kinase interactome. Apoptosis. 2014 Feb;19(2):316–28.

34. Michie AM, McCaig AM, Nakagawa R, Vukovic M. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: regulation in cancer: Regulation of DAPK in cancer. FEBS Journal. 2010 Jan;277(1):74–80.

35. Tu W, Xu X, Peng L, Zhong X, Zhang W, Soundarapandian MM, Belal C, Wang M, Jia N, Zhang W, Lew F, Chan SL, Chen Y, Lu Y. DAPK1 Interaction with NMDA Receptor NR2B Subunits Mediates Brain Damage in Stroke. Cell. 2010 Jan;140(2):222–34.

36. Nakav S, Cohen S, Feigelson SW, Bialik S, Shoseyov D, Kimchi A, Alon R. Tumor Suppressor Death-Associated Protein Kinase Attenuates Inflammatory Responses in the Lung. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2012 Mar;46(3):313–22.

37. Deiss LP. Identification of a novel serine/ threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the interferon-induced cell death. :17.

38. Huang Y, Chen L, Guo L, Hupp TR, Lin Y. Evaluating DAPK as a therapeutic target. Apoptosis. 2014 Feb;19(2):371–86.

39. Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, Kopolovic J, Vadai E, Eisenbach L, Kimchi A. DAP kinase links

the control of apoptosis to metastasis. Nature. 1997 Nov;390(6656):180–4.

40. Raveh T, Droguett G, Horwitz MS, DePinho RA, Kimchi A. DAP kinase activates a p19ARF/p53mediated apoptotic checkpoint to suppress oncogenic transformation. Nature Cell Biology. 2001 Jan;3(1):1–7.

41. Bialik S, Kimchi A. The Death-Associated Protein Kinases: Structure, Function, and Beyond. Annual Review of Biochemistry. 2006 Jun;75(1):189–210.

42. Bialik S, Kimchi A. DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. Seminars in Cancer Biology. 2004 Aug;14(4):283–94.

43. Katzenellenbogen RA, Baylin SB, Herman JG. Hypermethylation of the DAP-Kinase CpG Island Is a Common Alteration in B-Cell Malignancies. :8.

44. Inbal B, Shani G, Cohen O, Kissil JL, Kimchi A. Death-Associated Protein Kinase-Related Protein 1, a Novel Serine/Threonine Kinase Involved in Apoptosis. Molecular and Cellular Biology. 2000 Feb 1;20(3):1044–54.

45. Kawai T, Nomura F, Hoshino K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Akira S. Death-associated protein kinase 2 is a new calcium/calmodulindependent protein kinase that signals apoptosis through its catalytic activity. Oncogene. 1999 Jun;18(23):3471–80. 46. Kawai T, Matsumoto M, Takeda K, Sanjo H, Akira S. ZIP Kinase, a Novel Serine/Threonine Kinase Which Mediates Apoptosis. Molecular and Cellular Biology. 1998 Mar 1;18(3):1642–51.

47. Kögel D, Plöttner O, Landsberg G, Christian S, Scheidtmann KH. Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. Oncogene. 1998 Nov;17(20):2645–54.

48. Sanjo H, Kawai T, Akira S. DRAKs, Novel Serine/Threonine Kinases Related to Deathassociated Protein Kinase That Trigger Apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 1998 Oct 30;273(44):29066–71.

49. Tereshko V, Teplova M, Brunzelle J, Watterson DM, Egli M. Crystal structures of the catalytic domain of human protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression. nature structural biology. 2001;8(10):9.

50. Shani G. Autophosphorylation restrains the apoptotic activity of DRP-1 kinase by controlling dimerization and calmodulin binding. The EMBO Journal. 2001 Mar 1;20(5):1099–113.

51. Shohat G, Spivak-Kroizman T, Cohen O, Bialik S, Shani G, Berrisi H, Eisenstein M, Kimchi A. The Pro-apoptotic Function of Death-associated Protein Kinase Is Controlled by a Unique Inhibitory Autophosphorylation-based Mechanism. Journal of Biological Chemistry. 2001 Dec 14;276(50):47460–

7.

52. Jin Y, Blue EK, Gallagher PJ. Control of Deathassociated Protein Kinase (DAPK) Activity by Phosphorylation and Proteasomal Degradation. Journal of Biological Chemistry. 2006 Dec 22;281(51):39033–40.

53. Gozuacik D, Bialik S, Raveh T, Mitou G, Shohat G, Sabanay H, Mizushima N, Yoshimori T, Kimchi A. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation and autophagic cell death. Cell Death & Differentiation. 2008 Dec;15(12):1875–86.

54. Shamloo M, Soriano L, Wieloch T, Nikolich K, Urfer R, Oksenberg D. Death-associated Protein Kinase Is Activated by Dephosphorylation in Response to Cerebral Ischemia. Journal of Biological Chemistry. 2005 Dec 23;280(51):42290–9.

55. Bialik S, Bresnick AR, Kimchi A. DAP-kinasemediated morphological changes are localization dependent and involve myosin-II phosphorylation. Cell Death and Differentiation [Internet]. 2004 Feb 27 [cited 2018 Jul 21]; Available from: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.cdd.44 01386

56. Cohen O. DAP-kinase is a Ca2+/calmodulindependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. The EMBO Journal. 1997 Mar 1;16(5):998–1008. 57. Feinstein E, Kimchi A, Wallach D, Boldin M, Varfolomeev E. The death domain: a module shared by proteins with diverse cellular functions. Trends Biochem Sci. 1995 Sep;20(9):342–4.

58. Cohen O, Inbal B, Kissil JL, Raveh T, Berissi H, Spivak-Kroizaman T, Feinstein E, Kimchi A. DAPkinase Participates in TNF-__ and Fas-induced Apoptosis and Its Function Requires the Death Domain. The Journal of Cell Biology. 1999;146:8.

59. Raveh T, Berissi H, Eisenstein M, Spivak T, Kimchi A. A functional genetic screen identifies regions at the C-terminal tail and death-domain of death-associated protein kinase that are critical for its proapoptotic activity. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000 Feb 15;97(4):1572–7.

60. Widau RC, Jin Y, Dixon SA, Wadzinski BE, Gallagher PJ. Protein Phosphatase 2A (PP2A) Holoenzymes Regulate Death-associated Protein Kinase (DAPK) in Ceramide-induced Anoikis. Journal of Biological Chemistry. 2010 Apr 30;285(18):13827–38.

61. Llambi F, Lourenço FC, Gozuacik D, Guix C, Pays L, Del Rio G, Kimchi A, Mehlen P. The dependence receptor UNC5H2 mediates apoptosis through DAP-kinase. The EMBO Journal. 2005 Mar 23;24(6):1192–201.

62. Guenebeaud C, Goldschneider D, Castets M, Guix C, Chazot G, Delloye-Bourgeois C, Eisenberg-Lerner A, Shohat G, Zhang M, Laudet V, Kimchi A, Bernet A, Mehlen P. The Dependence Receptor UNC5H2/B Triggers Apoptosis via PP2A-Mediated Dephosphorylation of DAP Kinase. Molecular Cell. 2010 Dec;40(6):863–76.

63. Carlessi R, Levin-Salomon V, Ciprut S, Bialik S, Berissi H, Albeck S, Peleg Y, Kimchi A. GTP binding to the ROC domain of DAP-kinase regulates its function through intramolecular signalling. EMBO reports. 2011 Jul 8;12(9):917–23.

64. Chen C-H, Wang W-J, Kuo J-C, Tsai H-C, Lin J-R, Chang Z-F, Chen R-H. Bidirectional signals transduced by DAPK?ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. The EMBO Journal. 2005 Jan 26;24(2):294–304.

65. Anjum R, Roux PP, Ballif BA, Gygi SP, Blenis J. The Tumor Suppressor DAP Kinase Is a Target of RSK-Mediated Survival Signaling. Current Biology. 2005 Oct;15(19):1762–7.

66. Houle F, Poirier A, Dumaresq J, Huot J. DAP kinase mediates the phosphorylation of tropomyosin-1 downstream of the ERK pathway, which regulates the formation of stress fibers in response to oxidative stress. Journal of Cell Science. 2007 Oct 15;120(20):3666–77.

67. Zalckvar E, Berissi H, Mizrachy L, Idelchuk Y, Koren I, Eisenstein M, Sabanay H, Pinkas-Kramarski R, Kimchi A. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. EMBO reports. 2009 Mar;10(3):285–92.

68. Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. PKD is a kinase of Vps34 that mediates ROS-induced autophagy downstream of DAPk. Cell Death & Differentiation. 2012 May;19(5):788–97.

69. Lee TH, Chen C-H, Suizu F, Huang P, Schiene-Fischer C, Daum S, Zhang YJ, Goate A, Chen R-H, Zhou XZ, Lu KP. Death-Associated Protein Kinase 1 Phosphorylates Pin1 and Inhibits Its Prolyl Isomerase Activity and Cellular Function. Molecular Cell. 2011 Apr;42(2):147–59.

70. Martoriati A, Doumont G, Alcalay M, Bellefroid E, Pelicci PG, Marine J-C. dapk1, encoding an activator of a p19ARF-p53-mediated apoptotic checkpoint, is a transcription target of p53. Oncogene. 2005 Feb;24(8):1461–6.

71. Craig AL, Chrystal JA, Fraser JA, Sphyris N, Lin Y, Harrison BJ, Scott MT, Dornreiter I, Hupp TR. The MDM2 Ubiquitination Signal in the DNA-Binding Domain of p53 Forms a Docking Site for Calcium Calmodulin Kinase Superfamily Members. Molecular and Cellular Biology. 2007 May 1;27(9):3542–55.

72. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

73. Pullamsetti SS, Schermuly R, Ghofrani A, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Novel and Emerging Therapies for Pulmonary Hypertension.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2014 Feb 15;189(4):394–400.

74. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. Nature Reviews Cardiology. 2011 Jun 21;8:443.

75. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2009 Dec;297(6):L1013–32.

76. Macchia A, Marchioli R, Marfisi R, Scarano M, Levantesi G, Tavazzi L, Tognoni G. A meta-analysis of trials of pulmonary hypertension: A clinical condition looking for drugs and research methodology. American Heart Journal. 2007 Jun;153(6):1037–47.

77. Galie N, Manes A, Negro L, Palazzini M, Bacchi-Reggiani ML, Branzi A. A meta-analysis of randomized controlled trials in pulmonary arterial hypertension. European Heart Journal. 2008 Sep 27;30(4):394–403.

78. Lajoie AC, Lauzière G, Lega J-C, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. The Lancet Respiratory Medicine. 2016 Apr;4(4):291–305.
79. Boucherat O, Vitry G, Trinh I, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. Pulmonary Circulation. 2017 Jun;7(2):285–99.

80. Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F, Sliwa K. A Comprehensive Review: The Evolution of Animal Models in Pulmonary Hypertension Research; Are We there Yet? Pulmonary Circulation. 2013 Dec;3(4):739–56.

81. Pak O, Janssen W, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT, Weissmann N. Animal models of pulmonary hypertension: role in translational research. Drug Discovery Today: Disease Models. 2010 Sep;7(3–4):89–97.

82. Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, Bogaard HJ. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2012 Feb 15;302(4):L363–9.

83. Shah M, Patel K, Sehgal PB. Monocrotaline pyrrole-induced endothelial cell megalocytosis involves a Golgi blockade mechanism. American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2005 Apr;288(4):C850–62.

84. Kolettis T, Vlahos AP, Louka M. Characterisation of a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension. :5.

85. Mitani Y, Mutlu A, Russell JC, Brindley DN,

DeAlmeida J, Rabinovitch M. Dexfenfluramine protects against pulmonary hypertension in rats. Journal of Applied Physiology. 2002 Nov;93(5):1770–8.

86. Kato T, Kitamura H, Kanisawa M. Comparative Effects of Isosorbide Dinitrate, Prednisolone, Indomethacin, and Elastase on the Development of Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. :13.

87. Bauer NR, Moore TM, McMurtry IF. Rodent models of PAH: are we there yet? American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2007 Sep;293(3):L580–2.

88. Drexler ES, Bischoff JE, Slifka AJ, McCowan CN, Quinn TP, Shandas, R;, Ivy DD, Stenmark KR. Stiffening of the Extrapulmonary Arteries From Rats in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. 2008 Jul;113(4):239.

89. Voelkel NF, Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? Journal of Clinical Investigation. 2000 Sep 15;106(6):733–8.

90. Campian ME, Hardziyenka M, Michel MC, Tan HL. How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 2006 Sep;373(6):391–400.

91. Casserly B, Mazer JM, Vang A, Harrington EO, Klinger JR, Rounds S, Choudhary G. C-type

natriuretic peptide does not attenuate the development of pulmonary hypertension caused by hypoxia and VEGF receptor blockade. Life Sciences. 2011 Sep;89(13–14):460–6.

92. Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A-M, Dewachter L, Fadel E, Dartevelle P, Humbert M, Simonneau G, Hanoun N, Saurini F, Hamon M, Adnot S. Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension: Critical Role for Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia. Circulation. 2006 Apr 18;113(15):1857–64.

93. Huang J, Liu Y, Sun P, Lv X, Bo K, Fan X. Novel Strategy for Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: Enhancement of Apoptosis. Lung. 2010 Jun;188(3):179–89.

94. Guignabert C, Tu L, Le Hiress M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. European Respiratory Review. 2013 Dec 1;22(130):543–51.

95. Yamamoto M, Hioki T, Ishii T, Nakajima-Iijima S, Uchino S. DAP kinase activity is critical for C2ceramide-induced apoptosis in PC12 cells: DAP kinase as ceramide-induced apoptotic component. European Journal of Biochemistry. 2002 Jan;269(1):139–47.

96. Inbal B, Bialik S, Sabanay I, Shani G, Kimchi A. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles

during programmed cell death. The Journal of Cell Biology. 2002 Apr 29;157(3):455–68.

97. Shani G, Marash L, Gozuacik D, Bialik S, Teitelbaum L, Shohat G, Kimchi A. Death-Associated Protein Kinase Phosphorylates ZIP Kinase, Forming a Unique Kinase Hierarchy To Activate Its Cell Death Functions. Molecular and Cellular Biology. 2004 Oct 1;24(19):8611–26.

98. Dirkx E, Schwenk RW, Coumans WA, Hoebers N, Angin Y, Viollet B, Bonen A, van Eys GJJM, Glatz JFC, Luiken JJFP. Protein Kinase D1 Is Essential for Contraction-induced Glucose Uptake but Is Not Involved in Fatty Acid Uptake into Cardiomyocytes. Journal of Biological Chemistry. 2012 Feb 17;287(8):5871–81.

99. Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. DAP kinase regulates JNK signaling by binding and activating protein kinase D under oxidative stress. Cell Death & Differentiation. 2007 Nov;14(11):1908–15.

100.Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. PKD at the crossroads of necrosis and autophagy. Autophagy. 2012 Mar 19;8(3):433–4.

101. Chou T-F, Chuang Y-T, Hsieh W-C, Chang P-Y, Liu H-Y, Mo S-T, Hsu T-S, Miaw S-C, Chen R-H, Kimchi A, Lai M-Z. Tumour suppressor death-associated protein kinase targets cytoplasmic HIF-1 α for Th17 suppression. Nature Communications. 2016 Jun 17;7:11904.

102. Veith C, Schermuly RT, Brandes RP,

Weissmann N. Molecular mechanisms of hypoxiainducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension: Hypoxia-inducible factor in pulmonary hypertension. The Journal of Physiology. 2016 Mar 1;594(5):1167–77.

103. Smith KA, Yuan JX-J. Hypoxia-Inducible Factor-1 α in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells and Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2014 Feb;189(3):245–6.

104. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JSK, Wiener CM, Sylvester JT, Semenza GL. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1α . Journal of Clinical Investigation. 1999 Mar 1;103(5):691–6.

105. Benderska N, Schneider-Stock R. Transcription control of DAPK. Apoptosis. 2014 Feb;19(2):298–305.

106. Simpson DJ, Clayton RN, Farrell WE. Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. Oncogene. 2002 Feb;21(8):1217–24.

107. Kawaguchi K-I, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Takahira T, Tamiya S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Death-associated protein kinase (DAP kinase) alteration in soft tissue leiomyosarcoma: Promoter methylation or homozygous deletion is associated with a loss of DAP kinase expression. Human Pathology. 2004 Oct;35(10):1266–71.

108. Jin Y, Blue EK, Dixon S, Shao Z, Gallagher PJ. A Death-associated Protein Kinase (DAPK)interacting Protein, DIP-1, Is an E3 Ubiquitin Ligase That Promotes Tumor Necrosis Factor-induced Apoptosis and Regulates the Cellular Levels of DAPK. Journal of Biological Chemistry. 2002 Dec 6;277(49):46980–6.

109. Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y. Hsp90 Recognizes a Common Surface on Client Kinases. Journal of Biological Chemistry. 2006 May 19;281(20):14361–9.

110. Nakatsuka S, Takakuwa T, Tomita Y, Hoshida Y, Nishiu M, Yamaguchi M, Nishii K, Yang W-I, Aozasa K. Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase CpG island is frequent not only in B-cell but also in T- and natural killer (NK)/T-cell malignancies. Cancer Science. 2003 Jan;94(1):87–91.

111. Narayan G, Arias-Pulido H, Koul S, Vargas H, Zhang FF, Villella J, Schneider A, Terry MB, Mansukhani M, Murty VV. Frequent Promoter Methylation of CDH1, DAPK, RARB, and HIC1 Genes in Carcinoma of Cervix Uteri: Its Relationship to Clinical Outcome. Molecular Cancer. 2003;12.

112. Wong TS, Chang HW, Tang KC, Wei WI,

Kwong DLW, Sham JST. High Frequency of Promoter Hypermethylation of the Deathassociated Protein-Kinase Gene in Nasopharyngeal Carcinoma and Its Detection in the Peripheral Blood of Patients. :6.

113. Bai T, Tanaka T, Yukawa K, Maeda M, Umesaki N. Reduced expression of deathassociated protein kinase in human uterine and ovarian carcinoma cells. Oncol Rep. 2004 Mar;11(3):661–5.

114. Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, Tanaka N, Noguchi M, Sonoda T, Kohama G, Tokino T. Aberrant Methylation of Multiple Genes and Clinicopathological Features in Oral Squamous Cell Carcinoma. :9.

115. Toyooka S, Toyooka KO, Miyajima K, Reddy JL, Toyota M, Sathyanarayana UG, Padar A, Tockman MS, Lam S, Shivapurkar N, Gazdar AF. Epigenetic Down-Regulation of Death-associated Protein Kinase in Lung Cancers. Cancer Research. :9.

116. Satoh A, Toyota M, Itoh F, Kikuchi T, Obata T, Sasaki Y, Suzuki H, Yawata A, Kusano M, Fujita M, Hosokawa M, Yanagihara K, Tokino T, Imai K. DNA methylation and histone deacetylation associated with silencing DAP kinase gene expression in colorectal and gastric cancers. British Journal of Cancer. 2002 Jun;86(11):1817–23.

117. Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW, Tuder RM. Primary pulmonary hypertension

between inflammation and cancer. Chest. 1998 Sep;114(3 Suppl):225S-230S.

118. Ameshima S, Golpon H, Cool CD, Chan D, Vandivier RW, Gardai SJ, Wick M, Nemenoff RA, Geraci MW, Voelkel NF. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARγ) Expression Is Decreased in Pulmonary Hypertension and Affects Endothelial Cell Growth. Circulation Research. 2003 May 30;92(10):1162–9.

119. Achcar ROD, Demura Y, Rai PR, Taraseviciene-Stewart L, Kasper M, Voelkel NF, Cool CD. Loss of Caveolin and Heme Oxygenase Expression in Severe Pulmonary Hypertension. Chest. 2006 Mar;129(3):696–705.

120. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 1995 May;151(5):1628–31.

121. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 Overexpression Induces Pulmonary Hypertension. Circulation Research. 2009 Jan 30;104(2):236–44.

122. Fujita M, Mason RJ, Cool C, Shannon JM, Hara N, Fagan KA. Pulmonary hypertension in TNF- α -overexpressing mice is associated with decreased VEGF gene expression. Journal of Applied Physiology. 2002 Dec;93(6):2162–70. 123. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX-J, Humbert M. Inflammation, Growth Factors, and Pulmonary Vascular Remodeling. Journal of the American College of Cardiology. 2009 Jun;54(1):S10–9.

124. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Duroux P, Simonneau G, Emilie D. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. :6.

125. Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2008 Jul;178(1):81–8.

126. Lin Y, Stevens C, Hupp T. Identification of a Dominant Negative Functional Domain on DAPK-1 That Degrades DAPK-1 Protein and Stimulates TNFR-1-mediated Apoptosis. Journal of Biological Chemistry. 2007 Jun 8;282(23):16792–802.

127. Meyuhas O. Chapter 1 Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind. In: International Review of Cell and Molecular Biology [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2018 Nov 4]. p. 1– 37. Available from: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644 808008010

128. Okamoto M, Takayama K, Shimizu T, Ishida K, Takahashi O, Furuya T. Identification of Death-Associated Protein Kinases Inhibitors Using Structure-Based Virtual Screening. Journal of Medicinal Chemistry. 2009 Nov 26;52(22):7323–7.

129. Okamoto M, Takayama K, Shimizu T, Muroya A, Furuya T. Structure–activity relationship of novel DAPK inhibitors identified by structure-based virtual screening. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010 Apr;18(7):2728–34.

130. Kissil JL, Feinstein E, Cohen O, Jones PA, Tsai YC, Knowles MA, Eydmann ME, Kimchi A. DAPkinase loss of expression in various carcinoma and B-cell lymphoma cell lines: possible implications for role as tumor suppressor gene. Oncogene. 1997 Jul;15(4):403–7.

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Schlussendlich möchte ich mich bei all jenen bedanken, die an der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt haben.

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. R. T. Schermuly für die Möglichkeit der Mitarbeit an einem aktuellen Forschungsthema, der Bereitstellung eines wissenschaftlichen Arbeitsumfeldes sowie der Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt weiterhin Dr. Tatyana Novoyatleva, für die umfassende Betreuung bezüglich der Versuchsdurchführung, der Beratung bezüglich schwieriger Fragestellungen sowie der stetigen Hilfsbereitschaft zu jeder Stunde und einer unabdingbaren Motivation zum Erfolg.

Weiterhin gilt meinem Dank der medizinischtechnischen Assistenz von Christina Vroom, aber insbesondere Carina Lepper für die stetige Hilfsbereitschaft sowie einer Gutlaunigkeit, welche ansteckend ist.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitlaboranten und hier vorrangig Swathi Veeroju, für die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre, einem stetig offenen Ohr für Fragen und Probleme sowie der moralischen Unterstützung und dem Schaffen von Spaß an der Arbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Mutter, meinem Bruder und Helena Gerdova danken, welche stets an meiner Seite standen und ohne deren Unterstützung und Ausdauer das Schaffen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.