

**Expression und Funktion des Transforming Growth Factor
(TGF)- β_1 Zielgens *LMCD-1* in pulmonal-arteriellen glatten
Muskelzellen bei pulmonal-arterieller Hypertonie**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt durch

Axel Hage

aus Hannover

Gießen 2012

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik II,
University of Giessen Lung Center (UGLC)
Leiter: Prof. Dr. med. W. Seeger
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. O. Eickelberg

Gutachter: Prof. Dr. L. Schmitz

Tag der Disputation: 12.09.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1. Einführung	1
1.01 Das Blutgefäßsystem der Lunge.....	1
1.02 Zelluläre Komponenten pulmonaler Gefäße.....	2
1.03 Die pulmonale Hypertonie: Definition, Klassifikation, Diagnose.....	6
1.04 Die idiopathische und familiäre pulmonal-arterielle Hypertonie.....	8
1.05 Histopathologische Merkmale der PAH.....	8
1.06 Zelluläre und molekulare Mechanismen der PAH.....	11
1.07 Genetik der PAH.....	13
1.08 Der Bone Morphogenetic Protein Rezeptor (<i>BMPR</i>)-2.....	14
1.09 Die TGF- β Superfamilie der Zytokine.....	15
1.10 Die BMP/TGF- β Signaltransduktion in PAH.....	19
2. Hypothese und Ziel der Arbeit	23
2.01 Hypothese.....	23
2.02 Ziel der Arbeit.....	23
3. Materialien und Methoden	24
3.1 Materialien	24
3.1.01 Reagenzien.....	24
3.1.02 Ausstattung.....	25
3.2 Methoden	26
3.2.01 Patientenpopulation.....	26
3.2.02 Isolation und Kultur von humanen primären PASMC.....	27
3.2.03 Humane primäre PASMC.....	27

3.2.04 Zytokinstimulation.....	28
3.2.05 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung.....	28
3.2.06 Reverse-Transkription und Polymerase Ketten Reaktion.....	28
3.2.07 Proteinisolation und Quantifizierung.....	31
3.2.08 SDS PAGE und Western Blotting.....	32
3.2.09 Densitometrie.....	33
3.2.10 Immunohistochemie.....	33
3.2.11 Transfektion mit small interference RNA (siRNA).....	33
3.2.12 Scratch Migration Assay.....	34
3.2.13 Statistische Methodik.....	35
4. Ergebnisse	36
4.01 TGF- β_1 abhängige <i>LMCD-1</i> Expression in humanen primären PASMCM.....	36
4.02 <i>LMCD-1</i> Expression und Lokalisation in der humanen Lunge.....	38
4.03 <i>LMCD-1</i> reguliert den TGF- β Signaltransduktionsweg.....	40
4.04 TGF- β_1 abhängige Expression von α -SMA und SM22 α	42
4.05 <i>LMCD-1</i> reguliert die TGF- β_1 abhängige Expression von α -SMA und CNN1.....	43
4.06 <i>LMCD-1</i> Expression von PASMCM in PAH.....	45
4.07 TGF- β_1 induziert die Migration von PASMCM und wird beeinflusst durch <i>LMCD-1</i>	46
5. Diskussion	48
5.01 TGF- β_1 induziert die <i>LMCD-1</i> Expression in PASMCM.....	49
5.02 <i>LMCD-1</i> reguliert die TGF- β_1 Signaltransduktion.....	52
5.03 <i>LMCD-1</i> kontrolliert die TGF- β_1 induzierte Differenzierung von PASMCM.....	54

5.04 TGF- β_1 und <i>LMCD-1</i> fördern die Motilität von PASMC.....	57
Zusammenfassung/Summary	61
Abkürzungsverzeichnis	64
Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis	67
Literaturverzeichnis	68
Eidesstattliche Erklärung	80

1. Einführung

1.01 Das Blutgefäßsystem der Lunge

Die Lunge ist das Organ, in dem der Gasaustausch zwischen der Atemluft und dem Blut erfolgt. Für den Austausch von Atemgasen, der Oxygenierung des Blutes und Elimination von Kohlendioxid mittels Diffusion, stehen bei einem Erwachsenen 300-400 Millionen Lungenbläschen mit einer funktionellen Oberfläche von 70-140 m² zur Verfügung (Duncker und Kummer, 2008). Voraussetzung für die einwandfreie Funktion der Lunge ist, neben der strukturellen Integrität und einer funktionierenden Atemmechanik (Ventilation), ein kontinuierlicher Blutfluss über das Gefäßsystem der Lunge (Perfusion).

Die Blutversorgung der Lunge unterteilt sich in zwei Systeme, die Vasa privata und die Vasa publica. Erstere werden von den Rami bronchiales gebildet und sind dem linken Ventrikel nachgeschaltet. Sie führen oxygeniertes Blut und verlaufen mit den Bronchien und Bronchiolen im peribronchialen Gewebe und gewährleisten die Versorgung der Bronchialwand bis zu den Bronchioli terminales, sowie der Pulmonalarterien (Vasa vasorum) mit Sauerstoff und Nährstoffen. Die Pulmonalarterien, die desoxygeniertes Blut aus dem Körperkreislauf zum Gasaustausch transportieren, werden als die Vasa publica der Lunge bezeichnet. Die Aa. pulmonales bilden mit ihren Aufzweigungen bis zu den alveolären Kapillarnetzen und den Pulmonalvenen, sowie dem rechten Ventrikel und dem linken Vorhof den Lungenkreislauf oder auch kleinen Kreislauf. Der Lungenkreislauf gehört zum Niederdrucksystem des Kreislaufs, in dem der systolische Blutdruck in den Arterien der Lunge im Mittel 20 mm Hg, der diastolische 7 mm Hg beträgt, woraus ein mittlerer arterieller Druck von 12 mm Hg resultiert (Ehmke, 2010). Gemeinsam gehen die Aa. pulmonales aus dem Truncus pulmonalis hervor, treten jeweils in das Hilum pulmonis ein und folgen mit ihren Aufteilungen den Bronchien und Bronchiolen ohne Abgabe von Ästen bis zur kapillären Austauschstrecke in der Wand der Alveolen. Pulmonalarterien und ihre einzelnen Äste sind ihrem Verzweigungstyp nach funktionelle Endarterien (Schiebler, Schmidt et al. 2003). Aus dem alveolären Kapillarnetz erfolgt der Abfluss des oxygenierten Blutes über Postkapillaren und Venulen in die Venen der Septa interlobularia. Nach der Vereinigung mehrerer interlobulärer Gefäße und der Bildung von intersegmentalen Venen verlassen in der

Regel jeweils zwei Stämme der Vv. pulmonales das Hilum und gehen in den linken Vorhof über.

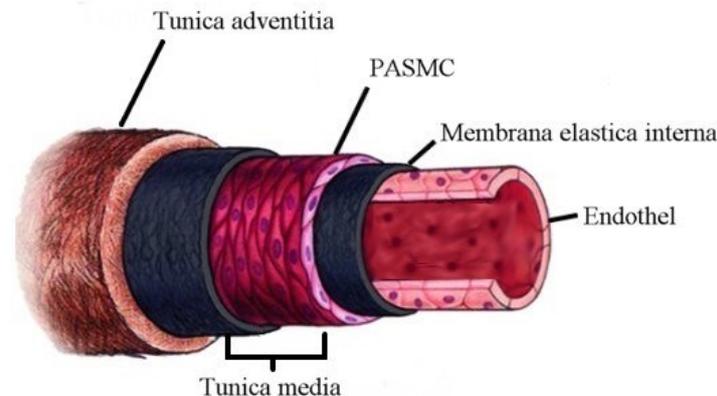


Abbildung 1: Querschnitt durch eine Arterie der pulmonalen Strombahn. Schematische Zeichnung des histologischen Wandaufbaus einer Arterie muskulären Typs. Die Tunica intima wird gebildet durch Endothelzellen, der Basallamina, einem Stratum subendotheliale und der Membrana elastica interna. Pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (PASMC) dominieren die Tunica media. Faserreiches Bindegewebe mit eingelagerten Fibroblasten bilden die Tunica externa (Adventitia) (nach D'Armiento J, 2003).

1.02 Zelluläre Komponenten pulmonaler Gefäße

Der pulmonale Kreislauf repräsentiert mit seiner Anpassung an die Aufnahme des vollständigen Herzzeitvolumens unter Beibehaltung eines niedrigen pulmonalen Blutdrucks und vaskulären Widerstands, notwendig für einen optimalen Gasaustausch, einen einzigartigen Abschnitt des Gefäßsystems. Verschiedene Zelltypen, unter anderem Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten, die an dem Aufbau der Gefäßwand pulmonaler Arterien beteiligt sind, tragen zu einer normalen vaskulären Funktion bei und ermöglichen eine gemeinsame Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase.

Das Endothel, als kontinuierliches, einschichtiges Plattenepithel kleidet mit den Endothelzellen das gesamte vaskuläre System aus und bildet eine Grenzschicht, die das Blut mit seinen korpuskulären Bestandteilen von den äußeren Lagen der Gefäße trennt. Dabei ist das Endothel partiell permeabel, kontrolliert den Transfer von Molekülen unterschiedlicher Größe über Regulation der Gefäßpermeabilität, verhindert eine spontane Blutgerinnung durch eine antithrombogene Oberfläche und integriert Signale aus der Zirkulation und dem Interstitium, essentiell für eine

koordinierte Gefäßfunktion. Zu den zentralen Aufgaben der Endothelzellen gehört die Regulation der Blutgerinnung und Thrombolysen, sowie der Thrombozytenaggregation und des Gefäßtonus über Vasokine. Daneben synthetisieren Endothelzellen Bestandteile der extrazellulären Matrix, sowie Wachstumsfaktoren und vermitteln bei inflammatorischen Prozessen die Immunantwort durch die Kontrolle der Interaktion (Extravasation) zwischen Leukozyten, Monozyten und Lymphozyten mit der Gefäßwand.

Entsprechend des Abschnitts des Gefäßsystems zeigen Endothelzellen deutliche Unterschiede in der Morphologie, Funktion und Antigenzusammensetzung und bilden eine heterogene Gruppe aus phänotypisch unterschiedlichen Zellen, die sich auch in verschiedenen Endothelzell-spezifischen Markern, wie Thrombomodulin, P-glycoprotein oder den von-Willebrand-factor (vWF), unterscheiden (King et al., 2004; Stevens et al., 2008). In der pulmonalen Strombahn setzt sich das Endothel aus zwei von einander zu unterscheidenden Phänotypen zusammen. Bis zu einem Durchmesser von 25 µm kann makrovaskuläres (pulmonal-arterielles) und anschließend bei einem kleineren Durchmesser mikrovaskuläres (kapilläres) Endothel nachgewiesen werden, die sich anhand der Affinität zu *Helix pomatia* Lektin und *Griffonia simplicifolia* Lektin unterscheiden und eine Grenze bilden, die anatomisch zwischen alveolaren und extraalveolaren Segmenten gezogen werden kann (Stevens, 2005). Endothelzellen des mikrovaskulären Phänotyps der pulmonalen Zirkulation haben ein einzigartiges Wachstumsverhalten, das sich deutlich von dem des Endothels der Pulmonalarterien unterscheidet. Diese Zellen haben ein wesentlich erhöhtes proliferatives Potential und zeigen eine vermehrte Expression von pro-proliferativen Molekülen, inklusive des vascular endothelial growth factor (VEGF) (King et al., 2004).

Die folgende Tunica media ist aufgebaut aus glatten Muskelzellen, die durch Kontraktion für die Regulation des vaskulären Tonus und damit des Blutflusses direkt verantwortlich sind. Der kontraktile Apparat besteht aus Actin- und Myosinfilamenten, sowie aus Verdichtungszone (dense bodies), die den Z-Scheiben der quergestreiften Muskulatur entsprechen. Die Actinfilamente sind im Gegensatz zu der Skelettmuskulatur über die gesamte innere Oberfläche der Plasmamembran verteilt und entsprechen den Anheftungsplaques (membrane densities), die unter anderem aus α -Actinin, Vinculin, Talin und Integrinen aufgebaut sind und mit den

Verdichtungszone über Intermediärfilamente verbunden sind (Abb. 2) (Drenckhahn, 2008).

Pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) sind, neben der Fähigkeit zu kontrahieren, auch in der Lage Prostaglandine, verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren zu synthetisieren. Darüber hinaus werden durch PASMC auch Komponenten der extrazellulären Matrix produziert. *In vitro* geht die Eigenschaft der glatten Muskelzelle zur Kontraktion verloren, die Fähigkeit zur Synthese von Komponenten der extrazellulären Matrix und zur Proliferation jedoch bleibt erhalten (Owens et al., 2004).

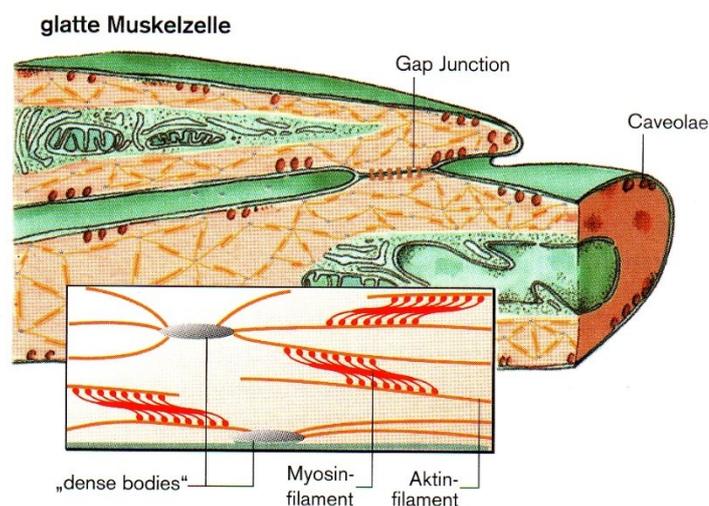


Abbildung 2: Kontraktile Elemente der glatten Muskelzelle. Schematische Darstellung zweier glatter Muskelzellen. Anordnung der Actin- und Myosinfilamente. Dense Bodies verbinden die Actinfilamente untereinander. Zell-Zellkontakt über gap junction. (Silbernagl et al., 2010).

In den distalen und proximalen Anteilen des arteriellen Systems der pulmonalen Zirkulation konnten, vergleichbar mit den Endothelzellen, verschiedene Subtypen von PASMC mit wahrscheinlich unterschiedlichem embryologischen Ursprung und eigener morphologischer, biochemischer, sowie funktioneller Charakteristik *in vivo* und *in vitro*, identifiziert werden. (Frid, Aldashev et al., 1997; Frid, Dempsey et al., 1997; Stenmark et al., 2006). So konnten in der Media proximaler pulmonaler Arterien des adulten Rinds mindestens vier phänotypisch voneinander abweichende Subpopulationen gefunden werden. Die Subpopulationen vaskulärer glatter Muskelzellen pulmonaler Arterien zeigen deutliche Unterschiede in

muskel-spezifischen Proteinen, die als verlässliche Marker des Phänotyps glatter Muskelzellen gelten. Hierzu zählen verschiedene spezifische (Differenzierungs-) Marker, wie α smooth muscle actin (α -SMA, ACTA2), Transgelin (SM22 α), Calponin, und smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC). Funktionell konnten bei den unterschiedlichen Phänotypen eine voneinander abweichende Fähigkeit zur Proliferation, Matrix-Produktion und Reaktionen auf Verletzungen beobachtet werden. Bei isolierten PASMC Subtypen der pulmonalen Strombahn konnte zudem als zelluläre Antwort auf Hypoxie-Exposition eine differierende Proliferationsrate nachgewiesen werden (Frid, Dempsey et al., 1997).

Die Kommunikation zwischen Zellen der Gefäßwand ist essentiell für die vaskuläre Homöostase und Grundlage für eine regelgerechte Funktion (Stevens et al., 2008). Die notwendige Interaktion der Zellen untereinander erfolgt autokrin-parakrin über Signalmoleküle. So sind PASMC in der Lage mit Endothelzellen, als auch mit den Fibroblasten der Adventitia, zu kommunizieren (Armulik et al., 2005). Glatte Muskelzellen der Tunica Media bilden zusätzlich mit Endothelzellen in kleineren Arterien und Arteriolen über zytoplasmatische Fortsätze Zell-Zellkontakte aus, die auch gap junctions enthalten können (Drenckhahn, 2008). Die Regulation der Scherkräfte, die durch den Blutfluss entstehen, ist eine zentrale Aufgabe der Zellen der Gefäßwand, die allerdings nur als funktionelle Einheit gelöst werden kann. Die Aufgabe des Endothels der pulmonalen Zirkulation ist es, Scherkräfte zu registrieren und entsprechend zu regulieren. Dies führt zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen. Unter physiologischen Bedingungen, synthetisieren Endothelzellen Stickstoffmonoxid (NO), das zur Relaxation der PASMC und nachfolgend zur Gefäßdilataion und Senkung der Scherkräfte führt. Darüber hinaus sind Endothelzellen in der Lage mit weiteren Zytokinen, wie Endothelin-1 (ET-1), als ein potenter Vasokonstriktor, weiter den Kontraktionszustand der PASMC zu beeinflussen. Aber nicht nur der Grad der Kontraktion der glatten Muskelzellen kann durch das Endothel gesteuert werden. Über Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) oder platelet derived growth factor (PDGF), werden die Funktionen und Reaktionen auf Verletzungen, wie das Wachstumsverhalten und die Differenzierung oder Migration von PASMC gesteuert.

Die zelluläre Komponente der äußersten Schicht eines Gefäßes, die Tunica adventitia (Adventitia, Tunica externa) wird gebildet aus einer heterogenen Gruppe

von Fibroblasten. Ähnlich wie PASMC, regulieren diese Fibroblasten der Adventitia die Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und produzieren Wachstumsfaktoren, die unter anderem die Funktion der PASMC beeinflussen. Die Adventitia ist beteiligt an der Reaktion auf Verletzungen des Gewebes, sowie auf Stress und reagiert mit einer Aktivierung der Fibroblasten, resultierend in einer gesteigerten Proliferation, EZM Synthese und Sekretion von Faktoren, die direkt den Gefäßtonus regulieren (Short et al., 2004). Aktivierte Fibroblasten, oder auch Myofibroblasten, migrieren während vaskulärer Umbauprozesse, die zum Beispiel im Rahmen von Gefäßerkrankungen auftreten, in die Media und Intima und tragen somit zu der veränderten Struktur (Verdickung) der Gefäßwand bei (Stenmark et al., 2006).

1.03 Die pulmonale Hypertonie: Definition, Klassifikation, Diagnose

Unter dem Begriff der pulmonalen Hypertonie oder auch des „Lungenhochdrucks“ werden verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, die gekennzeichnet sind durch pathologische Veränderungen der Gefäße des Lungenkreislaufes mit daraus resultierender chronischer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks (PAP) und des Lungengefäßwiderstandes (PVR). Der mittlere pulmonal-arterielle Druck steigt bei der pulmonalen Hypertonie von 12 mm Hg auf über 20 mm Hg in Ruhe und auf über 28 mm Hg bei körperlicher Belastung (Rubin 1997; Humbert et al., 2004; Ehmke, 2010). Der Lungengefäßwiderstand ist größer als $10 \text{ Pa} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{s}$ (Herold, 2009). Bei progredientem Krankheitsverlauf führt dies zu einer chronischen Belastung des rechten Ventrikels mit konsekutiver Hypertrophie und/oder Dilatation des Myokards (chronisches Cor pulmonale). Insgesamt wurden in den Vereinigten Staaten von Amerika im Jahr 2002 33,7 Millionen Patienten aus der stationären Behandlung entlassen, von denen bei circa 260.000 Patienten die Diagnose pulmonale Hypertonie gestellt werden musste, wobei das Verhältnis männlich zu weiblich 1:1,52 betrug (Hyduk et al., 2005; Kozak et al., 2005).

Nach der Venedig-Klassifikation der pulmonalen Hypertonie aus dem Jahr 2003 wird diese in fünf Gruppen eingeteilt. Die Kategorisierung beruht auf pathogenetischen, klinischen und therapeutischen Kriterien. Sie kann als Folge einer bestehenden Grunderkrankung, zum Beispiel bei Erkrankungen des linken Ventrikels, Lungenerkrankungen mit Hypoxie, chronischen Thrombosen oder Embolien auftreten. Auch steigt das Risiko bei der Einnahme bestimmter Medikamente und Drogen, wie

zum Beispiel bei Konsum von Aminorex, Fenfluramin oder Dexfenfluramin (Appetitzügler), sowie von Amphetaminen, insbesondere von Methamphetamin (Eickelberg und Seeger, 2005; Herold, 2009). Die pulmonale Hypertonie kann ebenfalls assoziiert mit Erkrankungen aus dem rheumatisch immunologischen Formenkreis, als auch bei Infektionskrankheiten wie Hepatitis B/C oder HIV/AIDS auftreten. Die idiopathischen Formen treten sporadisch, die hereditären Formen entsprechend familiär gehäuft auf. Auch können entweder der arterielle oder der venöse Schenkel des kleinen Kreislaufs betroffen sein.

Pulmonale Hypertonie	Klinik	mPAP in Ruhe [mm Hg]	mPAP bei Belastung [mm Hg]	CI in Ruhe [l/min/m²]
Latente PH	NYHA I	< 20	Anstieg > 28	Normal
Manifeste PH	NYHA II	> 20	Steiler Anstieg > 28	Normal/leicht reduziert
Schwere PH	NYHA III	> 40	Exzessiver Anstieg, Gefahr des Kreislaufkollaps	Mittelgradig reduziert

Abbildung 3: Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach Schweregrad. Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach klinischen und diagnostischen Gesichtspunkten in eine latente, manifeste und schwere Form. mPAP = mittlerer pulmonal-arterieller (Blut-)Druck; CI = Cardiac Index (Herzzeitvolumen in l/min/m² Körperoberfläche) (nach Herold, 2009)

Goldstandard bei der Diagnose der pulmonalen Hypertonie ist die Verwendung des Swan-Ganz-Katheters (Pulmonalkatheter, Pulmonalarterienkatheter), der neben den Druck im rechten Ventrikel auch den Pulmonalkapillärenverschlussdruck (pulmonary capillary wedge pressure; PCWP) und das Herzzeitvolumens (HZV) messen kann. Neben dem invasiven Pulmonalarterienkatheter hat sich durch die hohe Verfügbarkeit die transthorakale Echokardiographie zunehmend als ein Instrument zur Diagnose der pulmonalen Hypertonie etabliert und hat dazu beigetragen, dass diese heute zu einem früheren Zeitpunkt diagnostiziert werden kann (Ghofrani et al., 2008; Herold, 2009). Entsprechend der Resultate aus der Untersuchung mit dem Pulmonalarterienkatheter und/oder aus den durch die Echokardiographie gewonnen

Daten, sowie der Klinik des Patienten wird die pulmonale Hypertonie nach Schweregraden in die latente, manifeste und schwere Form eingeteilt (Abb. 3).

1.04 Die idiopathische und familiäre pulmonal-arterielle Hypertonie

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene, aber durch die Entwicklung eines Cor pulmonale schwere Erkrankung mit häufig letalem Ausgang. Die PAH bildet die erste Klasse der der pulmonalen Hypertonie gemäß der PAH Weltkonferenz 2003 in Venedig und wird unterteilt in die idiopathische (IPAH) und familiäre (FPAH), sowie in die sekundäre (SPAH) pulmonal-arterielle Hypertonie, die als Komplikation bei verschiedenen systemischen Erkrankungen auftreten kann (Sharma et al., 2005). Die Patienten leiden zu Beginn der Erkrankung unter diskreten und unspezifischen Symptomen, wie abnehmender Leistungsfähigkeit, leichter Belastungsdyspnoe, Zyanose und/oder Sinustachykardien. Nur in 20% der Fälle ist eine volle Symptomatik vorhanden (Herold, 2009). Der Krankheitsbeginn liegt bei der IPAH und FPAH zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und hat eine Inzidenz von 2 bis 3 pro Millionen pro Jahr (Humbert et al., 2004; Eickelberg und Seeger, 2005; Morrell, 2006). Dabei ist das weibliche Geschlecht von der PAH wesentlich häufiger betroffen als das männliche (Verhältnis 3:1) (Eickelberg und Seeger, 2005; Newman et al., 2008). Ohne Therapie liegt nach Stellung der Diagnose die mittlere Überlebenszeit bei Patienten zwischen zwei und drei Jahren. Dieses gilt auch für andere Formen der pulmonalen Hypertonie (Eickelberg und Seeger, 2005).

1.05 Histopathologische Merkmale der PAH

Exzessive strukturelle, aber auch funktionelle Veränderungen auf allen anatomischen Ebenen der distalen pulmonalen Arterien, die in der Konsequenz zu einem gesteigerten pulmonalen Gefäßwiderstand führen, sind ursächlich für die pulmonal-arterielle Hypertonie und treten in ähnlicher Weise auch bei anderen Formen der PH auf. In der Pathophysiologie stehen dabei vier grundlegende Mechanismen im Vordergrund. Vasokonstriktion, Gefäßrarefizierung, Thrombosierung und struktureller Gefäßumbau (vaskuläre Remodelierung). Auch können inflammatorische Prozesse in verschiedenem Ausmaß zu der Pathogenese der PAH beitragen (Tuder et al., 2007). Charakteristisch ist die Remodelierung durch Proliferation, Migration und Veränderung des Phänotyps der wandständigen Zellen (Endothelzellen, glatte

Muskelzellen und adventitielle Fibroblasten), aber auch durch die Beteiligung von zirkulierenden Entzündungs- oder Progenitorzellen und exzessive Deposition von Komponenten der extrazellulären Matrix (Olschewski et al. 2001; Humbert et al., 2004; Eickelberg und Seeger, 2005; Morrell, 2006; Eickelberg und Morty, 2007). Der Prozess der vaskulären Remodelierung ist komplex, abhängig von dem Durchmesser des pulmonalen Gefäßes und mündet in einer Okklusion der pulmonalen Strombahn durch Verdickung aller drei Schichten, der Tunica intima, media und adventitia, mit daraus resultierender Abnahme des Gefäßlumens, sowie Thrombosierung und Obliteration mit anschließendem zellulären Umbau der Gefäßwand. Als gemeinsames Merkmal zeigen alle Formen der PH eine durch glatte Muskelzellen geprägte Hypertrophie der Tunica media, beeinflusst durch pro-proliferative und anti-proliferative Signaltransduktionswege (Eickelberg und Morty, 2007).

Neben der Media-Hypertrophie durch Hyperplasie der PASMC in den distalen Arterien der pulmonalen Zirkulation, zeigen präkapilläre Arteriolen, die mit einer einzelnen diskontinuierlichen Lage aus glatten Muskelzellen ausgestattet sind, eine Neo-Muskularisierung durch PASMC, die eine Beteiligung von pro-migratorischen und pro-proliferativen Faktoren wahrscheinlich machen (Pietra et al., 2004; Day et al., 2006). In der Folge kommt es zusätzlich zu deutlichen Veränderungen der Intima. In der PAH zeigen sich diese Veränderungen der Tunica intima besonders in pulmonalen Arterien und Arteriolen mit einem Durchmesser kleiner als 200 μm und konnten bisher nicht in Arterien größer als 400 μm nachgewiesen werden (Yi et al., 2000). Dabei dominieren konzentrische Hypertrophien (onion skin lesions), bestehend aus proliferierenden Myofibroblasten und hypertrophen glatten Muskelzellen, sowie die bei schweren Verläufen der PAH auftretenden sogenannten plexiformen Läsionen (Wagenvoort und Wagenvoort 1970; Olschewski et al., 2001). Zudem können Intima-Läsionen als exzentrische Hypertrophien und in Form von reorganisierten Thromben auftreten, die aber letztlich alle zu einer Obstruktion der pulmonalen Arterien führen. Plexiforme Läsionen, die ausschließlich in der pulmonalen Zirkulation auftreten, bestehen überwiegend aus proliferierenden Endothelzellen, aber auch zu einem geringen Anteil aus PASMC und Myofibroblasten, sowie Komponenten der extrazellulären Matrix. Das Lumen wird hierbei durch einzelne Gefäßkanäle ersetzt. Diese obliterative, angioproliferative Läsion beginnt in Gefäßen mit einem Durchmesser von circa 25 μm , tritt bevorzugt an Bifurkationen auf und kann sich bis

in präkapillären Arteriolen fortsetzen (Olschewski et al., 2001; Stevens, 2005). Endothelzellen isoliert aus plexiformen Läsionen sind apoptose-resistent und zeigen eine monoklonale Expansion, ein Indiz für Mutationen in Tumor-Suppressor- und/oder zellwachstumsfördernden Genen (Zaiman et al., 2005).

Die Zellen der veränderten Gefäßwand pulmonaler Arterien in der PH sind gekennzeichnet durch eine vermehrte Expression des Proteins α -SMA (Yi et al., 2000). Die Expression von α -SMA in SM (smooth muscle) ähnlichen Zellen, die in Läsionen der pulmonalen Zirkulation akkumulieren, wird zurückgeführt auf die Expansion ortsansässiger PASMIC oder Fibroblasten der Adventitia. Daneben wird diskutiert, ob die α -SMA exprimierenden Zellen (Myofibroblasten) sich aus Progenitor-Zellen rekrutieren. Zirkulierende und ortsständige Progenitor-Zellen sind in der Lage einen SM-ähnlichen Phänotyp anzunehmen, so auch in verschiedenen Stadien vaskulärer Pathologien (Stenmark et al., 2006; Frid et al., 2006).

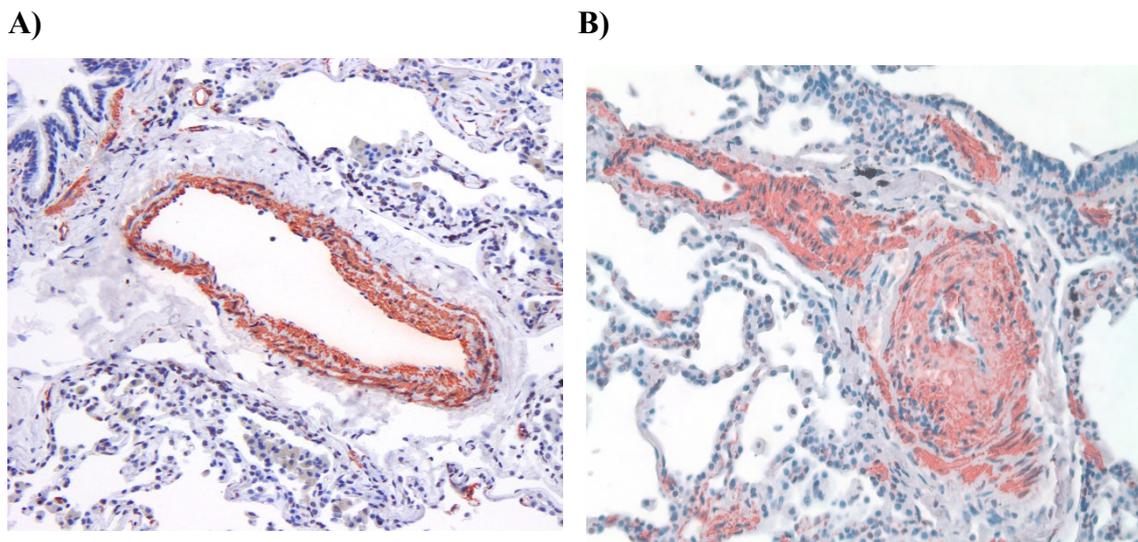


Abbildung 4: Vaskuläre Remodelierung der pulmonalen Arterien bei IPAH. Immunohistochemisch aufgearbeitete humane Lungenschnitte gefärbt mit Hämatoxylin und Antikörper gegen α -SMA. Deutlich hervorgehoben die PASMIC der Tunica media, sowie SMC der Luftwege. In der Kontrolle (A) regelhafte Arterie der pulmonalen Zirkulation. Im Gegensatz dazu in der IPAH (B) verdickte Gefäßwand und eingeengtes Lumen im Rahmen der vaskulären Umbauprozesse.

1.06 Zelluläre und molekulare Mechanismen der PAH

Die pulmonal-arterielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, zu deren Pathogenese sowohl genetische, als auch Umweltfaktoren beitragen. Ob die bei der PAH beobachtete Hyperplasie der glatten Muskelzellen der Media aus inhärenten Merkmalen der PASMC resultiert oder die Folge einer Dysregulation von molekularen Vorgängen ist, zum Beispiel durch die Freisetzung von Mediatoren durch pulmonal-arterielle Endothelzellen (PAEC), die das Wachstum von PASMC kontrollieren, konnte bislang nicht vollständig geklärt werden. Die endotheliale Dysfunktion gilt dabei mit als Auslöser der Veränderungen in Struktur und Funktion der Gefäßwand und verursacht eine Imbalance der Synthese zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren über die die Endothelzellen den vaskulären Tonus regulieren und im Verlauf zu weiteren Störungen des Gleichgewichtes von Aktivatoren und Inhibitoren der PASMC Proliferation und Migration, sowie pro- und antikoagulatorische/inflammatorische Mediatoren führen. Dies resultiert unter anderem in einer unkontrollierten Proliferation und Deposition von Bestandteilen der EZM durch PASMC und Fibroblasten der Adventitia (Farber und Loscalzo, 2004; Sanchez et al., 2007). Die Exposition von PASMC gegenüber Kulturmedium von PAEC führt zur Induktion der Proliferation, die deutlich gesteigert werden kann bei der Verwendung von Endothelzellen aus pulmonalen Arterien von IPAH Patienten (Eddahibi et al., 2006).

Die endotheliale Dysfunktion zeigt sich in der PAH durch eine reduzierte Produktion der Vasodilatoren/Wachstumsinhibitoren Stickstoffmonoxid (NO) und des Prostaglandins PGI₂ (Prostacyclin), sowie durch eine gesteigerten Synthese der Vasokonstriktoren/Ko-mitogene Endothelin-1 und Thromboxan A₂. Prostacyclin stimuliert die Formation von cAMP (cyclic adenosine monophosphat), das neben einer Thrombozytenaggregation, die Proliferation von PASMC inhibiert und die Dilatation der Gefäße der pulmonalen Strombahn fördert. Durch molekularbiologische Untersuchungen von Endothelzellen aus pulmonalen Arterien von IPAH und sekundären PAH Patienten konnte sowohl eine verminderte Expression der Prostazyklin-Synthetase und Prostazyklin, als auch eine erhöhte Konzentration von Thromboxan nachgewiesen werden (Christman et al., 1992; Tuder et al., 1999). Eine mögliche Ursache für das reduzierte Verhältnis des Prostazyklinmetabolit 2,3-dinor-6-keto Prostaglandin F_{1α} zu Thromboxan im Urin von IPAH Patienten zu normalen

Individuen (Christman et al., 1992). Das initial als Endothelium-Derived Relaxing Factor (EDRF) beschriebene Stickstoffmonoxid hat eine vergleichbare Wirkung auf die Thrombozytenaggregation und die pulmonalen Gefäße, wie Prostazyklin. Das NO Signal wird hauptsächlich vermittelt durch die Guanylatzyklase und zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und wird terminiert durch die Phosphodiesterase (PDE)-5. NO stimuliert durch die Guanylatzyklase die Bildung von zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP) und initiiert als second messenger die intrazelluläre Signalkaskade, die eine relaxierende Wirkung auf die Gefäße und einen inhibitorischen Effekt auf die Plättchenaggregation zeigt.

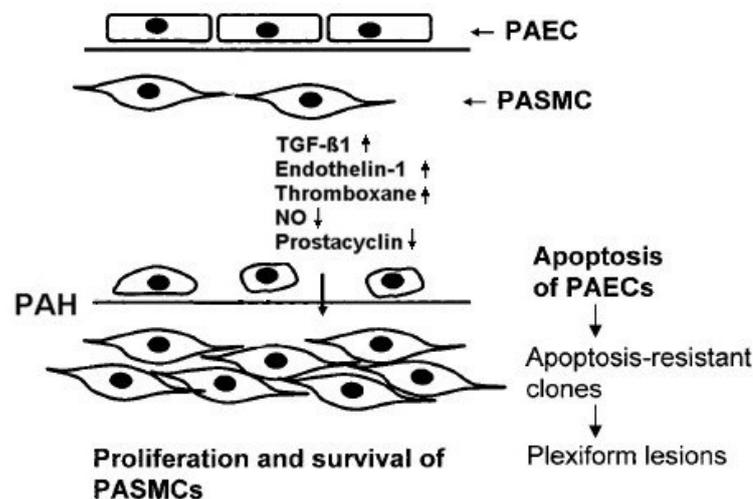


Abbildung 5: Zelluläre und molekulare Mechanismen der PAH. Vermehrte Apoptose führt zur Selektion von apoptose-resistenten Zellen und in der Folge zu einer endothelialen Dysfunktion. In der Konsequenz kommt es zu einem gestörten Gleichgewicht verschiedener Mediator-Systeme und den für die PAH typischen Veränderungen der vaskulären Wand. (nach Morrell, 2006).

Neben der Beeinflussung des vaskulären Tonus und der Thrombozytenaggregation beeinflusst NO negativ die Proliferation glatter Muskelzellen und reduziert die Expression von Endothelin-1 (Perrella et al., 1992). So konnte bei Patienten mit PH eine Erhöhung der Endothelin Konzentration bestimmt werden (Zaiman et al., 2005). Endothelin-1 wird von Endothelzellen sezerniert und nimmt unterschiedliche Funktionen wahr. Es gilt als potenter Vasokonstriktor und hat eine stark mitogene Wirkung auf glatte Muskelzellen. Ebenfalls pro-proliferative und konstriktive Wirkung auf glatte Muskelzellen zeigt Serotonin (5-Hydroxy-Tryptamin; 5-HT).

Vermittelt wird die Kontraktion der PASMC überwiegend über die 5-HT-Rezeptoren 1B/D, 2A/B, die mitogenen Effekte erfordern eine Internalisierung über transmembranäre Transportproteine, den Serotonin-Transporter (5-HTT) (Lee et al., 1991; MacLean et al., 2000).

Eine gesteigerte Expression von 5-HTT ist assoziiert mit einer verstärkten hypoxischen PH und PASMC in denen der Serotonin Transporter überexprimiert wurde, sind in der Lage spontan PH zu entwickeln (MacLean et al., 2004; Guignabert et al., 2005; Guignabert et al., 2006). Bei Patienten mit IPAH konnte ein erhöhter 5-HT-Plasmaspiegel, auch nach einer erfolgten Herz-Lungen Transplantation, sowie Polymorphismen in der (5-HTT)-Transporter-Sequenz, die kultivierte PASMC gesteigert auf den mitogenen Effekte des Serotonins reagieren lässt, nachgewiesen werden (Hervé et al., 1995; Eddahibi et al., 2001).

1.07 Genetik der PAH

Im Jahr 1984, 30 Jahre nachdem erstmalig das gehäufte familiäre Vorkommen der PAH beschrieben wurde, konnte in einer Studie ein Vererbungsmuster in Familien mit vermehrt auftretenden Symptomen der pulmonalen Hypertonie nachgewiesen werden (Dresdale et al., 1951; Dresdale et al., 1954; Loyd et al., 1984). Es wurden insgesamt 13 Familien auf klinische Zeichen der PAH untersucht und es zeigte sich, dass die familiär gehäufte PAH autosomal dominant vererbt wurde, mit allerdings hoher Variabilität und inkompletter Penetranz, wobei weibliche Familienmitglieder häufiger betroffen waren. Insgesamt zeigten circa 10% der Verwandten von Patienten mit IPAH Symptome der pulmonalen Hypertonie. Durch Versuche mit Mikrosatellitenmarkern wurde ein entsprechender Genlokus in der Region auf dem Chromosom 2q31-32 identifiziert (Morse et al., 1997; Nichols et al., 1997). In der Folge konnten Keimbahn-Mutationen in der Sequenz die für das bone morphogenetic protein receptor (*BMPR*)-2 Gen, ein Mitglied der TGF- β Superfamilie von Rezeptoren, die verschiedene zelluläre Prozesse, unter anderem zelluläre Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren, nachgewiesen werden (Deng et al., 2000 ; Lane et al., 2000). Daraus resultiert eine Reduktion der *BMPR2* Genexpression, sowie eine veränderte *BMPR2* Funktion. Ebenfalls zeigen Patienten mit PAH ohne einen Nachweis von *BMPR2* Mutationen eine erniedrigte Expression des *BMPR2* (Morrell, 2006). In ca. 70% der Familienmitglieder von IPAH Patienten können Mutationen im *BMPR2*

Genlokus gefunden werden, allerdings ohne symptomatisch zu sein. Diese unvollständige Penetranz der FPAH, die näherungsweise mit 20 bis 30 Prozent angegeben wird (Newman et al., 2001; Newman et al., 2004), weist auf eine Beteiligung weiterer Faktoren in der Pathogenese der PAH hin. Circa 144 verschiedene Mutationen in 210 Patienten mit FPAH konnten identifiziert werden (Machado et al., 2006). Dabei zeigten 75% der Patienten mit FPAH und 25% mit IPAH Missense (kodiert für eine andere Aminosäure), Nonsense (kodiert für einen Stopp der Translation) oder Frameshift (Insertion oder Deletion von Basen) Mutationen im *BMPR2* Lokus (Morrell, 2006; Eickelberg und Morty, 2007).

1.08 Der Bone Morphogenetic Protein Rezeptor (*BMPR*)-2

Der Bone Morphogenetic Protein Rezeptor-2 ist Teil eines transmembranären Rezeptorkomplexes der TGF- β Rezeptor-Superfamilie von Wachstumsfaktoren. Das *BMPR2*-Gen besteht aus 13 Exons, von denen Exon 12 das Größte darstellt. Das Protein beinhaltet eine extrazelluläre Domäne, verantwortlich für die Ligandenbindung, einen kurzen transmembranären Teil, sowie eine zyttoplasmatische Kinasedomäne. Ligandenbindung von bone morphogenetic proteins (BMP), wie BMP2, 4 und 7 initiieren über *BMPR2* die BMP Signalkaskade (Bobik, 2006). Zudem unterscheidet sich der *BMPR2* von anderen Typ 2 Rezeptoren der TGF- β Superfamilie durch eine einzigartige zusätzliche C-terminale Sequenz, folgend auf die intrazelluläre Kinasedomäne, die nahezu 50% des Proteins ausmacht und durch Exon 11, Exon 12, sowie Exon 13 kodiert wird. Es wurde zu dieser bekannten Isoform eine zweite Splicevariante des *BMPR2* isoliert, eine kurze Isoform dem größtenteils das Exon 12 fehlt, ohne Verlust der Fähigkeit R Smads und p38^{MAPK} zu phosphorylieren (Machado et al., 2003; Morrell, 2006). Obwohl beide Varianten in verschiedenen humanen Geweben exprimiert werden, ist eine unterschiedliche Funktion im Vergleich zu der langen Variante nicht bekannt. 30% der in IPAH identifizierten *BMPR2* Mutationen sind im Exon 12 im Anschluß an die Kinasedomäne lokalisiert und wurden entweder als Frameshift oder Nonsense-Mutationen beschrieben, die eine verkürzte zyttoplasmatische C-terminale Sequenz mit aberrierender Funktion aufweisen.

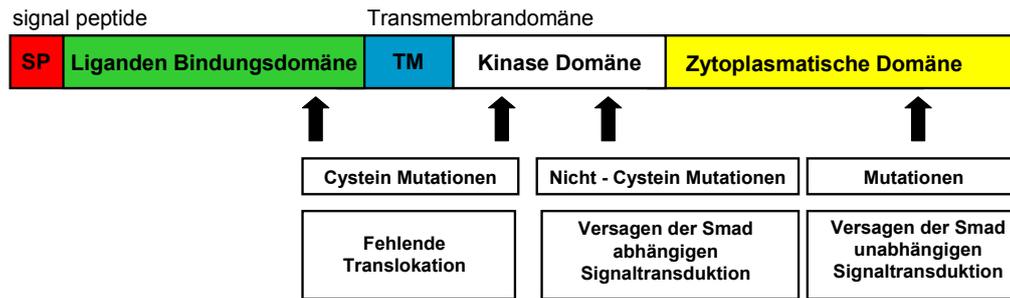


Abbildung 6: Das *BMPR2* Gen. Schematische Darstellung des *BMPR2* Gens mit möglichen Mutationen und Konsequenzen für die Funktion des Proteins (nach Machado et al., 2003; Eickelberg und Seeger, 2005; Bobik, 2006; Foletta et al., 2006; Morrell, 2006).

In Studien konnten zwei verschiedene Interaktionspartner dieser intrazellulären Domäne identifiziert werden, LIM Kinase 1 (LIMK1) und Tctex-1. Tctex-1, eine leichte Kette des Motorkomplexes Dynein, und LIMK1, ein Regulatorprotein das durch Inaktivierung von Cofilin Einfluss auf die Organisation der Aktinfilamente nimmt, interagieren mit der zytoplasmatischen Domäne des *BMPR2*, ein Prozess der in IPAH mit *BMPR2* Mutationen im Exon12 nicht nachweisbar ist und vermuten lässt, dass die C-terminale Domäne eine wichtige Rolle in der Homeostase der Gefäßwand pulmonaler Arterien spielt (Machado et al., 2003; Foletta et al., 2006) Frameshift- oder Nonsense-Mutationen, die insgesamt 70% der *BMPR2* Mutationen ausmachen, produzieren ein Transkript des mutierten Allels, das dem Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) System zugeführt wird, zur Haploinsuffizienz führt und dessen Funktion in der Pathogenese der PAH bisher nicht abschließend geklärt ist (Morrell, 2006; Eickelberg und Morty, 2007).

1.09 Die TGF- β Superfamilie der Zytokine

Die TGF- β Superfamilie von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren besteht aus mehr als 40 unterschiedlichen Zytokinen, zu denen neben den drei TGF- β Isoformen TGF- $\beta_{1/2/3}$, unter anderem die bone morphogenetic proteins (BMP), growth and differentiation factors (GDF) und die mullerian inhibitory substance (MIF) gehören. Sie regulieren eine Vielfalt an zellulären Prozessen, wie Proliferation, Migration, Apoptose, Differenzierung, Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix, sowie immunologische Reaktionen. Charakterisiert werden die Zytokine der TGF- β Superfamilie durch die Präsenz einer gemeinsamen Sequenz, sowie daraus

resultierender struktureller Eigenschaften. Diese definierende Sequenz beinhaltet sieben Zystein-Reste, mit einer festgelegten Position innerhalb der Aminosäurenabfolge, die eine Kernstruktur, „cystein-knot“ genannt, formen (Sun und Davies, 1995). Die aktivierte Form des TGF- β Moleküls ist ein 25 kDa Dimer, in dem die beiden Polypeptide durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind und über hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Das synthetisierte TGF- β Protein wird posttranslational proteolytisch modifiziert und in eine inaktive Form überführt, die nicht kovalent gebunden ist an ein N-terminal lokalisiertes latency-associated peptide (LAP) (Munger et al., 1997). Nach der Sekretion durch die Zelle kann die inaktive Form des TGF- β Moleküls durch eine Reihe unterschiedlicher Enzyme, wie Plasmin, plasminogen activator receptor, thrombospondin und der furin-like proprotein convertase in die aktivierte Form überführt werden (Rahimi und Leof, 2007).

Liganden der TGF- β Superfamilie induzieren ihre biologischen Effekte durch gleichartige Signaltransduktionswege. Aktivierte Zytokine der TGF- β Superfamilie binden, abhängig vom Liganden an membranständige Typ2 oder Typ1 Rezeptoren, die in Abwesenheit des Zytokins als Homeodimer vorliegen und induzieren die Formation eines heterotetrameren Rezeptorkomplex aus Ligand, Typ1 und Typ2 Rezeptoren (Rahimi und Leof, 2007). Typ2 Rezeptoren beinhalten eine konstitutiv aktive Serin-Threonin-Kinase, die nach Formierung des Rezeptorkomplexes eine Glycin-Serin reiche (GS-) Domäne in der juxtamembranären Region des Typ1 Rezeptors phosphoryliert. Daraus resultiert eine Aktivierung der Serin-Threonin Kinase des Typ1 Rezeptors und die Phosphorylierung intrazellulärer Signalmoleküle der TGF- β Signalkaskade. Es sind bisher in Säugetieren sieben verschiedene Typ1 Rezeptoren bekannt, activin receptor like kinase eins bis sieben (ALK1-7), sowie fünf Typ2 Rezeptoren. TGF- β initiiert die Formierung eines Rezeptorkomplexes, bestehend aus dem TGF- β -receptor type 2 (TGFBR2), sowie ALK5 (TGF- β receptor type 1, TGFBR1,) oder ALK1 (activin A receptor type 1, ACVR1). Neben Typ1 und Typ2 Rezeptoren konnten zudem Co-Rezeptoren nachgewiesen werden, die mit dem Rezeptorkomplex interagieren und die Funktion der Rezeptoren unterschiedlich modifizieren. An der Modifikation des TGF- β Signals auf Membranebene sind, je nach gewebespezifischen Kontext und Zelltypus, unter anderem Endoglin und Betaglykan beteiligt. Betaglykan ist ein Glykoprotein das auch als TGFBR3 bezeichnet wird und

als Co-Rezeptor die TGF- β Signaltransduktion durch Inhibition der Rezeptorkomplexbildung von TGFBR1 und TGFBR2 negativ beeinflusst (Eickelberg et al., 2002).

Phosphorylierung der GS-Domäne durch einen Typ2 Rezeptor und der daraus resultierenden Aktivierung der Typ1 Rezeptoren führt zu seiner Strukturänderung und damit zur Öffnung einer Bindungsstelle für intrazelluläre Signalmoleküle der TGF- β Superfamilie, den sogenannten SMA- and MAD-related proteins (Smads). Bisher sind acht verschiedene Smad-Proteine, die in drei verschiedene Klassen nach ihrer Funktion unterteilt werden, bekannt. Smads, die mit den Typ1 Rezeptoren interagieren, werden Rezeptor aktivierte (assoziierte) Smads (R-Smad: Smad1, 2, 3, 5 und 8) genannt. Welche R-Smads rekrutiert und aktiviert werden ist abhängig von der Art des Typ1 Rezeptors. TGF- $\beta_{1/2/3}$, Nodals und Aktvine aktivieren Smad2 und 3, wohingegen BMPs, MIF, als auch GDF Isoformen ihre biologischen Effekte über Smad1, 5 und 8 ausüben. Allerdings bestehen hierzu Ausnahmen. So induziert TGF- β in Endothelzellen die Phosphorylierung von Smad2 via ALK5, aber auch die Phosphorylierung von Smad1/5 via ALK1 (Goumans, 2002).

Phosphorylierung der R-Smads bewirkt die Dissoziation aus dem Rezeptor-Komplex und es kommt zur Bindung an das Common-mediator Smad (Co-Smad: Smad4), sowie zu einer Internalisierung des TGF- β Rezeptorkomplex durch einen Clathrin-abhängigen Mechanismus (Penheiter et al., 2002; Le Roy und Wrana, 2005). Smad4 beinhaltet eine nuclear localisation signal (NLS) Sequenz und ermöglicht die Translokation des Komplexes aus R-Smad und Smad4 in den Nukleus. Im Zellkern erfolgt die Regulation der Genexpression über verschiedene Mechanismen, unter anderem durch direkte Bindung an die DNA über Smad binding elements (SBE), Rekrutierung von Transkriptions-Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, sowie Interaktion mit anderen DNA Proteinen, wie activator protein 1 (AP1) und transcription factor E-3, vermittelt unter anderem über eine Ser-Ser-X-Ser (SSXS) Sequenz in der C-terminalen Region, der MH2-Domäne (mad-homology 2), sowie über eine an diese durch eine Linker-Region verbundene MH1-Domäne der R-Smad Proteine (Morrell, 2006; Davies und Morrell, 2008; Ross und Hill, 2008).

Neben den rezeptorassoziierten Smads und dem Co-Smad (Smad4) existiert die Gruppe der inhibitory Smads (I-Smad: Smad 6,7), die über jeweils unterschiedliche Mechanismen die intrazelluläre TGF- β Signaltransduktion hemmen. Smad7

konkurriert mit den R-Smads um die Interaktion mit den Typ1 Rezeptoren und reguliert negativ die TGF- β /Activin und BMP Signalwege. Zusätzlich vermittelt Smad7 die Ubiquitierung der TGF- β Rezeptoren durch Rekrutierung von Ubiquitin-Ligasen SMURF1/2 oder Protein Phosphatase 1 (Kavsak et al., 2000; Ebisawa et al., 2001; Shi et al., 2004). Im Gegensatz zu Smad7 scheint Smad6 nur das BMP Signal zu inhibieren und konkurriert mit Smad4 um das durch Phosphorylierung aktivierte Smad1. Der entstehende Komplex aus Smad1/6 ist nicht in der Lage die Transkription der TGF- β Zielgene zu steuern (Hata et al., 1998). Die Expression der I-Smads wird gefördert durch Mitglieder der TGF- β Superfamilie. Smad6 Expression wird induziert durch BMP, Smad7 durch TGF- β /Activin und BMP (Davies und Morrell, 2008).

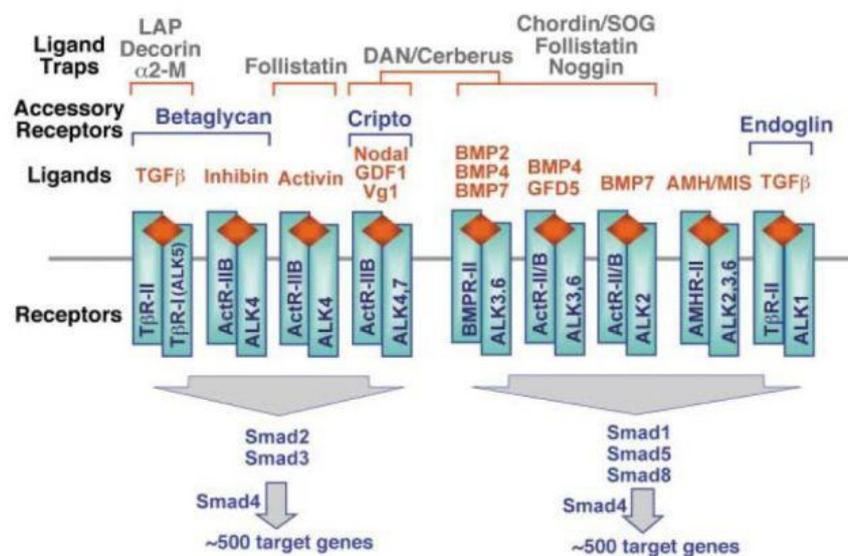


Abbildung 7: Smad abhängige Signaltransduktion der TGF- β Superfamilie. Liganden initiieren die Bildung eines transmembranären Rezeptorkomplexes aus Typ1 und Typ2 Rezeptoren. Die durch die Formation aktivierte Serin Threonin Kinase des Typ1 Rezeptors phosphoryliert intrazelluläre Signalmoleküle, Smads. Es erfolgt die Translokation der Smads in den Nukleus, die dort die Expression von Zielgenen regulieren. Korezeptoren modifizieren auf Membranebene die Signaltransduktion (Shi und Massague, 2003)

Terminiert wird die Smad abhängige Signaltransduktion durch Smad-Phosphatasen, Ubiquitierung und Regulationsfaktoren. Das BMP/ TGF- β Signal wird über verschiedene Mechanismen reguliert, extrazellulär, membranär oder intrazellulär. Extrazellulär über endogene BMP-Inhibitoren (Noggin, Chordin), welche aktivierte Liganden inaktivieren. BAMBI, Betaglykan oder Endoglin als Co-Rezeptoren

beeinflussen auf Membranebene durch Hemmung der Formierung von spezifischen Rezeptorkomplexen aus Typ1 und Typ2 Rezeptoren und führen zu einer Abschwächung der Ligandenwirkung. Intrazellulär können die I-Smads oder E3-Ubiquitin-Ligasen die aktive Signaltransduktion hemmen. Diese unterschiedlichen Schritte der Signalkontrolle bieten ein Erklärungsmodell für die zellspezifischen Funktionen von BMP/ TGF- β .

Neben der regelhaften Smad-abhängigen Signaltransduktion regulieren BMPs und TGF- β zelluläre Funktionen auch über die mitogen-activated protein kinases (MAPKs), inklusive p38^{MAPK}, p42/44^{MAPK} (extracellular regulated kinase, ERK1/2) und c-Jun-N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) in verschiedenen Zelltypen Smad-unabhängig (Massague, 2003; Nohe et al., 2004). Mutierte TGFBR1 mit erhaltener Kinaseaktivität ohne die Fähigkeit R-Smads zu binden, aktivieren p38 und JNK (Siegel und Massague, 2003). Smad-unabhängig beeinflussen MAPKs so zum Beispiel über p38 die Transkription und Apoptose (Eickelberg und Seeger, 2005). Jedoch wurde gezeigt, dass MAPK- und Smad-Signalwege interagieren und abhängig vom Zelltyp und gewebespezifischen Kontext die MAPK positiv oder das Smad-Signal negativ beeinflussen (Morrell, 2006).

1.10 Die BMP/TGF- β Signaltransduktion in PAH

BMPs bilden die größte Gruppe in der TGF- β Superfamilie von Zytokinen und wurden erstmalig als Moleküle identifiziert die das Wachstum und die Differenzierung von Knochengewebe und Knorpel regulieren (Miyazono et al., 2005). BMPs kontrollieren Wachstum, Differenzierung und Apoptose in unterschiedlichen Zell-Linien, so auch in Epithelien und mesenchymalen Zellen, sind beteiligt an der Embryogenese und tragen zu der Erhaltung und Reparatur im adulten Gewebe bei. Der bone morphogenetic receptor type 2, als Teil des transmembranären Rezeptorkomplexes, konnte in vielen unterschiedlichen Geweben und Zellen nachgewiesen werden. In der Lunge findet sich eine hohe Expression auf dem Endothel pulmonaler Arterien, in Makrophagen und auf PASMC, sowie auf Fibroblasten, allerdings in geringerer Konzentration (Rosenzweig et al., 1995; Atkinson et al., 2002).

Die zunehmende Muskelmasse der Media kleiner pulmonaler Arterien und die daraus resultierende zunehmende Wandstärke und Verengung des Lumens in der PAH, steht im Zusammenhang mit PASMC die eine phänotypische Veränderung

unterlaufen, von einem kontraktile normalen Phänotyp zu einem synthetisierenden Phänotyp, der sich durch Zellwachstum und vermehrte Matrixdeposition auszeichnet (Zaiman et al., 2005; Eickelberg und Morty, 2007). Dieser Switch führt zu einer veränderten Reaktion auf schädigende Stimuli. Reparationsprozesse, an denen BMP und TGF- β beteiligt sind, beinhalten die Proliferation von PASMC und die nachgeschaltete Deposition von extrazellulärer Matrix, die Motilität, Wachstum und Zellüberleben unterstützen. *BMPR2* Mutationen in PASMC tragen zu den pathologischen Wachstumsreaktionen auf BMP und TGF- β bei und führen bei einer reduzierten Expression oder Funktion des *BMPR2* zu einem außergewöhnlich gesteigerten TGF- β Signaltransduktionsweg und einer gesteigerten Reaktion auf TGF- β .

In Patienten mit *BMPR2*-Mutationen ist die *BMPR2*-Expression sowohl in der Lunge, als auch in dem pulmonal-vaskulären Endothel signifikant reduziert. Zudem ist die Konzentration an phosphorylierten Smad1/Smad5 verringert. Dies gilt auch für die PAH ohne *BMPR2* Mutationen (Atkinson et al., 2002; Eickelberg und Seeger, 2005). PASMC isoliert aus Patienten mit FPAH oder IPAHA, stimuliert mit TGF- β_1 , reagieren mit einem übersteigerten Wachstum auf die Exposition (Morrell et al., 2001). Diese abnormale zelluläre Reaktion auf TGF- β_1 scheint nicht verursacht zu werden durch eine veränderte Expression der TGF- β Rezeptoren 1,2 oder 3, sondern wird als eine Folge der Mutationen des *BMPR2* und des Verlustes des Smad1/Smad5 vermittelten BMP-Signals betrachtet. Es kommt hierbei zu einer Steigerung des TGF- β /ALK5/Smad2/Smad3 Signaltransduktionsweges. In Untersuchungen zur zellulären Antwort auf TGF- β in Endothelzellen antagonisiert Smad1/Smad5 funktionell das Smad2/Smad3 Signal über die Konkurrenz um das common-Smad Smad4 (Goumans et al., 2002; Goumans et al. 2003; Itoh et al., 2003). Zusätzlich interagiert vermutlich Smad1 direkt mit Smad3 und inhibiert so die Phosphorylierung oder führt zu dessen Degradation. Über eine vermehrte Bereitstellung von Smad4 durch ein vermindertes *BMPR2*/Smad1/5 Signal kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung von Smad4 durch die TGF- β /ALK5/Smad2/Smad3 Achse und damit zu einer gesteigerter Aktivierung der Transkription von nachgeschalteten Zielgenen. Unterstützt wird dieses Modell durch eine Studie in der eine gesteigerte Expression von phospho-Smad2 in kleinen pulmonaren Arterien aus Patienten mit IPAHA gemessen werden konnte. Weitere Arbeiten mit IPAHA Lungen weisen auf eine gesteigerte Expression

von TGF- β Isoformen hin (Botney et al. 1994; Richter et al., 2004). Der negative Einfluss von TGF- β auf die Entwicklung der PAH konnte zusätzlich in Studien gezeigt werden in denen die PAH bei Individuen mit Polymorphismen im TGF- β Gen 10 Jahre früher auftritt, wenn diese die Aktivität der TGF- β vermittelte Signaltransduktion steigern (Drumm et al., 2005; Poling et al., 2007).

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Mitgliedern der TGF- β Superfamilie in der Entwicklung der PH ergeben sich aus der Pathogenese einer Sonderform der PAH, der familiären hämorrhagischen Teleangiektasie (HHT), hierbei besteht ein Funktionsverlust des ACVR1 (ALK1), sowie des Endoglin Rezeptors. ALK1 als TGF- β Rezeptor vermittelt das Signal, wie die Gruppe der BMPs, via Smad1/Smad5 und demonstriert damit die außergewöhnlich wichtige Rolle eines Versagens des Smad1/Smad5 Signaltransduktionswegs bei den pathologischen Prozessen der pulmonal-vaskulären Remodelierung. Die Funktion der Mitglieder der TGF- β Superfamilie von Wachstumsfaktoren als wichtige Mediatoren des Zellwachstums, der Proliferation und Migration, sowie der Produktion extrazellulärer Matrix in Gefäßen, als auch das gestörte TGF- β /BMP Gleichgewicht in PAH, mit einer kritischen Reduktion der Expression des *BMPR2* Proteins in der PAH mit konsekutiv verminderter Smad1/Smad5 Phosphorylierung und einer resultierenden aberranten BMP Signaltransduktion, weisen auf eine veränderte BMP und TGF- β Signaltransduktion hin, die wahrscheinlich zu den PAH assoziierten Gefäßpathologien beitragen.

Durch ein gestörtes BMP/TGF- β Gleichgewicht durch *BMPR2* Mutationen in PAH, wird die Sensibilität der pulmonal-arteriellen Endothelzelle (PAEC) gegenüber schädigenden Einflüssen gesteigert. Der *BMPR2* fördert im Gegensatz zu den PASMC das Überleben der Endothelzellen und schützt diese vor Apoptose. So konnte gezeigt werden, dass durch Ausschalten des *BMPR2*-Gens sich die Anfälligkeit gegenüber dem programmierten Zelltod erhöht und die Überexpression von inhibitorischen SMAD6 und SMAD7, die die BMP-Signaltransduktion unterdrücken, protektiv auf BMP4 induzierte Apoptose in arteriellen Endothelzellen auswirkt (Kiyono und Shibuya, 2006; Teichert-Kuliszewska et al., 2006). Eine kritische Reduktion der *BMPR2* Funktion in PAEC führt zu einer gesteigerten Endothelzellen-Apoptose, beeinträchtigt die Integrität der Endothelbarriere und trägt zur endothelialen Dysfunktion bei. Die Apoptose und Phagozytose apoptotischer Zellen ist begleitet von

einer verstärkten Freisetzung von TGF- β (McDonald et al., 1999) und führt zu einer gesteigerten TGF- β Exposition, sowie in der Folge zu einer vermehrten Smad2 Phosphorylierung, als Marker der TGF- β_1 /ALK5 Aktivität, bei IPAH Patienten (Thomas et al., 2009). Die reduzierte Fähigkeit der PASMC durch einen verminderten Smad1/Smad5 Signaltransduktionsweg auf die inhibitorischen Effekte der BMPs adäquat zu reagieren, resultiert in einer übersteigerten Wachstumsantwort und fördert durch zunehmende Stärke der Gefäßwand die konzentrische Obliteration des Lumens.

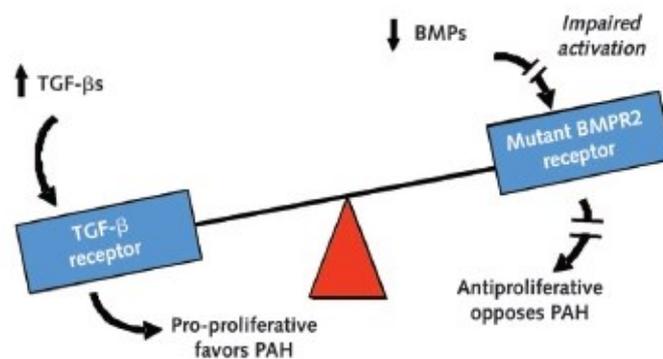


Abbildung 8: Veränderte Homöostase des bone morphogenetic protein (BMP) receptor type 2 (*BMPR2*). Ein verändertes Gleichgewicht zwischen einer gesteigerten Konzentrationen von TGF- β und verminderte *BMPR2* Level durch Mutationen trägt zu der Entwicklung der pulmonal-arteriellen Hypertonie (PAH) bei (Newman et al., 2008).

2. Hypothese und Ziel der Arbeit

2.01 Hypothese

Ein verändertes Gleichgewicht zwischen TGF- β_1 /BMP mit verstärkter TGF- β_1 Signaltransduktion führt zu Veränderungen des PASMC Phänotyps mit Verlust der Wachstumskontrolle, aberranter Proliferation, vermehrter Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix, sowie abnormer Motilität und trägt damit zur Pathogenese der PAH bei.

2.02 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die

- Identifikation neuer TGF- β_1 Zielgene mit Relevanz in der PAH, die Differenzierung, Migration und/oder Proliferation primärer humaner PASMC kontrollieren.
- Charakterisierung der Funktion identifizierter TGF- β_1 Zielgene in primären humanen PASMC und die vergleichende Analyse der Expression in PAH und im Gesunden.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.01 Reagenzien

Acrylamide Lösung, Rotiphorese Gel 30	(Merck, Deutschland)
Agarose	(Invitrogen, UK)
Albumin, bovines Serum	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Ammonium Persulfat	(Promega, Deutschland)
β - Mercaptoethanol	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Bromophenol blau	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Complement Mix	(C-39267, PromoCell, UK)
Complete Protease Inhibitor	(Roche, Deutschland)
DEPC Wasser	(Roth, Deutschland)
Dimethyl sulfoxid, DMSO	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
DNA Ladder (1 kb)	(Promega, Deutschland)
DNase I	(EC 3.1.21.1, Calbiochem, EMD Chemicals Inc., San Diego, CA, USA)
Dulbecco's phosphate buffered saline 10 \times	(PAA Laboratories, Österreich)
Dulbecco's phosphate buffered saline 1 \times	(PAA Laboratories, Österreich)
ECL Plus Western Blotting Detection System	(Amersham Biosciences, UK)
EDTA	(Promega, USA)
EGTA	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Ethanol	(Riedel-de Haen, Deutschland)
Ethidium Bromid	(Roth, Deutschland)
Glycine	(Roth, Deutschland)
HCl	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Histostain-SP kit	(Zymed, USA)
ImProm II Reverse Transkriptase	(Promega, USA)
Lipofectamine	(Invitrogen, UK)
Magnesium Chlorid	(Promega, Deutschland)
Methanol	(Fluka, Deutschland)

NaCl	(Merck, Deutschland)
Opti-MEM Medium	(Gibco BRL, Deutschland)
PCR Nucleotide Mix	(Promega, USA)
Precision Plus Protein Standard	(Bio-Rad, USA)
Pronase	(Calbiochem, EMD Chemicals Inc., San Diego, CA, USA)
2-Propanol	(Merck, Deutschland)
Quick Start Bradford Dye Reagent	(Bio-Rad, USA)
RNasin Inhibitor	(Promega, Deutschland)
RNeasy mini kit	(Qiagen, Deutschland)
RNase H- reverse transcriptase	(Promega, Deutschland)
Smooth Muscle Cell Growth Medium 2	(PromoCell, UK)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	(Promega, USA)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat	(Pierce, USA)
SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	(Invitrogen, USA)
Taq DNA Polymerase	(Promega, Deutschland)
TEMED	(Bio-Rad, Deutschland)
TGF- β_1	(R&D Systems, USA)
Tris	(Roth, Deutschland)
Triton X-100	(Promega, USA)
Trypsin /EDTA	(Gibco BRL, Deutschland)
Tween 20	(Sigma-Aldrich, Deutschland)

3.1.02 Ausstattung

ABI PRISM 7500 Sequence Detection	(Applied Biosystems, USA)
Einweg-Spritze	(Braun, Deutschland)
Falcon Tubes 15 and 50 ml	(Greiner Bio-One, Deutschland)
Film-Entwickler-Gerät, X Omat 2000	(Kodak, USA)
Filmkassette	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Filter 0.22 μm als Spritzenaufsatz	(Millipore, USA)
Filter-Tip FT: 10, 20, 100, 200, 1000	(Greiner Bio-One, Deutschland)
Fusion A153601 Reader	(Packard Bioscience, Deutschland)
GS-800TM Calibrated Densitometer	(Bio-Rad, USA)

Gel Blotting Papier 70x100mm	(Bioscience, Deutschland)
Gefrierschrank -20 °C	(Bosch, Deutschland)
Gefrierschrank -40 °C	(Kryotec, Deutschland)
Gefrierschrank -80 °C	(Heraeus, Deutschland)
Kühlschrank +4 °C	(Bosch, Deutschland)
Lichtmikroskop Olympus BX51	(Olympus, Deutschland)
Lichtmikroskop, Leica DMIL	(Leica Microsystems, Deutschland)
Mini spin Zentrifuge	(Eppendorf, Deutschland)
Mini trans-blot Kammer	(Bio-Rad, USA)
Multifuge Zentrifuge, 3 s-R	(Heraeus, Deutschland)
Nanodrop Spektrophotometer	(Peqlab, Deutschland)
PCR Thermocycler	(MJ Research, USA)
Pipetboy	(Eppendorf, Deutschland)
Pipetman P10, P20, P100, P200, P1000	(Gilson, Frankreich)
Power PAC 300	(Bio-Rad, USA)
Pipetten Tips	(Sarstedt, Deutschland)
Quantity One software	(Bio-Rad, USA)
Radiographie Film X-Omat LS	(Sigma-Aldrich, Deutschland)
Trans blot Transfer Medium (0.2 µm)	(Bio-Rad, USA)
Vortex Maschine	(Eppendorf, Deutschland)
Zellkultur Inkubator, Cytoperm 2	(Heraeus, Deutschland)
Zellkultur T75 Behälter 250ml	(Greiner Bio-One, Deutschland)
Zellkultur Platten: 6 and 48 well	(Greiner Bio-One, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.01 Patientenpopulation

Humanes Lungengewebe wurde aus elf Patienten mit IPAH (mittleres Alter 45,5 +/- 17,5) ohne aktuelle suffiziente Medikation extrahiert. Als Kontrolle wurde Lungengewebe aus neun verschiedenen Organspendern (gesunde Donoren, mittleres Alter 45,3 +/- 9,6), ohne systemische Erkrankungen oder regelmäßiger Medikamenteneinnahme, deren Transplantat aufgrund von Qualitätsmerkmalen oder Inkompatibilität mit dem Empfänger abgelehnt werden musste, gewonnen. Die aus der

Kontrolle und IPAH stammenden Gewebeproben, die für diese Studie verwendet wurden, stammen ausschließlich aus einer Kooperation mit Univ.-Prof. Dr. W. Klepetko, Abteilung für Thoraxchirurgie, Universität Wien. Die Diagnose IPAH wurde in Einklang mit den Kriterien der American Thoracic Society (ATS) und European Respiratory Society (ERS) gestellt, sowie das Studienprotokoll durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Gießen genehmigt.

3.2.02 Isolation und Kultur von humanen primären PASMIC

Humane primäre PASMIC wurden aus pulmonalen Arterien von Spender-Lungen extrahiert (Rose et al., 2002). Dazu wurden Fragmente der Arterien auf ein Plättchen platziert und nach der Entfernung der Tunica intima und adventitia (Endothel und Fibroblasten) die verbleibende Media aus PASMIC in Stücke geschnitten und anschließend in Kultur genommen. Das Zellkultur-Medium bestand aus 20% FCS und 1% Antibiotikum (Penicillin, Streptomycin). Die Identifikation von PASMIC basierte auf dem Nachweis von smooth muscle- α -actin (α -SMA, ACTA2) und SM22 α (TAGLN) und fehlender PECAM-1 Expression. Humane primäre PASMIC wurden in Zellkulturflaschen (Greiner Bio One, Deutschland) in speziellem Medium (Smooth Muscle Cell Medium 2, PromoCell, UK) ergänzt mit Complement Mix (C-39267, PromoCell, UK) bei 37 °C, 5% CO₂, 95% O₂ unter 95-100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Geteilt und in die nächste Passage überführt wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 80-90%. Dazu wurden die Zellen mit 1 × PBS gewaschen und bei 37 °C mit 3ml Trypsin (0.25% Trypsin, 1.23 g/ml EDTA) inkubiert, im Anschluss mit Medium auf 10ml aufgefüllt und in einem Verhältnis von 1:5 in neue Zellkulturflaschen überführt. Passage drei bis sieben wurden für die Versuche verwendet.

3.2.03 Humane primäre PASMIC

Neben den aus pulmonalen Arterien von Spenderlungen gewonnenen humanen primären PASMIC wurden ebenfalls kommerzielle humane primäre PASMIC (PromoCell, Cambrex) in Passage drei bis sieben für Experimente verwendet. Die Zellkultur erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in 3.2.02 beschrieben.

3.2.04 Zytokinstimulation

Humane primäre PSMC wurden kultiviert und über verschiedene Zeiträume mit TGF- β_1 (R&D Systems, USA) in einer Konzentration von 2ng/ml stimuliert.

3.2.05 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung

RNA aus humanen primären PSMC wurde mit dem RNeasy mini kit (Qiagen, Deutschland) den Herstellerangaben nach extrahiert und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde entsprechend eines Protokolls von Peqlab der RNA Gehalt in 1,5 μ l der Probe mittels des Nanodrop Spektrophotometer (Peqlab, Deutschland) gemessen.

3.2.06 Reverse-Transkription und Polymerase-Ketten-Reaktion

In einem ersten Schritt wird aus der gewonnenen RNA komplementäre DNA (complementary DNA; cDNA) durch die reverse Transkriptase (RT) Reaktion synthetisiert. Die RT ist ein enzymatischer Prozess, katalysiert durch eine reverse Transkriptase (ImProm II reverse transcriptase, Promega, USA), in dem aus einer RNA Vorlage die cDNA produziert wird. Für die RT-Reaktion wird die RNA (100-500 ng) auf 10 μ l mit autoklavierten, destillierten Wasser aufgefüllt, über 15min bei 70 °C erhitzt und anschließend auf Eis gelagert. Für die RT-Reaktion werden folgende Reagenzien zugefügt:

Komponenten	Volumen	Konzentration
10x RT Buffer II (MgCl ₂ frei)	2 μ l	1x
25mM MgCl ₂	4 μ l	5 mM
10 mM dNTP mix	1 μ l	0,5 mM
Random hexamers (50 μ M)	1,5 μ l	3,75 μ M
RNase inhibitor (20 U/ μ l)	0,5 μ l	10 U
Reverse transcriptase (50 U/ μ l)	1 μ l	50 U

Um die RT-Reaktion durchzuführen, wurde der Ansatz nach dem folgenden Protokoll inkubiert: 20 °C für 10min, 43 °C für 75min und 99 °C für 5min. Die cDNA wurde direkt für die PCR verwendet oder umgehend bei -20 °C gelagert. Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine Technik, die die exponentielle Amplifizierung von spezifischen DNA Segmenten ermöglicht. Die PCR als solche ist eine enzymatische

Reaktion, katalysiert durch eine spezifische thermostabile cDNA Polymerase, die in drei unterschiedliche Schritte eingeteilt werden kann, die jeweils einen Zyklus bilden. Zuerst erfolgt die Denaturierung der DNA mit Entstehung einzelsträngiger DNA. In einem zweiten Schritt kommt es zur Bindung der Primer an die korrespondierende Sequenz der DNA, gefolgt von der Amplifikation des entsprechenden Segments.

Bei der quantitativen PCR kommt es zu einer simultanen Amplifikation und Quantifizierung spezifischer Sequenzen der DNA. Nach jedem Zyklus der Amplifikation wird die DNA quantifiziert. Die Quantifikation erfolgt durch den fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green I (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; Invitrogen, USA), der direkt an doppelsträngige DNA bindet. Der gebundene Farbstoff generiert ein Signal, das proportional zur DNA Konzentration ist. Die Detektion wurde unter Verwendung des Sequence Detection System 7500 (Applied Biosystems, Wellesley, MA, USA) durchgeführt. Die Reagenzien wurden wie in der folgenden Tabelle abgebildet gemischt und das finale Volumen mit autoklaviertem, destilliertem Wasser auf 25 µl aufgefüllt.

Komponenten	Volumen	Konzentration
Platinum Syber Green qPCR SuperMix-UDG	13 µl	1x
50 mM MgCl ₂	1 µl	2 mM
10 µM Forward Primer	0,5 µl	0,2 µM
10 µM Reverse Primer	0,5 µl	0,2 µM
DNA	2 µl	

Es erfolgte die Quantifizierung mittels der quantitativen RT PCR für humanes *LMCD-1*, sowie α -SMA (ACTA2), cadherin 6 (CDH6), calponin1 (CNN1), DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21 (DDX21), regulator of G-protein signaling 3 (RGS3), SM22 α (TAGLN), SNF1-like kinase (SNF1LK), SRY (sex determining regio Y)-box 4 (SOX4) und tight junction protein 2 (TJP2), wobei die humane hydroxymethylbilan synthase (HMBS), die gleichmäßig ohne Pseudogene exprimiert wird, als interne Referenz benutzt wurde (Morty et al., 2007) (Abb. 11).

Abbildung 9: Sequenzen der Forward und Reverse Primer

Gene		Sequenz (5'-3')
α-SMA	for	CGAGATCTCACTGACTACCTCATGA
	rev	AGAGCTACATAACACAGTTTCTCCTTGA
CDH6	for	CCCCAGAATTTGCTGAGTTC
	rev	CCAAGGAAAACGAAAATTGG
CNN1	for	ACATTTTTGAGGCCAACGAC
	rev	CTCCCACGTTACCTTGTTT
DDX21	for	TGAAGTGGACCAGATGTTGG
	rev	AAAGCAATGTTTGGGGATTG
HMBS	for	GCACCCACACACAGCCTAC
	rev	GTACCCACGCGAATCACTCT
LMCD-1	for	GTGACCCGTCCAAAGAAGTG
	rev	AGCACTTGGCACACACAAAAG
RGS3	for	GCTGCTGGTTCACAAATACG
	rev	GAAGTCCTCACAAAGCCAACC
SNF1LK	for	AGCGGCTCAAGGAGTATCG
	rev	ACGGACTGCACCAAGGTCT
SOX4	for	CTGCTCAAAGACAGCGACAA
	rev	CGGACTTCACCTTCTTCCTG
SM22α	for	GGTGGAGTGGATCATAGTGC
	rev	ATGTCAGTCTTGATGACCCCA
TJP2	for	AACGGAACCAAAAGATGCAG
	rev	TGGGAACCACTGGGTGTAAT

Die relative Menge des Transkripts eines Genes wird repräsentiert durch ΔC_t Werte ($\Delta C_t = C_{t \text{ Referenz}} - C_{t \text{ Zielgen}}$). Ein quantitativer PCR Durchlauf besteht aus 45 Zyklen, wobei ein einzelner Zyklus aus neun verschiedenen Phasen besteht.

Phase	Zeit	Temperatur
Aktivierung der Polymerase	2min	50 °C
Erste Denaturierung	5min	95 °C
Zweite Denaturierung	5 sek	95 °C
Primerbindung	5 sek	59-60 °C

Elongation	30 sek	72 °C
Dissoziation Phase 1	15sek	95 °C
Dissoziation Phase 2	1 min	60 °C
Dissoziation Phase 3	15 sek	95 °C
Dissoziation Phase 4	15 sek	60 °C

3.2.07 Proteinisolation und Quantifizierung

Zur Isolation von Proteinen aus Zellkulturen wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS (4 °C) gewaschen und 100µl/cm² PBS hinzugefügt. Die Zellen wurden im Anschluß von der Unterlage der Zellkulturplatten mit speziellen Zellschabern (Sarstedt, Deutschland) gelöst und in 1,5 ml Reagenzröhrchen übertragen, danach für 3min bei 3000g zentrifugiert. Das abzentrifugierte Pellet wurde in 100 µl Zell-Lyse-Puffer resuspendiert, für 1 Stunde auf Eis inkubiert und für 15min bei 16000g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20 °C gelagert. Der Zell-Lyse-Puffer wurde wie folgt angemischt.

Konzentration	Komponente
20 mM	Tris HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	EGTA
0,5 %	Igepal CA-630
2 mM	Na ₃ VO ₄
1 x	Complete protease inhibitor mix

Die Proteinkonzentrationen in den Zellextrakten wurden spektrophotometrisch bei 570 nm mit einem Fusion Universal Microplate Analyser Model A153601 unter Verwendung des Quick Start Bradford Dye Reagent (Bio-Rad, USA) entsprechend der Herstellerangaben gemessen. Dazu wurden 10 µl der zu bestimmenden Probe mit 200 µl des Bradford Dye Reagent gemischt und auf eine 96-well Platte aufgetragen. Zur Bestimmung der Konzentration über eine Standardkurve wurden sechs verschiedene Ansätze mit jeweils unterschiedlicher Konzentration eines Protein-Standards (bovines Serum-Albumin, 0.05–0.5 µg/µl) ebenfalls mit 200 µl Bradford Dye Reagent hergestellt, über 15min bei Raumtemperatur inkubiert und der Absorptionsgrad aller

Proben gemessen. Der Gehalt an Protein in der zu bestimmenden Probe entspricht dem Wert des Absorptionsgrades auf der Standardkurve.

3.2.08 SDS PAGE und Western Blotting

Proteine, isoliert aus humanen primären PASMC, wurden mittels denaturierender SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) separiert und via Immunoblotting detektiert. 100 µg Protein wurde in Laemmli Proben Puffer (10% SDS, 10mM β-Mercaptoethanol, 20% Glycerol, 200mM Tris-HCl (ph 6,8) und 0,05% Bromophenolblau) resuspendiert, durch Erhitzen auf 95 °C für 10min denaturiert und auf ein 10%iges SDS-PAGE-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V über 1,5 Stunden durchgeführt. Im Anschluß erfolgte der Transfer der Proteine auf eine 0,25 µm Nitrozellulose-Membran in Transferpuffer (24 mM Tris, 193 mM Glycine und 10% Methanol) für eine Stunde bei 100 V. Geblockt wurde die Membran über eine Stunde bei Raumtemperatur mit einer Blocker-Lösung (5% Milchpulver, 1x TBS, 0,01% Tween-20). Nach dem Blocken wurde die Membran mit entsprechendem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Antigen	Anbieter	Verdünnung
LMCD-1	Abnova	1 : 500
Smad2	Cell signalling	1 : 500
phosphoryliertes Smad2	Cell signalling	1 : 500
Lamin A/C	Santa Cruz	1 : 15 000
α-SMA	Sigma – Aldrich	1 : 3 000
CNN1	Santa Cruz	1 : 500
TAGLN	Abcam	1: 10 000

Die Membran wurde dreimal mit 1x PBST Puffer (1x Phosphate buffered saline, 0,1% Tween 20) für 3 x 15min gewaschen, für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem HRP (horseradish peroxidase)-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert und erneut fünfmal für 10min 1x PBST gewaschen. Die spezifischen Banden wurden visualisiert durch Chemolumineszenz unter Verwendung eines ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Systems. Durch die Anwendung eines Stripping-

Puffers (0,1 M Glycine, ph 2.9, Tween-20, β -Mercaptothanol) bei 52 °C für 15min, konnte die Membran für ein erneutes Immunoblotting verwendet werden.

3.2.09 Densitometrie

Die Densitometrie der Radiographien wurde unter Verwendung eines GS-800 Calibrated Densitometers (Bio-Rad Laboratories, UK) und der 1-D Analyse Software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, UK) durchgeführt. Die Proteinexpression wurde normalisiert mit dem entsprechenden in dem Versuch benutzten Referenzprotein (Lamin A/C, 1:10 000, Santa Cruz).

3.2.10 Immunohistochemie

Um die Expression und Lokalisation von Proteinen in Geweben zu erfassen, wurden immunohistochemische Untersuchungen, unter Verwendung des Histostain Plus Kits (Zymed, San Francisco, USA), durchgeführt. In Parafin eingebettete humane Lungenschnitte (3 μ m) von IPAH Patienten und gesunden Spendern, wurden in Xylol (3x 10min) deparaffinisiert, in Ethanol rehydriert (100% Ethanol 2x 5min, 95% x 5min, 70% 2x 5min) und für 2x 5min in 1x PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte in 1x Zitrat-Puffer für 20min bei 100 °C inkubiert und für 10min gekühlt. Um die endogene Peroxidase-Aktivität zu neutralisieren, wurden die Schnitte über 10min 3% H₂O₂ ausgesetzt. Es erfolgte das Blocken über weitere 10min bei Raumtemperatur mit einer entsprechenden Lösung aus dem Hersteller-Kit und die anschließende Inkubation mit primären Antikörpern, α SMA-Antikörper (Sigma-Aldrich, 1:600) oder *LMCD-1* Antikörper (Abnova, 1:200) über Nacht bei 4 °C. Nach zweimaligen Waschen in 1x PBS über 5min folgte die Inkubation mit einem biotinylierten sekundären Antikörper für 10min, gefolgt durch Streptavidin-konjugiertes Enzym und chromogenes Substrat für jeweils weitere 10 min. Entwickelt wurden die Schnitte über 5min mit Diaminobenzidin (DAB) und anschließend mit Hämatoxilin gefärbt.

3.2.11 Transfektion mit small interference RNA (siRNA)

PASMC wurden auf eine 6-Well Zellkulturplatte (Greiner Bio One, Deutschland) aufgebracht und in smooth muscle cell medium 2 bis zu einer Zelldichte von 50-60% kultiviert und die Transfektion durchgeführt. Die Zellen wurden mit zweimal mit 1x PBS gewaschen und erneut ausschließlich in Medium (ohne Complement Mix) für

weitere 4 bis 6 Stunden inkubiert. Die Verringerung der Expression von *LMCD-1* erfolgte mit siRNA nach der RNAi Technik gegen die humane *LMCD-1* Sequenz. Um mögliche nicht spezifische Effekte der *LMCD-1* siRNA auszuschliessen, wurde eine Negativkontrolle mit unspezifischer siRNA (Silencer Negative Control siRNA, Ambion, USA) durchgeführt. Opti-MEM medium und Lipofectamine 2000 (Invitrogen, x) wurden den Herstellerangaben entsprechend gemischt und bei Raumtemperatur über 5min inkubiert. Zur Transfektion der PASMIC wurde in einem Verhältnis von 1µg siRNA zu 2µl Lipofectamin die siRNA (200nM) gegen *LMCD-1* hinzugegeben, vorsichtig gemischt, erneut über weitere 20min inkubiert und im Anschluss auf die Zellkulturplatte mit den Zellen aufgebracht.

siGENOME SMARTpool human LMCD1 (M-013567-00-0010, Dharmakon, USA)

Sense Sequence

CCAAAGAAGUGGAAGUGGAAUACGUUU
CAAGAGGACCACUGCCUAAUU
GGGACGGCAUCCGGAUUUAUU
UAAUAUUCGCUGAGGACUAAU

Antisense Sequence

ACGUAUCCACUUCUUUGGUU
UUAGGCAGUGGUCCUCUUGUU
UAAAUCCGGAUGCCGUCCUU
UAGUCCUCAGCGAAUAUUAUU

Nach 4 bis 6 Stunden wurde das Medium durch smooth muscle cell medium 2 mit Complement Mix ergänzt und die PASMIC für 24 oder 48 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂, 95% unter 95-100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. PASMIC wurden mit TGF-β₁ zu verschiedenen Zeitpunkten in einer Konzentration von 2ng/ml stimuliert, unstimulierte Zellen dienten der Kontrolle. Zur Lagerung des Materials wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS (4 °C) gewaschen und bei -80 °C aufbewahrt.

3.2.12 Scratch Migration Assay

Scratch Migration Assay ist eine Methode zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von Zellen in vitro (Liang et al., 2007). Humane primäre PASMIC werden auf 6-well Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 50-60% kultiviert und entweder mit siRNA gegen *LMCD-1*, oder einer universalen siRNA als negative Kontrolle wie in 3.2.11 beschrieben transfiziert und über 24 Stunden in Smooth Muscle Cell Medium 2 und Complement Mix inkubiert. Alternativ erfolgte keine Transfektion mit siRNA, jedoch aber das Waschen mit 1x PBS und der Wechsel des Zellmediums in der

Reihenfolge, wie in der Versuchsreihe mit transfizierten PSMC beschrieben. Nach 24 Stunden der Inkubation wurde ein Scratch über dem gesamten Durchmesser von 35,58 mm einer jeden Kammer der Zellkulturplatten mit einem 200 µl Filter Tip aufgebracht (Zeitpunkt null). Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS zur Entfernung von Zellfragmenten erfolgte die Inkubation in Medium, ergänzt mit Complement Mix für 12 Stunden und Stimulation mit TGF- β_1 (2ng/ml). Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Zum Zeitpunkt null, sowie nach vier, acht und zwölf Stunden wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop (Leica, Deutschland) Bilder von einem festgelegten Referenzpunkt aufgenommen. Die Analyse der Migration erfolgte mit einer Software (ImageJ; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) durch Auszählung der Zellen, die in den Scratch eingewandert sind, im Vergleich zum Zeitpunkt null. Jedes Experiment wurde als doppelter Ansatz durchgeführt.

3.2.13 Statistische Methodik

Die Ergebnisse werden durch den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes repräsentiert ($n \geq 3$). Gruppen wurden unter Verwendung eines zweiseitigen Student's t-test verglichen. Ein $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle Experimente aus denen Ergebnisse verwendet wurden, wurden mindestens dreimal durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.01 TGF- β_1 abhängige LIM and cysteine rich domains-1 (*LMCD-1*) Expression in humanen primären PASMC

In histopathologisch veränderten Arterien der pulmonal-arteriellen Strombahn, mit einer Hypertrophie der Tunica media im Rahmen vaskulärer Remodelierungsprozesse in der PAH, unterlaufen PASMC einen phänotypischen Switch von einem kontraktilem Phänotyp zu einem Phänotyp mit aberrantem Zellwachstum, vermehrter Synthese von Bestandteilen der extrazellulären Matrix und abgeänderten Reaktionen auf Stimuli, die zelluläre Prozesse wie Apoptose und Proliferation kontrollieren (Mecham et al., 1987; Humbert et al., 2004). Mitglieder der TGF- β Superfamilie von Zytokinen regulieren wichtige zelluläre Ereignisse, wie Migration, Differenzierung, aber auch Apoptose und Proliferation. In Fällen von IPAH und FPAH konnten Mutationen im *BMPR2*-Gen, als Rezeptor der TGF- β Superfamilie, nachgewiesen werden. *BMPR2* Mutationen in PASMC tragen zu pathologischen Wachstumsreaktionen auf TGF- β bei und führen bei einer reduzierten Expression oder Funktion des *BMPR2* zu einem gesteigerten TGF- β Signaltransduktionsweg, angezeigt durch vermehrte Smad2 Phosphorylierung bei Patienten mit IPAH (Morrell, 2006; Thomas et al., 2009).

Zur Identifikation potentieller Kandidatengene, die zu der Pathogenese der PAH beitragen, wurde eine genomweite Microarray Studie mit humanen primären PASMC, stimuliert mit TGF- β_1 , durchgeführt (Eickelberg et al., Daten nicht publiziert). Die Ergebnisse zeigten, dass nach zwei Stunden insgesamt 253 und nach sechs Stunden insgesamt 295 Gene durch TGF- β_1 in PASMC reguliert werden. Unter diesen befindet sich LIM and cysteine rich domains-1 (*LMCD-1*), das bereits in der Angiogenese pulmonaler Arterien bei Mäuseembryonen nachgewiesen werden konnte (Rath et al., 2005). Der Nachweis einer Regulation von *LMCD-1* in PASMC stimuliert über zwei Stunden mit TGF- β_1 (2ng/ml) in der Microarray Studie wurde mit quantitativer PCR bestätigt und wies in Bezug auf *LMCD-1* einen $\Delta\Delta\text{ct}$ von 1,81 (+/- 0,34) auf. Zum Nachweis einer längerfristigen Induktion von *LMCD-1* durch TGF- β_1 in PASMC, wurden primäre humane PASMC kultiviert, mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2 ng/ml über verschiedene Zeiträume stimuliert und die Expression von *LMCD-1*-mRNA mittels quantitativer PCR gemessen, sowie mit Western Blot die Konzentration von *LMCD-1*-Protein bestimmt (Abb. 10 A, B). Die Aktivierung der

intrazellulären TGF- β Signalkaskade als Reaktion auf die Stimulation mit TGF- β_1 wird angezeigt durch phosphorylierte Smad-Moleküle, hier repräsentiert durch Phospho-Smad2 (p-Smad2) und dient als Positivkontrolle der TGF- β_1 Stimulation.

Durch quantitative PCR und Western Blot konnte *LMCD-1* in humanen primären PASMC nachgewiesen, sowie die Induktion der Expression von *LMCD-1*-mRNA und Protein durch TGF- β_1 gezeigt werden. In der quantitativen PCR konnte ein signifikanter Anstieg von *LMCD-1*-mRNA mit einem $\Delta\Delta Ct$ nach 2 Stunden von 1,499 (\pm 0,39), nach 8 Stunden von 2,172 (\pm 0,58) und nach 16 Stunden von 1,845 (\pm 0,4) gemessen werden.

(A)

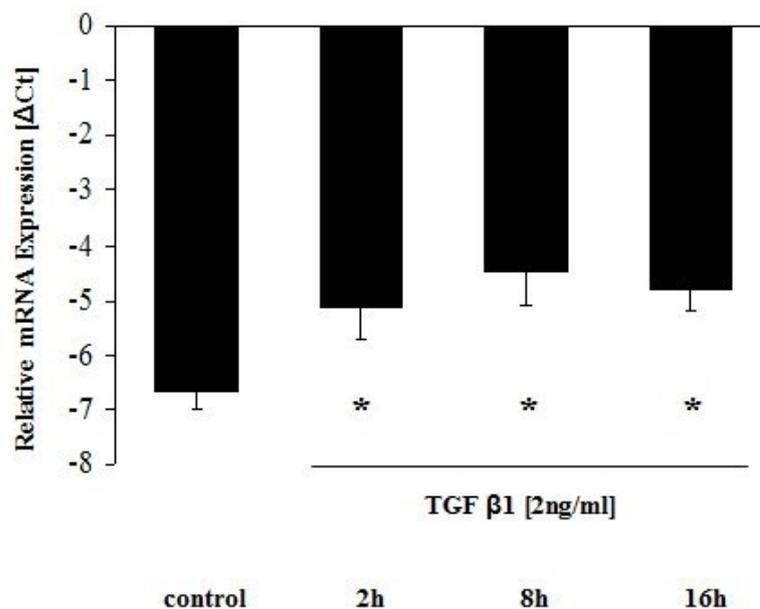
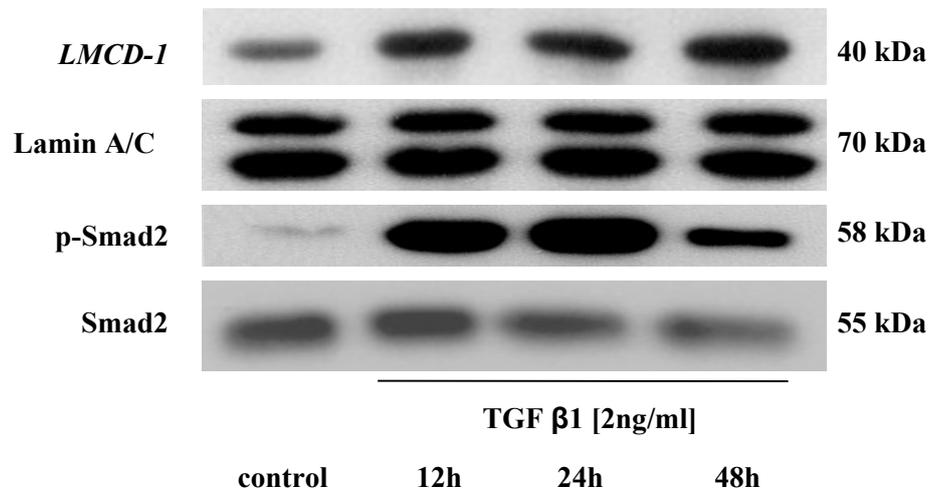


Abbildung 10: TGF- β_1 abhängige *LMCD-1* Expression. Humane primäre PASMC wurden bis zu 48 Stunden mit TGF- β_1 (2ng/ml) stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA (A) und Protein (B) isoliert. Die *LMCD-1*-mRNA Konzentration wurde gemessen mit quantitativer PCR (A), während die Konzentration von *LMCD-1*-Protein mit Western Blot (B) bestimmt wurde. Als Positivkontrolle für die TGF- β_1 Stimulation wurde Phospho-Smad2 eingesetzt, Lamin A/C und Smad2 dienen jeweils als Ladekontrolle. Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, * zeigt ein $p < 0.05$ im Vergleich zu unstimulierten PASMC. Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gewonnen.

(B)



4.02 *LMCD-1* Expression und Lokalisation in der humanen Lunge

Neben dem Vorkommen während der Angiogenese in glatter Muskulatur pulmonaler Gefäße, tritt *LMCD-1*-Protein auch in Alveolarepithel und den distalen Luftwegen in der sich entwickelnden Lunge von Mäuseembryonen auf (Rath et al., 2005). In der fetalen, als auch in der adulten humanen Lunge konnte bereits das Auftreten *LMCD-1*-mRNA belegt werden (Bespalova und Burmeister, 2000).

Zur Prüfung der Expression und Lokalisation von *LMCD-1* *in vivo* wurden histologische Schnitte aus humanen Lungen von Spendern mit PAH und von normalen Spendern (transplantierte Donoren) immunohistochemisch aufbereitet. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen *LMCD-1*- oder α -SMA-Protein (ACTA2), ein Marker der Differenzierung glatter Muskelzellen. In Lungengewebe von Donoren, als auch in Patienten mit IPAH, konnte *LMCD-1*-Protein in glatter Muskulatur der Tunica media pulmonaler Gefäße lokalisiert werden (Abb. 11), entsprechend angezeigt durch die Ko-Expression von *LMCD-1*- und α -SMA-Protein. In dieser Arbeit konnte erstmals die Expression von *LMCD-1* sowohl in PASMC von Donorlungen, als auch von IPAH Patienten nachgewiesen werden.

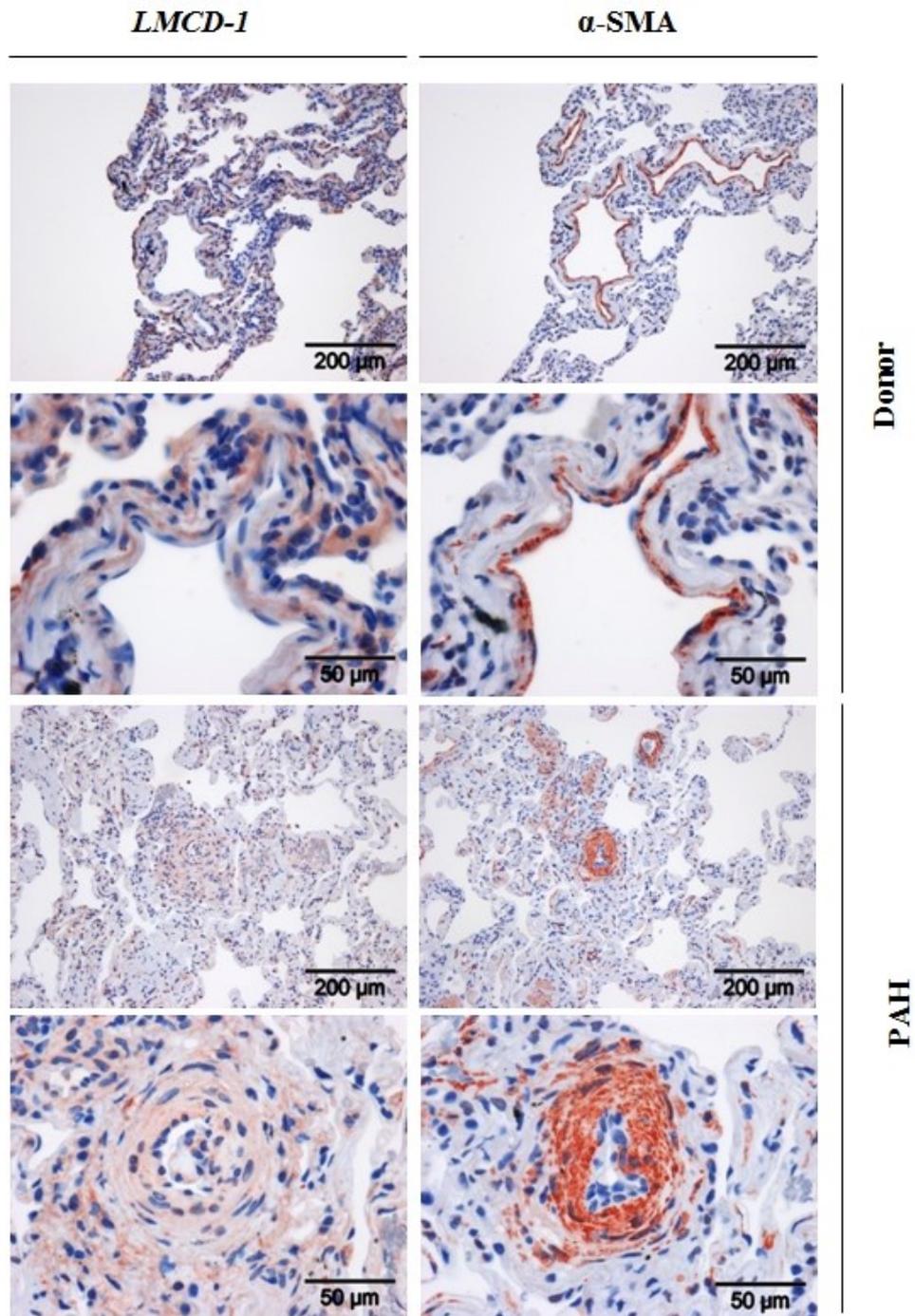


Abbildung 11: Identifikation und Lokalisation von *LMCD-1*-Protein in humanem Lungengewebe von Donoren und IPAH Patientin. Histologische Schnitte aus humanen Lungen von normalen Spendern (transplantierte Donoren) und Spendern mit IPAH, immunhistochemisch bearbeitet. Die Färbung erfolgte für *LMCD-1* oder α -SMA (ACTA2). Vergrößerung 10x und 40x.

4.03 *LMCD-1* reguliert den TGF- β Signaltransduktionsweg

LIM Domänen sind über ihre Zink-Finger-Struktur an vielfältigen Protein-Protein Interaktionen beteiligt und konnten in unterschiedlichen Proteinen identifiziert werden, die in die Regulation von zentralen zellulären Prozessen, sowie in die Pathogenese verschiedener Erkrankungen involviert sind (Bach, 2000; Zheng und Zhao; 2007). Um die Funktion von *LMCD-1* in PASMC zu bestimmen, wurde die Expression von *LMCD-1*-mRNA in primären humanen PASMC mit der RNA-Interferenz (RNAi)-Technik verringert und diese mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2 ng/ml über verschiedene Zeiträume stimuliert. Die Expression von *LMCD-1*-mRNA wurde mittels quantitativer PCR gemessen und die Konzentration von *LMCD-1*-Protein mit Western Blot bestimmt (Abb. 12 A, C).

Die *LMCD-1*-mRNA Expression wurde mit quantitativer PCR bestimmt und konnte um 73,16% signifikant verringert werden, bei erhaltener TGF- β_1 Antwort repräsentiert durch eine gesteigerte *LMCD-1* Transkription (Abb. 12 A). Die *LMCD-1* Proteinkonzentration, gemessen mit Westernblot und Densitometrie (Abb. 12 B), konnte im Mittel um 45,4 % (+/-17,4%), im Vergleich zur Kontrolle reduziert werden. Als Stimulationskontrolle für TGF- β_1 diente erneut Phospho-Smad2 (p-Smad2) (Abb. 12 C).

Es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Proteinexpression von *LMCD-1* mit einer deutlich gesteigerten Phospho-Smad2 Akkumulation in PASMC korreliert, insbesondere bei Stimulation mit TGF- β_1 . So liegt in PASMC transfiziert mit *LMCD-1*-siRNA das Smad2-Protein zu einem wesentlichen Anteil in phosphorylierter Form (Phospho-Smad2) vor, so dass eine verminderte Expression von *LMCD-1* zu einer exzessiven zellulären Antwort auf eine TGF- β_1 Exposition führt. Diese Resultate weisen auf eine regulatorische Funktion von *LMCD-1*, im Sinne einer negativen Rückkopplung auf die TGF- β Signaltransduktion hin.

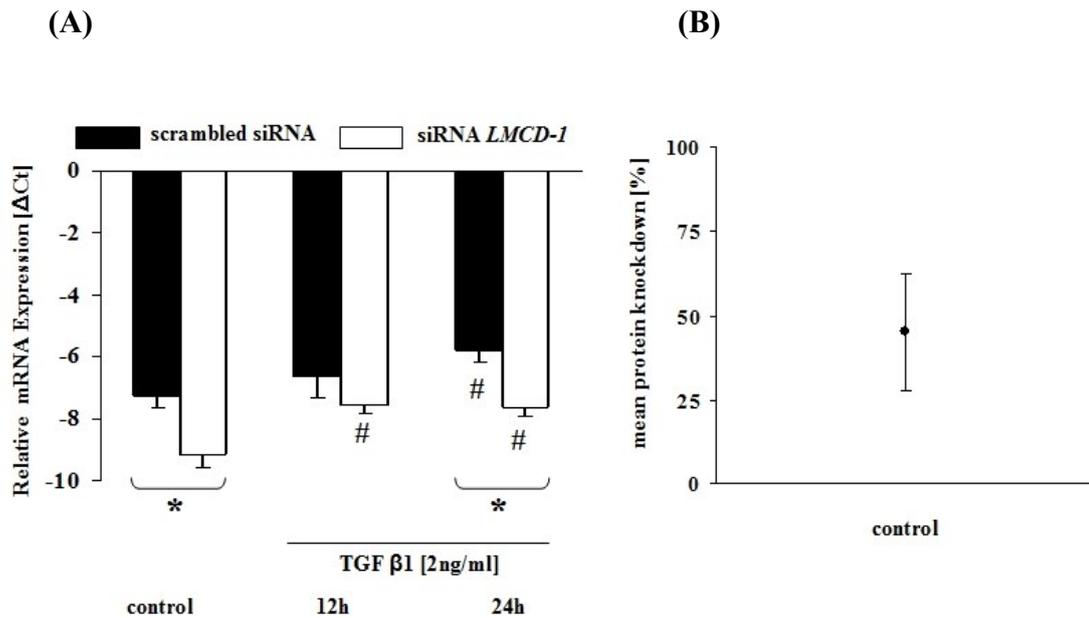
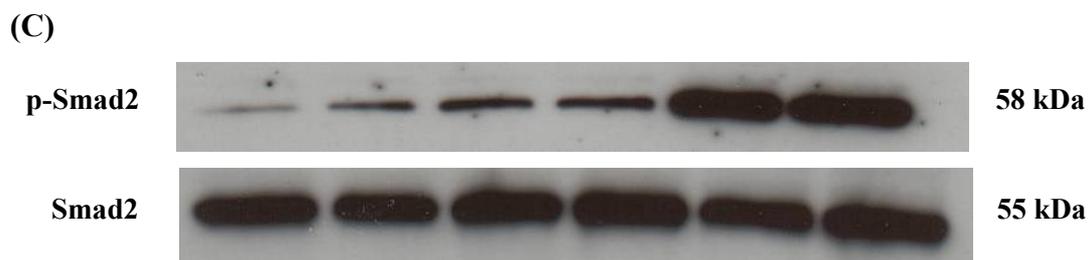


Abbildung 12: *LMCD-1* reguliert den TGF- β Signaltransduktionsweg. Humane primäre PSMC wurden mit *LMCD-1* spezifischer siRNA oder scrambled siRNA transfiziert und jeweils mit TGF- β_1 (2ng/ml) über 12 und 24 Stunden stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA (A), als auch Protein (B, C) isoliert und die Effizienz des *LMCD-1* Knockdowns durch quantitative PCR (A) und Western Blot mit anschließender Densitometrie (B) bestimmt. Der Knockdown des *LMCD-1* -Proteins beträgt im Mittel 45,4% (\pm 17,4%). Als Positivkontrolle für die TGF- β_1 Stimulation wurde Phospho-Smad2 verwendet, Smad2 diente als Ladekontrolle. Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, * zeigt ein $p < 0.05$ im Vergleich zur Kontrollpopulation der PSMC transfiziert mit scrambled siRNA. # zeigt ein $p < 0.05$ im Vergleich zu unstimulierten PSMC. Die Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gewonnen.



TGF- β_1 [2ng/ml]	control	12h	24h	control	12h	24h
siRNA scrambled	+	+	+	-	-	-
siRNA <i>LMCD-1</i>	-	-	-	+	+	+

4.04 TGF- β_1 abhängige Expression von α -SMA und SM22 α

Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) ist eine der primären Differenzierungsfaktoren von glatten Muskelzellen (Owens, 1995). TGF- β_1 induziert die Expression verschiedener SMC Differenzierungsmarker, wie smooth muscle- α -actin (α -SMA, ACTA2), SM22 α (TAGLN) und Calponin-1 (CNN1). Die Differenzierung von humanen primären PASMC auf TGF- β_1 Stimulation wurde untersucht mit kultivierten primären humanen PASMC, stimuliert mit TGF- β_1 in einer Konzentration von 2 ng/ml, über verschiedene Zeiträume. Die Konzentrationen von SM22 α (Abb. 13 A, C) und α -SMA (Abb. 13 A, B) mRNA und Protein wurden mit quantitativer PCR (Abb. 13, A) und mit Western Blot (Abb. 13 B, C) bestimmt. TGF- β_1 stimuliert die Expression von α -SMA mRNA (Δ Ct 2,95 +/- 0,101 zu 3,46 +/- 0,145), sowie α -SMA und SM22 α Protein in primären humanen PASMC. Allerdings konnte keine Induktion der Expression von SM22 α -mRNA mit quantitativer PCR nachgewiesen werden. Die veränderten Konzentrationen von α -SMA und SM22 α Protein in primären humanen PASMC sind ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung von TGF- β_1 bei der Differenzierung von SMC.

(A)

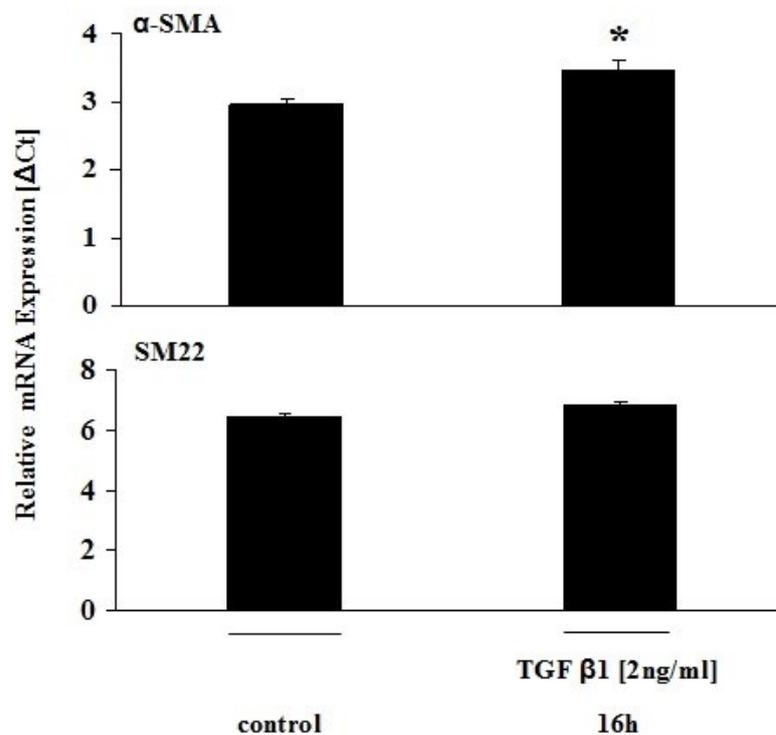
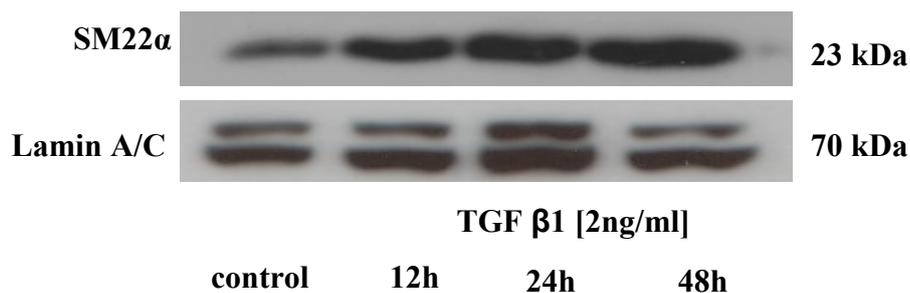


Abbildung 13: TGF- β_1 abhängige α -SMA und SM22 α Expression. Humane primäre PASMC wurden bis zu 48 Stunden mit TGF- β_1 (2ng/ml) stimuliert, die RNA (A) und Proteine (B, C) isoliert. Die α -SMA- und SM22 α -mRNA Konzentration wurde gemessen mit quantitativer PCR (A), die Konzentration von Protein mit Western Blot (B, C). Als Positivkontrolle für die TGF- β_1 Stimulation wurde p-Smad2 eingesetzt, Lamin A/C und Smad2 dienen als Ladekontrolle (Abbildung 10, B). Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, * zeigt ein $p < 0.05$ im Vergleich zu unstimulierten PASMC. Die Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gewonnen.

(B)



(C)



4.05 *LMCD-1* reguliert die TGF- β_1 abhängige Expression von α -SMA und CNN1

TGF- β_1 induziert sowohl die Expression von *LMCD-1*, als auch die Expression der Differenzierungsmarker für glatte Muskelzellen α -SMA und SM22 α in PASMC. Zudem kontrolliert *LMCD-1* den TGF- β Signaltransduktionsweg. Um den Einfluss von *LMCD-1* auf die Differenzierung von PASMC zu untersuchen, wurde in PASMC die *LMCD-1* Konzentration mit der RNAi-Technik verringert und mit TGF- β_1 zu verschiedenen Zeitpunkten stimuliert. CNN1 und α -SMA mRNA und Protein wurde mit quantitativer PCR (Abb.14 A) und Western Blot (Abb. 14 B, C) analysiert.

(A)

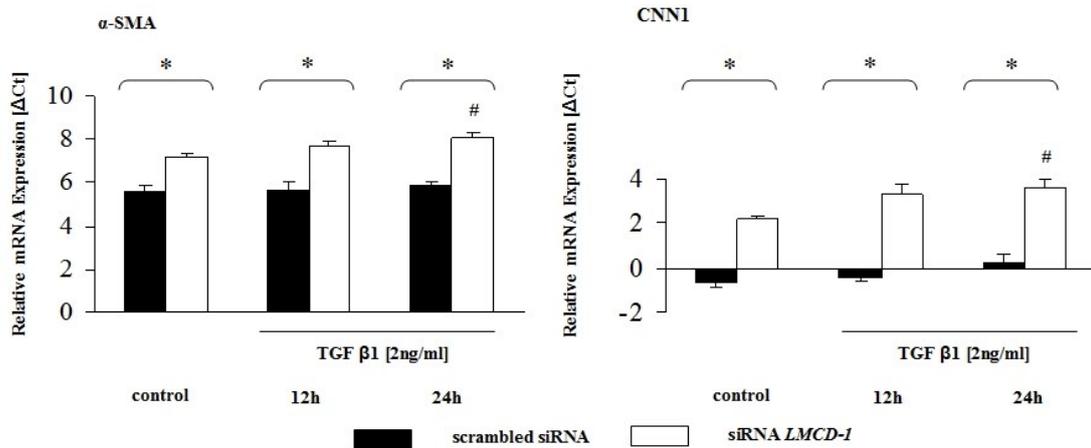
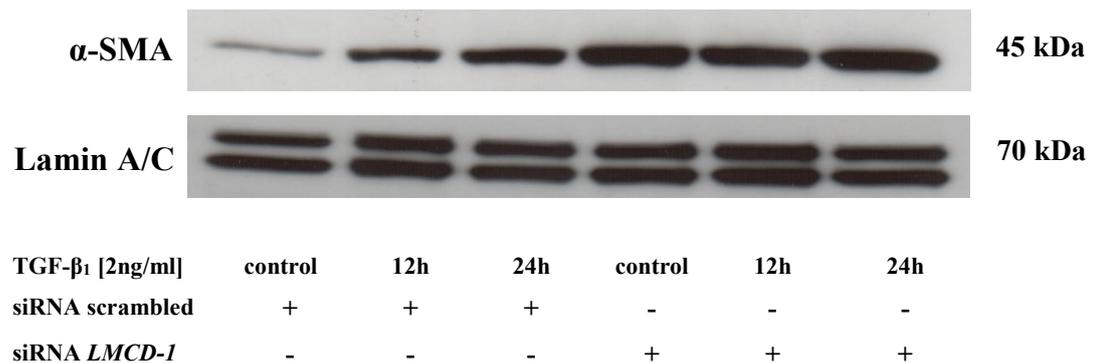


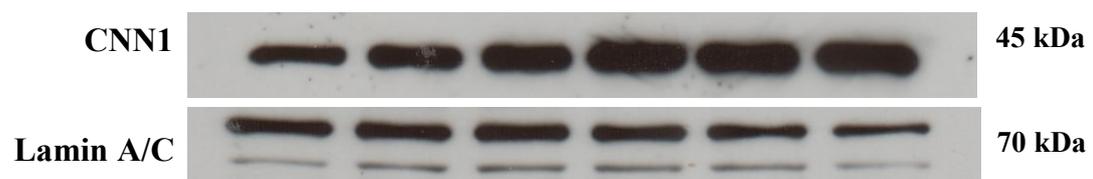
Abbildung 14: LMCD1 reguliert die TGF-β₁ abhängige Expression von α-SMA und Calponin 1.

Humane primäre PASMC wurden mit *LMCD-1* spezifischer siRNA oder mit scrambled siRNA transfiziert und mit TGF-β₁ (2ng/ml) jeweils über 12, sowie 24 Stunden stimuliert. Aus den Zellen wurde RNA (A) und Protein (B) isoliert und mit quantitativer PCR (A) und Westernblot (B) auf die Expression von α-SMA und CNN1 untersucht. Als Positivkontrolle für die TGF-β₁ Stimulation wurde Phospho-Smad2 verwendet, Smad2 (siehe Abb. 13 C) und Lamin A/C dienten als Ladekontrolle. Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes, *, # zeigt ein $p < 0.05\%$ im Vergleich zur Kontrollpopulation. Die Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gewonnen.

(B)



(C)



Eine deutliche Steigerung der Protein- und mRNA-Konzentration erfolgte nach Reduktion von *LMCD-1* durch RNAi, bei Stimulation oder in der Abwesenheit von TGF- β_1 . Die gesteigerte Differenzierung von PASMC, repräsentiert durch die vermehrte Expression von α -SMA und CNN1, induziert durch TGF- β_1 , wird reguliert durch *LMCD-1*. Beide Marker der Differenzierung reagieren auf die aktivierte TGF- β_1 Signalkaskade.

4.06 *LMCD-1* Expression von PASMC in PAH

Die Expression von *LMCD-1* ist unter anderen TGF- β_1 abhängig. Das *LMCD-1*-Protein wird von PASMC in Patienten mit PAH synthetisiert und reguliert die TGF- β Signaltransduktion. Eine Reduktion von *LMCD-1* führt zu einer außergewöhnlichen Verstärkung der TGFBR2/ALK5 vermittelten zellulären Antwort und somit zu einer gesteigerten Sensitivität auf TGF- β_1 , die bereits in familiären PAH PASMC beobachtet werden konnte (Thomas et al., 2009). Ein veränderter *LMCD-1*-Spiegel in PAH könnte zu diesem Phänomen beitragen. Zur Messung der *LMCD-1*-Konzentration wurden PASMC, isoliert aus Patienten mit PAH ($n = 5$) und aus einer Kontrollpopulation ($n = 3$), untersucht (Abb. 15). Die quantitative PCR offenbarte unterschiedliche Expressionslevel von *LMCD-1*-mRNA in den beiden Gruppen (Donor $-4,57 \pm 0,61$; PAH $-5,88 \pm 0,62$), jedoch konnte keine signifikante Differenz der *LMCD-1*-Expression zwischen unstimulierten PASMC in PAH und Donoren aufgezeigt werden ($p = 0,055$).

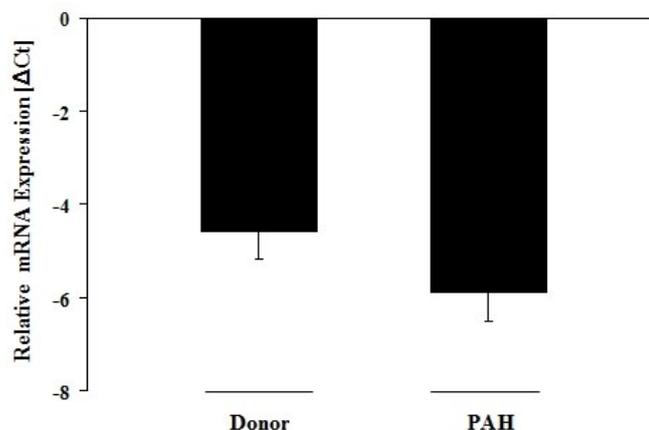


Abbildung 15: *LMCD-1* Expression von PASMC in PAH. *LMCD-1*-mRNA Level wurden in primären PASMC, isoliert aus Lungen von Donoren ($n = 3$) und PAH-Patienten ($n = 5$), mit quantitativer PCR gemessen. Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

4.07 TGF- β_1 induziert die Migration von PASMC und wird beeinflusst durch *LMCD-1*

In der Entwicklung von Organsystemen, aber auch in der Progression von Erkrankungen wie der PAH, ist die Migration von Zellen von zentraler Bedeutung und wird durch Zytokine der TGF- β Superfamilie gesteuert. TGF- β_1 inhibiert oder fördert in unterschiedlichen Zelltypen und nach dem gewebespezifischen Kontext die Migration. Um die Auswirkungen von TGF- β_1 auf das Migrationsverhalten von primären humanen PASMC zu untersuchen, wurden PASMC über 12 Stunden mit TGF- β_1 stimuliert und die Migration mittels Scratch-Migration-Assay untersucht (Abb. 16 A). Nach der Auswertung zeigte sich, dass die stimulierten primären humanen PASMC, im Vergleich zu der Kontrolle, zur Migration angeregt werden. TGF- β_1 hat einen pro-migratorischen Effekt auf PASMC. Ob auch *LMCD-1* Einfluss auf die Migration von PASMC ausübt, zum Beispiel über die Regulation der TGF- β_1 Signaltransduktion, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. PASMC, mit *LMCD-1* spezifischer siRNA transfiziert, wurden erneut mittels Scratch-Migration-Assay untersucht (Abb. 16 B).

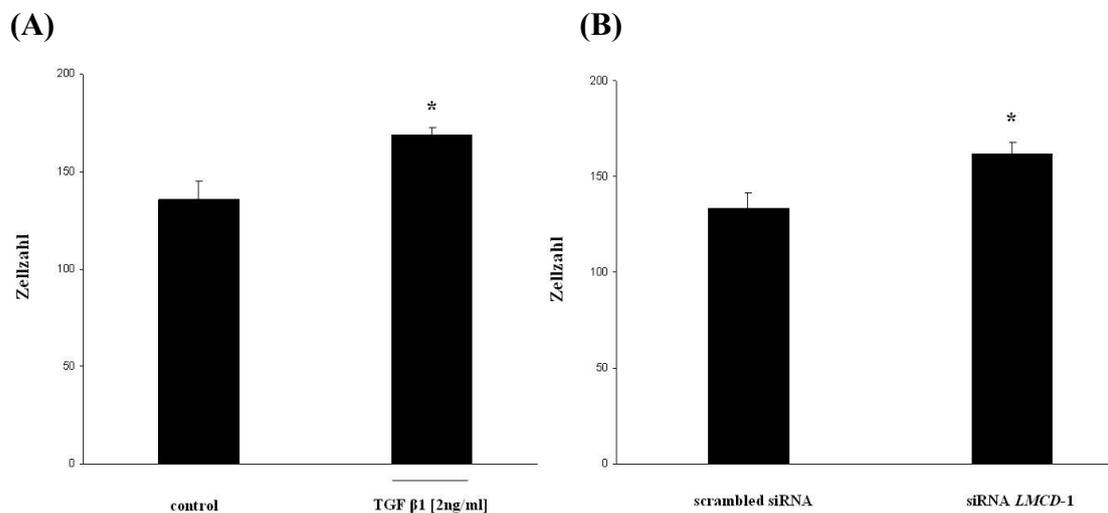


Abbildung 16: TGF- β_1 induziert PASMC Migration und wird beeinflusst durch *LMCD-1*. Primäre humane PASMC wurden bis zu einer Zelldichte von circa 50 bis 60% kultiviert und mit *LMCD-1* spezifischer siRNA, mit scrambled siRNA transfiziert (B) oder über 12 Stunden mit TGF- β_1 (2ng/ml) stimuliert (A). Die Migration wurde mit Scratch-Migration Assay bestimmt (A,B). Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, * zeigt ein $p < 0.05\%$ im Vergleich zur Kontrolle. Die Daten wurden aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten gewonnen.

Die Auswertung des Scratch-Migration-Assay zeigte, dass primäre humane PASMC nach Transfektion mit *LMCD-1* spezifischer siRNA im Vergleich zur Kontrolle mit einer vermehrten Migration reagieren. Diese Ergebnisse lassen auf einen wahrscheinlich anti-migratorischen Effekt von *LMCD-1* in PASMC schließen.

5. Diskussion

Der Fokus der Arbeit ist gerichtet auf phänotypische Veränderungen von PASMC in der Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie unter Berücksichtigung des veränderten TGF- β /BMP Gleichgewicht mit einer verstärkten TGF- β_1 Signaltransduktion. Die PAH ist charakterisiert durch eine Hypertrophie der Media kleiner Arterien der pulmonalen Zirkulation, verursacht durch PASMC, die einen phänotypischen Switch mit konsekutiver abnormer Motilität, vermehrter Deposition extrazellulärer Matrix, sowie aberranter Reaktion auf Stimuli, die zelluläre Prozesse wie Apoptose und Proliferation kontrollieren, unterlaufen (Mecham et al., 1987; Humbert et al., 2004; Zaiman et al., 2005; Eickelberg und Morty, 2007). Dabei konnten in bis zu 50% der FPAH Keimbahn-Mutationen in der Sequenz, die für das *BMPR2*-Protein kodiert nachgewiesen werden, resultierend in einer Reduktion der *BMPR2* Genexpression, sowie einer veränderten *BMPR2* Funktion (Morrell, 2006; Zakrzewicz et al., 2007). Der überwiegende Anteil der bisher beschriebenen Mutationen des *BMPR2*-Gens betreffen die Kinase Domäne und führen zu einer abberanten Signaltransduktion vermittelt unter anderen durch Smad-Proteine (Rudarakanchana et al., 2002; Yang et al., 2005; Machado et al., 2006, Teichert-Kuliszewska et al., 2006). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine verstärkte TGF- β_1 Signaltransduktion in der PAH als Konsequenz einer gestörten *BMPR2*-vermittelten Signalkaskade. PASMC, isoliert aus Patienten mit FPAH oder IPAHA, reagieren mit einem übersteigerten Wachstum auf die Stimulation mit TGF- β_1 (Morrell et al., 2001). Zusätzlich konnte eine gesteigerte Konzentration von phospho-Smad2 in kleinen pulmonalen Arterien aus Patienten mit IPAHA, als auch eine erhöhte Konzentration von TGF- β Isoformen in Lungen von IPAHA Kranken, gemessen werden (Richter et al., 2004; Botney et al., 1994). Das veränderte TGF- β /BMP Gleichgewicht mit einer gesteigerten Konzentrationen von TGF- β , sowie verstärkter TGF- β_1 Signaltransduktion und eines verminderten *BMPR2*-Levels trägt zu der Entwicklung der PAH bei (Newman et al., 2008).

Zur Identifikation neuer TGF- β_1 Zielgene mit Relevanz in der Pathogenese der PAH, die Differenzierung, Migration und/oder Proliferation primärer humaner PASMC kontrollieren, wurden Daten aus einer genomweiten Microarray Studie mit

PASMC nach Stimulation mit TGF- β_1 (Eickelberg et al., Daten nicht publiziert) ausgewertet und potentiell relevante Gene für weitere Untersuchungen ausgewählt. Es erfolgte die Charakterisierung der Funktion identifizierter TGF- β_1 Zielgene in primären humanen PASMC und der Nachweis einer Expression in PAH und im Gesunden.

Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren den Einfluß von TGF- β_1 auf die Regulation zellulärer Prozesse in PASMC via *LMCD-1*, wie Migration und Differenzierung. *LMCD-1* konnte als ein neues TGF- β_1 Zielgen identifiziert werden und kontrolliert die TGF- β_1 Signaltransduktion, Migration und Differenzierung von PASMC. Eine verringerte Konzentration von *LMCD-1* führte zu einem deutlich verstärkten TGF- β_1 Signal in PASMC, wie es auch in der PAH beobachtet werden konnte. Ausgehend von der Hypothese, dass ein unopponiertes/übersteigertes TGF- β_1 Signal zu den pathologischen Veränderungen der PASMC in der Entwicklung der PAH beiträgt wurde die Expression von *LMCD-1* in der PAH untersucht. Immunohistochemisch und mit PASMC isoliert aus Patienten erfolgte der Nachweis einer Expression von *LMCD-1* in der PAH.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der Studie eindeutig auf eine regulatorische Funktion von *LMCD-1* im Sinne einer negativen Rückkopplung auf die TGF- β Signaltransduktion hin. Ein Mechanismus der möglicherweise zur Erhaltung eines normalen PASMC-Phänotyps in der gesunden Lunge beiträgt, in der Pathogenese der PAH jedoch verloren geht und zu der verstärkten Reaktion auf eine TGF- β_1 Exposition beitragen könnte.

5.01 TGF- β_1 induziert die *LMCD-1* Expression in primären humanen PASMC
TGF- β_1 kontrolliert in PASMC die Expression von insgesamt 253 Genen nach zwei Stunden und von 295 Genen nach sechs Stunden. Unter diesen Genen befindet sich LIM and cysteine rich domains-1 (*LMCD-1*), das als neues Zielgen der TGF- β_1 Signalkaskade identifiziert werden konnte, bestätigt durch quantitative PCR und Western Blot. TGF- β_1 fördert sowohl die Expression von *LMCD-1*-mRNA, als auch die Synthese von *LMCD-1*-Protein. Es konnte eine signifikant erhöhte Konzentration von mRNA und Protein in PASMC nach Stimulation mit TGF- β_1 gemessen werden.

LMCD-1 ist ein LIM Domänen-Protein lokalisiert in der Telomer-Region auf dem humanen Chromosom 3p26-24 (Bespalova und Burmeister, 2000). Das modular aufgebaute Protein besteht aus insgesamt vier Domänen. Neben zwei aufeinander folgenden LIM Domänen (LIM1 C-X₂-CX₂₂-H-X₂-C-X₂-C-X₂₀-C-X₂-H, LIM2 C-X₂-C-X₂₀-H-X₂-C-X₂-C-X₁₇-C-X₂-C), die sich C-terminal befinden, besteht die *LMCD-1* Sequenz aus einem cysteinreichen N-terminalen Motiv (C-X₂-C-X₃-C-X₅-H-X₅C-X₂-C-X₁-C-X₄-H-C), die cystein-rich domain (CYS-domain), sowie einer PET Domäne (Prickle Espinas Testin Domäne), deren Sequenz erstmals in *Drosophila* innerhalb des LIM Domänen Proteins Prickle (pk), sowie in dem humanen Protein LIM domain only 6 (LMO6) und im murinen Testin identifiziert werden konnte (Gubb et al., 1999). Zudem wurde C-terminal eine potentielle nuclear localization sequence (NLS), sowie ein peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1) nachgewiesen (Abb. 17) (Bespalova und Burmeister, 2000; Rath et al., 2005).

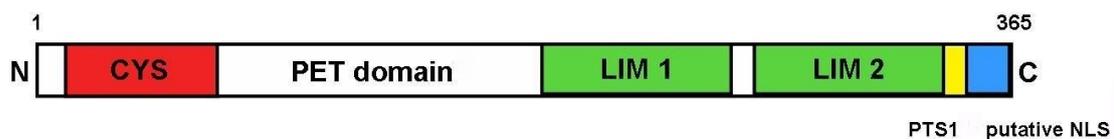


Abbildung 17: Das *LMCD-1* Protein. Das modular aufgebaute Protein besteht aus insgesamt vier Domänen. Neben zwei aufeinander folgenden LIM Domänen, besteht die *LMCD-1* Sequenz aus der cystein-rich domain (CYS-domain), sowie einer PET Domäne. Zudem konnte eine nuclear localization sequence (NLS), sowie ein peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1) nachgewiesen werden (Bespalova und Burmeister, 2000; Rath et al., 2005).

Die LIM Domäne ist eine Zink-Finger-Struktur, die in Protein-Protein Interaktionen involviert ist und in einer Reihe von unterschiedlichen Proteinen identifiziert werden konnte, die an der Steuerung von fundamentalen zellulären Prozessen, als auch an der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beteiligt sind. Domänen, die Protein-Protein Interaktionen ermöglichen, partizipieren an und regulieren nahezu alle essentiellen zellulären Vorgänge, wie Zellwachstum, Differenzierung oder Apoptose (Bach, 2000; Zheng und Zhao, 2007). Bisher konnten im humanen Genom 135 Sequenzen in 58 Genen identifiziert werden, die für LIM Domänen kodieren (Bian et al., 2010).

Der Begriff LIM leitet sich von den Anfangsbuchstaben der Proteine Lin-11, Isl-1 und Mec-3 ab, in denen die LIM Domäne erstmalig beschrieben wurden (Way und Chalfie, 1988; Freyd et al., 1990; Karlsson et al., 1990). Die LIM Domäne ist eine cystein- und histidinreiche Sequenz bestehend aus 50-60 Aminosäuren mit zwei charakteristischen Zink-Finger-Domänen, getrennt durch zwei Aminosäuren. Die Zink-Finger-Domänen, die eine LIM Domäne bilden, enthalten acht Aminosäuren, in der Mehrheit Cystein und Histidin, die koordiniert zwei Zinkatome binden. Trotz der evidenten Unterschiede in den Sequenzen der LIM Domänen, konnte eine Konsensus-Sequenz definiert werden als C-X₂-C-X₁₆₋₂₃-H-X₂-C-X₂-C-X₁₆₋₂₃-C-X₂-C (C = Cystein/ H = Histidin), wobei X für jede Aminosäure steht (Jurata und Gill, 1998). Klassifiziert wurden LIM Domänen-Proteine in drei Gruppen basierend auf der Anordnung der LIM Domäne, sowie der Gesamtstruktur der Proteine. Die erste Gruppe beinhaltet N-terminal lokalisierte und in Reihe angeordnete LIM Domänen, in der dritten Gruppe befinden sich diese C-terminal. Proteine, die sich mehrheitlich aus LIM Domänen zusammensetzen, bilden die zweite Gruppe (Dawid et al., 1998). Mit zunehmender Anzahl und funktioneller Bandbreite der LIM Domänen-Proteine wurden sie weiter in vier Gruppen klassifiziert. Die erste Gruppe wird aus LHX (LIM Homeodomain) und nukleären LMO (LIM domain only) gebildet, die beide zwei aufeinander folgende LIM Domänen am N-terminalen Ende aufweisen. Sie fungieren als Transkriptionsfaktoren oder Kofaktoren und können im Zellkern lokalisiert werden. Die zweite Gruppe beinhaltet LMOs, die aus zwei oder mehr LIM Domänen, die N- oder C-terminal liegen, bestehen und sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma zu finden sind. Die dritte und vierte Gruppe bestehen aus Proteinen, die neben der charakteristischen LIM Domäne, weitere funktionelle Gruppen enthalten. Zusätzlich zeigen die Proteine der vierten Gruppe Oxygenase- oder Kinaseaktivität, die sie von der dritten Gruppe unterscheiden (Zheng und Zhao, 2007).

Aufgrund der Kriterien zur Einteilung der LIM Domänen-Proteine wird *LMCD-1* in die dritte Gruppe eingeordnet. Gemeinsam mit LMO6, Testin, Prickle1/2, Rab interacting lysosomal protein (RILP) und overexpressed breast tumour protein (OEBT) bildet *LMCD-1* eine Subfamilie, die an der Tumorsuppression, sowie an der Verbindung zwischen Zell-ECM Adhäsionen und dem Aktin-Zytoskelett beteiligt ist (Zheng und Zhao, 2007). Die Mehrheit der LIM Domänen-Proteine aus der dritten Gruppe konnten im Zytoplasma identifiziert werden, interagieren mit Proteinen des

Zytoskeletts und sind in der Lage in den Nukleus überzutreten und dort die Transkription von Zielgenen zu beeinflussen (Kadmas und Beckerle, 2004; Zheng und Zhao, 2007).

5.02 *LMCD-1* reguliert die TGF- β_1 Signaltransduktion

Durch den Einsatz von siRNA gegen die Sequenz von *LMCD-1* in PASMC konnte eine signifikant verminderte zelluläre *LMCD-1*-Konzentration erzielt werden und resultierte in einem deutlich verstärkten TGF- β_1 Signal, repräsentiert durch eine stark vermehrte Phosphorylierung von Smad2. Zusätzlich zeichneten sich diese PASMC durch eine extreme übersteigerte zelluläre Antwort auf die Stimulation mit TGF- β_1 aus, angezeigt durch eine exzessive phospho-Smad2 Konzentration.

Diese Reduktion der *LMCD-1* Konzentration in PASMC *in vitro* führt zu Veränderungen des Phänotyps, wie sie auch bei PASMC isoliert aus IPAH und FPAH *in vivo* beobachtet werden konnten. Aus einer kritischen Reduktion der *BMPR2* Funktion in PAEC resultiert in einer gesteigerten Endothelzellen-Apoptose, beeinträchtigt die Integrität der Endothelbarriere und trägt zu der endothelialen Dysfunktion bei. Die Apoptose und Phagozytose apoptotischer Zellen ist begleitet von einer verstärkten Freisetzung von TGF- β (McDonald et al., 1999) und führt zu einer gesteigerten TGF- β Exposition, sowie in der Folge zu vermehrter Smad2 Phosphorylierung. Zusätzlich konnte eine gesteigerte Expression von phospho-Smad2, als Marker der TGF- β_1 /ALK5 Aktivität, in kleinen pulmonalen Arterien aus Patienten mit IPAH, als auch eine erhöhte Konzentration von TGF- β Isoformen in Lungen von IPAH Kranken, gemessen werden (Botney et al., 1994, Richter et al., 2004; Thomas et al. 2009). Darüber hinaus reagierten PASMC isoliert aus Patienten mit FPAH oder IPAH stimuliert mit TGF- β_1 , mit einem übersteigerten Wachstum auf die Stimulation und zeichneten sich durch eine wesentlich erhöhte Konzentration von phospho-Smad2 aus (Morrell et al., 2001), wie es im Rahmen dieser Arbeit bei einer Reduktion der *LMCD-1* Konzentration in PASMC beobachtet werden konnte.

Bespalova und Burmeister konnten bereits zeigen, dass die Expression von *LMCD-1* in vielen Geweben erfolgt, mit der größten Häufigkeit im Skelettmuskel. Auch in der fetalen Lunge und im geringeren Ausmaß im adulten Lungengewebe, sowie im adulten Myokard konnte *LMCD-1*-mRNA nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fehlt der Nachweis von *LMCD-1*-mRNA im adulten/fetalen ZNS,

peripheren Blut oder Thymus (Bespalova und Burmeister, 2000). Immunohistochemische Untersuchungen von Lungen- und Herzgewebe während der Reifung von Mäuseembryonen, zeigten in verschiedenen Stadien eine Expression von *LMCD-1*-Protein im distalen, nicht jedoch im proximalen, respiratorischen Epithel der Lunge, sowie im Myokard und PASMC (Rath et al., 2005). Die Verteilung von *LMCD-1*-Protein in der adulten humanen Lunge, sowie die Expression in der glatten Muskulatur der Tunica media pulmonaler Gefäße *in vivo* zu bestimmen, wurden humane Lungenschnitte von Donoren, sowie von Patienten mit PAH mittels immunohistochemischer Verfahren auf *LMCD-1*-Protein überprüft. *LMCD-1*-Protein zeigte hierbei eine starke Ko-Lokalisation mit α -SMA und konnte dadurch eindeutig in PASMC im Gesunden, als auch in der PAH identifiziert werden. Somit wird *LMCD-1* nicht nur in verschiedenen Stadien der Vaskulogenese in PASMC muriner Embryonen exprimiert, sondern auch in PASMC ausgereifter humaner Lungen, im Gesunden als auch in der PAH.

LMCD-1 wird von PASMC in Patienten mit PAH exprimiert und reguliert *in vitro* die TGF- β Signaltransduktion. Eine Reduktion von *LMCD-1* führt zu einer Verstärkung der TGFBR2/ALK5 vermittelten zellulären Antwort und somit zu einer gesteigerten Sensitivität auf TGF- β_1 , wie es in der IPAH und FPAH beobachtet werden konnte. Zur Überprüfung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Expressionslevel von *LMCD-1* und der übersteigerten Antwort auf TGF- β -Stimulation *in vivo* wurde die mRNA-Expression in PASMC isoliert aus PAH-Patienten mit quantitativer PCR analysiert und mit Donoren verglichen. Es konnten unterschiedliche Expressionslevel von *LMCD-1*-mRNA in der PAH und Donoren gemessen werden. So zeigten PASMC isoliert aus PAH eine geringere *LMCD-1*-Konzentration als Donor-PASMC, jedoch ohne eine statistisch signifikante Differenz der *LMCD-1*-Expression zwischen unstimulierten PASMC in PAH und Donor PASMC. Allerdings ist aufgrund einer verstärkten TGF- β Signaltransduktion in der PAH eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von *LMCD-1*, als ein TGF- β -Zielgen, zu erwarten, so dass ein unveränderter oder sogar erniedrigter *LMCD-1*-Level auf weitere Einflussfaktoren auf die Expression von *LMCD-1* hinweisen.

Neben der als regelhaft akzeptierten SMAD-abhängigen Signaltransduktion üben BMP und TGF- β ihre zelluläre Funktion über die mitogen-activated protein kinases (MAPKs), inklusive p38^{MAPK}, ERK1/2 und c-Jun-N-terminal kinase/stress-

activated protein kinase (JNK/SAPK) in verschiedenen Zelltypen Smad-unabhängig aus (Massague, 2003; Nohe et al., 2004). Smad-unabhängig beeinflussen MAPKs, so zum Beispiel über p38^{MAPK} und ERK, Zellwachstum und Apoptose von PASMC. Jedoch wurde gezeigt, dass MAPK- und Smad-Signalwege interagieren können und abhängig vom Zelltyp und gewebespezifischen Kontext die MAPK positiv oder negativ das Smad-Signal beeinflussen. Die Phosphorylierung von Smad1 durch MAPKs, den ERK1/2 verhindert die Translokation von Smad1 in den Nukleus und inhibiert das BMP-Signal (Morrell, 2006). Mutationen mit konsekutiv verringerter Smad1 Aktivität in den pulmonalen Gefäßen von FPAH und IPAH Patienten weisen auf einen defekten Smad-Signaltransduktionsweg und auf ein unopponiertes ERK/p38^{MAPK} Signal hin. Dies könnte zu der abnormalen PASMC Proliferation in PAH beitragen (Yang et al., 2005). Murine Epithelzellen zeigten eine Liganden unabhängige Aktivierung der p38^{MAPK}, mit gesteigerter Serum-induzierter Proliferation nach Transfektion mit einem mutierten *BMPR2* Konstrukt (Rudarakanchana et al., 2002). Luosujärvi et al. konnten *LMCD-1* als ein neues Zielgen der p38^{MAPK} kontrollierten Transkription identifizieren und die Induktion der Expression von *LMCD-1* in Kardiomyozyten, die mechanischem Stress ausgesetzt waren, zum Teil auf die Aktivierung der p38^{MAPK} vermittelten Signaltranskription zurückführen (Luosujärvi et al., 2010). Allerdings konnte keine konstitutive Aktivität der MAPK Signaltransduktionswege in PASMC isoliert aus Patienten mit FPAH oder in heterozygoten *BMPR2* Knockout-Mäusen nachgewiesen werden (Yang et al., 2005; Long et al., 2006). Auch konnte hier keine Induktion der *LMCD-1* Expression, im Sinne einer signifikant differierenden (gesteigerten) Konzentration in PASMC isoliert aus Patienten mit PAH im Vergleich zur Kontrollpopulation, festgestellt werden.

5.03 *LMCD-1* kontrolliert die TGF- β_1 induzierte Differenzierung von PASMC

Transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) ist einer der primären Differenzierungsfaktoren von glatten Muskelzellen (Owens, 1995). TGF- β_1 induziert die Expression verschiedener SMC Differenzierungsmarker, wie smooth muscle- α -actin (α -SMA, ACTA2), SM22 α (TAGLN), smooth muscle myosin heavy chain (SmMHC) und Calponin-1 (CNN1) *in vitro*.

LMCD-1 wird in die dritte Gruppe der LIM Domänen-Proteine eingeordnet und ist Teil einer Subfamilie, die an der Tumorsuppression, sowie an der Verbindung

zwischen Zell-ECM Adhäsionen und dem Aktin-Zytoskelett beteiligt ist (Zheng und Zhao, 2007). Durch den Einsatz spezifischer siRNA gegen die *LMCD-1*-Sequenz mit Verringerung der *LMCD-1*-Proteinkonzentration in PASMC, erfolgte hier der Nachweis, dass *LMCD-1* die Differenzierung von PASMC beeinflusst. Eine reduzierte Proteinkonzentration von *LMCD-1* führt insbesondere nach TGF- β_1 Stimulation zu einer deutlich gesteigerten Expression von Differenzierungsmarkern glatter Muskelzellen, wie α -SMA, dessen erhöhte Konzentration für alle an der PAH beteiligten Zellen charakteristisch ist (Yi et al., 2000).

Übereinstimmend konnte in PASMC eine vermehrte Expression der Differenzierungsmarker α -SMA und SM22 α nach TGF- β_1 Exposition nachgewiesen werden, allerdings ohne signifikante Induktion der Expression von SM22 α -mRNA. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei A10-Zellen bei Überexpression des Transkriptionsfaktors GATA6 gemacht werden und weist auf einen potentiellen gemeinsamen Mechanismus von GATA6 und TGF- β_1 in Bezug auf die Differenzierung glatter Muskelzellen hin. Obwohl die Konzentration von SM22 α -Protein nach GATA6 Überexpression in A10-Zellen gesteigert war, konnten keine direkten Effekte in diesen Zellen von GATA6 auf SM22 α -Promoter, im Gegensatz zum α -SMA-Promotor, beobachtet werden (Yin und Herring, 2005).

Als Transkriptions-Kofaktor reguliert *LMCD-1* negativ die Funktion von GATA-binding protein 6 (GATA6), aber auch von GATA-binding protein 1 und GATA-binding protein 4 (GATA1/GATA4) durch Inhibierung der Fähigkeit an die DNA zu binden. Dadurch wird die Aktivität der Transkription von Zielgenen verringert und gewebespezifisch die Genexpression in Lunge, Herz und von vaskulären glatten Muskelzellen reguliert (Rath et al., 2005). Differenzierte glatte Muskelzellen sind charakterisiert durch die Expression bestimmter Isoformen kontraktiler Proteine, wie zum Beispiel α -SMA, calponin (CNN1), SM22 α und smooth muscle myosin heavy chain (SmMHC). GATA-6 vermittelt die Transkription der Differenzierungsmarker über die Aktivierung durch Bindung von SmMHC und α -SMA Promotoren (Yin und Herring, 2005). Durch die Interaktion des Transkriptionsfaktors GATA6 mit seinem Transkriptions-Kofaktor *LMCD-1* wird durch Inhibierung der Fähigkeit von GATA6 an die DNA zu binden, die Konzentration der Differenzierungsmarker SmMHC und α -SMA reduziert (Rath et al., 2005). So

kontrolliert *LMCD-1* die Differenzierung verschiedener Zelltypen und wurde im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen (Rath et al., 2005).

Als Transkriptions-Kofaktor inhibiert *LMCD-1*, neben GATA1/6, durch Interaktion die Bindung von GATA4 an die DNA glatter Muskelzellen und reguliert über die GATA4-DNA-Bindungsaktivität die Proliferation von PASMC (Suzuki et al., 2003; Rath et al., 2005). Chronische Hypoxie führt, durch eine permanente Vasokonstriktion, zu der Entwicklung der pulmonalen Hypertonie, sowie zu einem strukturellen Umbau der pulmonalen Gefäße. Die Proliferation glatter Muskelzellen ist ein wichtiger Bestandteil der pulmonalen vaskulären Remodelierung, resultierend in einer gesteigerten Wandstärke der Tunica media mit einem erhöhten pulmonalen Widerstand. Verschiedene Mediatoren sind beteiligt an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie, darunter Serotonin (5-Hydroxytryptamin (5-HT)). Die mitogene Wirkung von Serotonin auf PASMC wird vermittelt via GATA4. So führt eine gesteigerte Expression von GATA4 zu einer vermehrten Cyclin-D2 Expression. Auch steigern PDGF und Endothelin-1, als bekannte Mitogene der PASMC, sowie TGF- β_1 , die Aktivität von GATA4, so dass GATA4, kontrolliert durch *LMCD-1*, als universeller Mediator des Zellwachstums in PASMC gesehen werden kann (Suzuki et al., 2003; Rath et al., 2005, Haveri et al., 2009).

Neben Interaktionen mit Mitgliedern der Gruppe der GATA Transkriptionsfaktoren, vermittelt *LMCD-1* *in vitro* und *in vivo* eine Aktivierung der Calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT) Signalkaskade in Herzmuskelzellen. Neonatale Kardiomyozyten isoliert aus Ratten zeigten in einem Modell der kardialen Hypertrophie, in dem diese biomechanischen Stress oder Phenylephrin ausgesetzt waren, eine erhöhte Expression an *LMCD-1* (Frank et al., 2010). Inhibition der *LMCD-1* Expression führte zu einer Unterbindung der Hypertrophiereaktion auf beide Stimuli und es resultierte bei adenoviraler Überexpression von *LMCD-1* *in vitro* eine gesteigerte Aktivierung des Calcineurin/NFATc4-Signaltransduktionsweges (Bian et al., 2010). Eine vermehrte Aktivierung des nuclear factor of activated T cells konnte auch in der IPAH nachgewiesen werden (Bonnet et al.; 2007). In PASMC isoliert aus IPAH Patienten lagen mehr als 60 % des NFATc2 aktiviert vor. NFATc4 konnte ebenfalls in PASMC identifiziert werden, lag allerdings in weniger als 5 % in der aktivierten Form vor. Die durch *LMCD-1* geförderte Aktivität von NFATc4, der die Hypertrophie von

Kardiomyozyten beeinflusst, ist in der IPAH im Gegensatz zu NFATc2 nicht gesteigert, so dass wahrscheinlich zum einen die Aktivierung von Calcineurin/NFAT in der IPAH nicht durch *LMCD-1* mitverursacht wird und zum anderen dies als Indiz für eine fehlende Adaption der *LMCD-1*-Expression in PASMC der PAH gewertet werden kann. Ob die fehlende Induktion der Expression von *LMCD-1* durch TGF- β_1 in der PAH eine Ursache für die unopponierte/übersteigerte TGF- β_1 Signaltransduktion ist bleibt allerdings offen und sollte in Zukunft Gegenstand von weiteren Untersuchungen sein.

5.04 TGF- β_1 und *LMCD-1* beeinflussen die Motilität von PASMC

Um den Einfluss von TGF- β_1 auf die Motilität glatter Muskelzellen pulmonaler Arterien zu untersuchen, wurden PASMC mit TGF- β_1 stimuliert und die Migration mittels scratch-migration-assay gemessen. PASMC stimuliert mit TGF- β_1 reagierten mit einer vermehrten Migration auf die Exposition. *LMCD-1* reguliert negativ die TGF- β Signaltransduktion, so auch die Migration. So konnte eine gesteigerte Motilität von PASMC beobachtet werden, in denen die Konzentration von *LMCD-1* durch siRNA vermindert wurde. Eine nicht adaptierte *LMCD-1*-Expression in der Pathogenese der PAH bei einer verstärkten TGF- β_1 /ALK5/Smad2 Signaltransduktion fördert möglicherweise eine vermehrte Migration der PASMC in die Intima und trägt dadurch zum erhöhten Gefäßwiderstand pulmonaler Arterien bei.

Die endotheliale Dysfunktion gilt als einer der zentralen Faktoren in der Entstehung der vaskulären Remodelierung in der Pathogenese der PAH und verändert das physiologische Verhältnis zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren, das zu einer unkontrollierten Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen und Fibroblasten der Adventitia führt (Leiper, 2005). Dieser Prozess ist sowohl verantwortlich für die Hypertrophie der Tunica media und adventitia, als auch für die Migration von glatten Muskelzellen in die Intima, die zu einem erhöhten vaskulären Widerstand der pulmonalen Zirkulation und Obstruktion des Lumens führt. Zusätzlich konnte in Studien gezeigt werden, dass die Entwicklung einer kontinuierlichen Lage glatter Muskelzellen in kleinen Arterien (Arteriolen), die normalerweise nur vereinzelte glatte Muskelzellen vorweisen (Tuder et al., 1994), auf eine Ausbreitung von PASMC in diese gering muskularisierten Gefäße zurückzuführen ist. Dieses lässt

eine Beteiligung von Mediatoren vermuten, die sowohl die Migration, als auch das Wachstum glatter Muskelzellen in der Pathogenese der PAH fördern.

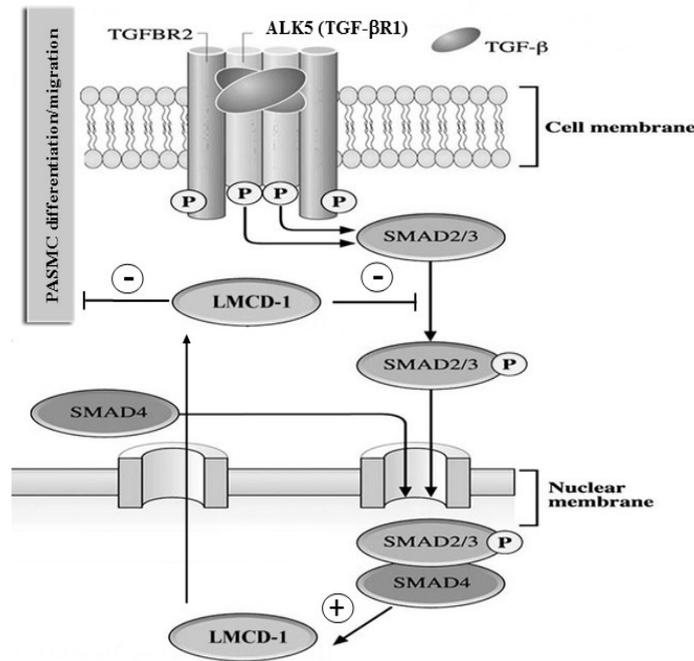


Abbildung 18: LMCD-1 in PASC. TGF- β_1 stimuliert die Expression von LMCD-1 in PASC. LMCD-1 reguliert negativ die TGF- β_1 Signaltransduktion und beeinflusst die Motilität und Differenzierung von PASC (nach Eickelberg und Morty, 2007).

Die gesteigerte TGF- β_1 Konzentration und die übermäßige Sensitivität von PASC auf TGF- β_1 Exposition in der PAH weisen auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen TGF- β_1 und der vermehrten Migration von PASC hin. In Studien mit vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) verschiedener Herkunft zeigte TGF- β_1 sowohl einen anti- als auch ein promigratorischen Einfluss. VSMC isoliert aus dem fetalen Ductus arteriosus, zu dessen Verschluss glatte Muskelzellen der Media in die Intima migrieren, ein Prozess, wie er auch in der PAH beobachtet werden kann, reagierten mit einer verminderten Migration auf Exposition mit TGF- β_1 (Tannenbaum et al., 1995). Im Gegensatz dazu stimulierte TGF- β_1 die VSMC Proliferation, ECM Synthese und Migration nach Verletzung der Integrität arterieller Gefäße (Khan et al., 2007). TGF- β_1 beeinflusst je nach dem gewebe-spezifischen Kontext die Migration von VSMC. Hier konnte gezeigt werden, dass primäre humane PASC *in vitro* mit einer vermehrten Migration auf TGF- β_1 Stimulation reagieren.

LMCD-1 beeinflusst negativ die Expression der Differenzierungsmarker α -SMA und SM22 α und trägt zu einer veränderten Zusammensetzung der Komponenten des Aktin-Zytoskelett bei, ein Prozess charakteristisch für die Migration. Auch verstärkt eine erniedrigte *LMCD-1* Konzentration die TGF- β_1 Signaltransduktion und fördert die pro-migratorische Wirkung von TGF- β_1 auf PASMC. Untersuchungen mit Scratch-migration Assay offenbarten, dass *LMCD-1* die Migration von PASMC negativ beeinflusst. Über welchen Mechanismus *LMCD-1* die Migration von PASMC kontrolliert ist bisher ungeklärt. Durch die in der PAH fehlende Induktion von *LMCD-1*, trotz erhöhter TGF- β_1 -Konzentration, wäre die Fahndung nach einem möglichen Zusammenhang zwischen der *BMPR2* und *LMCD-1* Expression und die Identifikation von Interaktionspartnern über die *LMCD-1* den TGF- β_1 Signaltransduktionsweg kontrolliert, ein Ansatz von zukünftigen Untersuchungen .

Die Migration glatter Muskelzellen geht einher mit Veränderungen im Aktin-Zytoskelett. So wird die Migration von PASMC, induziert durch Serotonin, begleitet von einem Rearrangement des Aktins, nicht aber von Veränderungen der Mikrotubuli. Eine dynamische Regulation des Aktin-Zytoskeletts durch verschiedene Faktoren ist von essentieller Bedeutung für die Motilität und Invasivität von Zellen. Zu Beginn dieses Prozesses depolymerisieren die Aktin-Stressfasern und kortikales Aktin repolymerisiert in Pseudopodien der Zelle (Day et al., 2006). Dabei sind eine Vielzahl von Mechanismen zur Depolymerisation des Aktins in der Zell-Motilität beschrieben, unter anderem auch MAPK-abhängige Prozesse (Day et al., 1999), über die auch TGF- β_1 Smad-unabhängig die Transkription von Zielgenen in PASMC steuern kann. Die Entwicklung der PAH ist assoziiert mit der aberranten Expression/Funktion des *BMPR2*, der sich von anderen Typ 2 Rezeptoren der TGF- β Superfamilie durch eine zusätzliche C-terminale Sequenz, folgend auf die intrazelluläre Kinasedomäne unterscheidet. 30% der in IPAH identifizierten *BMPR2* Mutationen sind im Exon 12 im Anschluß an die Kinasedomäne lokalisiert und zeichnen sich durch eine verkürzte zytoplasmatische C-terminale Sequenz mit veränderter Funktion aus. In Studien konnten zwei verschiedene Interaktionspartner dieser intrazellulären Domäne identifiziert werden, LIM Kinase 1 (LIMK1), ein LIM Domänen Protein, und Tctex-1 (Foletta et al., 2003; Machado et al. 2003). LIMK1 ist ein Regulatorprotein, das durch Inaktivierung von Cofilin Einfluss auf die Organisation der Aktinfilamente nimmt und via Cofilin/SSH1L Migration von vaskulären glatten Muskelzellen reguliert (San

Martin et al., 2008) und bietet über die Interaktion mit Bestandteilen der *BMPR2* Signalkaskade ein potentiellen Mechanismus über die *LMCD-1* zelluläre Prozesse in der Pathogenese der PAH beeinflussen könnte.

Zusammenfassung

Die pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH) ist eine seltene, aber durch die Entwicklung eines Cor pulmonale schwere Erkrankung mit häufig letalem Ausgang. Vasokonstriktion, Gefäßrarefizierung, Thrombosierung und struktureller Gefäßumbau sind die charakteristischen Merkmale der PAH und führen zu einem gesteigerten Lungengefäßwiderstand mit Erhöhung des pulmonal-arteriellen Drucks und daraus resultierender chronischer Belastung des rechten Ventrikels. Die vaskuläre Remodellierung mit Hypertrophie der Tunica media der kleinen pulmonalen Arterien in der PAH ist gekennzeichnet durch Proliferation, Migration und Veränderung des Phänotyps der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC). Die Identifikation von Mutationen im Gen für den bone morphogenetic protein receptor (*BMPR*)-2 in der familiären und idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH/FPAH), sowie in der Sequenz des activin receptor-like kinase (ALK)-1 Rezeptors Gens bei sekundären Formen der PAH weisen auf eine zentrale Funktion der TGF- β Superfamilie in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase und in der Pathogenese der PAH hin. Das Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der Funktion von *LMCD-1*, als ein neu identifiziertes TGF- β_1 Zielgen, in primären humanen PASMC mit Relevanz in der PAH, sowie die Untersuchung der *LMCD-1*-Expression in Patienten mit IPAH.

LIM and cysteine rich domains (*LMCD*)-1 ist ein LIM Domänen Protein und konnte als ein neues Zielgen der TGF- β_1 Signalkaskade identifiziert werden. TGF- β_1 fördert die Expression von *LMCD-1*-mRNA, als auch die Synthese von *LMCD-1*-Protein in humanen primären PASMC, gemessen mit quantitativer PCR und Western Blot. Weitere *in vitro* Experimente mit siRNA zeigten, dass *LMCD-1* Differenzierung und Migration von PASMC reguliert, angezeigt durch die Regulation von α -SMA, SM22 α und CNN1. Darüber hinaus demonstrierten weitere *in vitro* Experimente, dass *LMCD-1* die TGF- β_1 Signalkaskade in PASMC negativ reguliert. In humanen Lungenschnitten gesunder Donoren, sowie von Patienten mit PAH konnte *LMCD-1*-Protein mittels immunohistochemischer Verfahren eindeutig in PASMC im Gesunden, als auch in der PAH identifiziert werden.

Damit ist *LMCD-1* ein neues TGF- β_1 Zielgen in PASMC, das die Differenzierung und Migration, sowie die TGF- β_1 Signaltransduktion in PAH kontrolliert und potentiell zu den strukturellen Gefäßveränderungen der PAH beitragen könnte.

Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare but severe disease which can be lethal due to right heart hypertrophy leading to heart failure. Vasoconstriction, in situ thrombosis and vascular remodelling are typical features of PAH causing chronic elevation of the pulmonary arterial pressure and resistance. The process of remodelling, which is responsible for the obstruction of the vessel lumen and the elevated vascular resistance in the pulmonary circulation, is mainly characterised by excessive proliferation and migration of the pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). The identification of mutations in the gene coding for the bone morphogenetic protein receptor (*BMPR*)-2 in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH/FPAH), as well as in the activin receptor-like kinase (ALK)-1 receptor gene in secondary forms of PAH (SPA), suggest that the TGF- β superfamily is involved in the maintenance of the pulmonary vascular homeostasis and in the process of disease development. Therefore, the aim of this study was to elucidate the role of *LMCD-1*, a novel TGF- β_1 target gene, in PASMC with relevance to PAH, as well as to investigate its expression in IPAH patients.

LIM and cysteine rich domains (*LMCD*)-1 is a LIM domain protein, and a novel target gene of the TGF- β_1 signalling cascade in PASMC. TGF- β_1 induced the expression of *LMCD-1* at the mRNA and protein level in human primary PASMC, as shown by quantitative PCR and western blotting respectively. Furthermore, *in vitro* experiments using siRNA, demonstrated that *LMCD-1* regulates the differentiation and migration of PASMC by regulating the levels of α SMA, SM22 and CNN1. Further *in vitro* experiments revealed that *LMCD-1* can act as a negative regulator of the TGF- β_1 signalling in human primary PASMC. In addition, *LMCD-1* was clearly localised in PASMC in human lung sections of healthy donors and IPAH patients.

Taken together, *LMCD-1* is a novel TGF- β_1 target gene in PASMC that controls the differentiation and migration of PASMC, as well as the TGF- β_1 signalling and thus may contribute to the structural changes observed in the vessel wall in IPAH.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ACVR	activin A receptor type
ADMA	asymmetric dimethylarginine
AIDS	acquired immunodeficiency syndrom
ALK	activin receptor-like kinase
α -SMA	α -smooth muscle actin
BMP	bone morphogenetic protein
BMPR	bone morphogenetic protein receptor 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DANN
CI	cardiac index
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethyl sulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	epithelial-mesenchymal transition
EnMT	endothelial mesenchymal transition
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ET-1	Endothelin-1
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	foetal calf serum
FPAH	familiäre pulmonal-arterielle Hypertonie
GDF	growth differentiation factor
Hg	Quecksilber

5-HAT	5-Hydroxy-Tryptamin; Serotonin
5-HHT	Serotonin Transporter
HIV	human immunodeficiency virus
HMBS	humane hydroxymethylbilan synthase
HRS/HGS	hepatocyte growthfactor-regulated tyrosine kinase substrate
HRP	horseradish peroxidase
HZV	Herzzeitvolumens
IPAH	idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie
JNK	c-Jun-N-terminal kinase
kDa	kilo-Dalton
LAP	latency-associated peptide
LIMK-1	LIM Kinase 1
LLC	large latent complex
LMCD-1	LIM and cysteine rich domains 1
LTBP	latent TGF- β -binding proteins
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mg	Magnesium
MIF	mullerian inhibitory substance
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natrium-Chlorid
NLS	nuclear localisation signal
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAEC	pulmonal-arterielle Endothelzellen
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PAP	pulmonal-arterieller Druck
PASMC	pulmonary arterial smooth muscle cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PCWP	pulmonary capillary wedge pressure;

PDE	Phosphodiesterase
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM-1	platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PH	Pulmonale Hypertonie
PVR	Lungengefäßwiderstandes
RT	Reverse Transkriptase
SARA	Smad anchor for receptor activation
SBE	Smad binding elements
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SLC	small latent complex
SM	smooth muscle
SM22 α	Transgelin
Smad	SMA- and MAD-related proteins
SMC	smooth muscle cells
SM-MHC	smooth muscle-myosin heavy chain
SPAH	sekundäre pulmonal-arterielle Hypertonie
TBS	Tris buffered saline
TBST	Tris buffered saline tween
TGF- β	transforming growth factor- β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGF-R2	vascular endothelial growth factor receptor 2
VSMC	vascular smooth muscle cells
vWF	von Willebrand Faktor

Darstellungs-, Abbildungs-, Tabellenverzeichnis

Abbildung 01	Querschnitt durch eine Arterie der pulmonalen Strombahn.....	2
Abbildung 02	Kontraktile Elemente der glatten Muskelzelle.....	4
Abbildung 03	Einteilung der pulmonalen Hypertonie nach Schweregrad.....	7
Abbildung 04	Vaskuläre Remodelierung der pulmonalen Arterien bei IPAH.....	10
Abbildung 05	Zelluläre und molekulare Mechanismen der PAH.....	12
Abbildung 06	Das <i>BMPR2</i> Gen.....	15
Abbildung 07	Smad abhängige Signaltransduktion der TGF- β Superfamilie.....	18
Abbildung 08	Veränderte Homöostase des bone morphogenetic protein (BMP) receptor type 2 (<i>BMPR2</i>).....	22
Abbildung 09	Sequenzen der Forward- und Reverse Primer	30
Abbildung 10	TGF- β_1 abhängige <i>LMCD-1</i> Expression.....	37
Abbildung 11	Identifikation und Lokalisation von <i>LMCD-1</i> -Protein in humanen Lungengewebe von Donoren und IPAH Patienten.....	39
Abbildung 12	<i>LMCD-1</i> reguliert den TGF- β Signaltransduktionsweg.....	41
Abbildung 13	TGF- β_1 abhängige α -SMA und SM22 α Expression.....	42
Abbildung 14	<i>LMCD1</i> reguliert die TGF- β_1 abhängige Expression von α -SMA und Calponin 1.....	44
Abbildung 15	<i>LMCD-1</i> Expression von PASMC in PAH.....	45
Abbildung 16	TGF- β_1 induziert PASMC Migration und wird beeinflusst durch <i>LMCD-1</i>	46
Abbildung 17	Das <i>LMCD-1</i> Protein.....	50
Abbildung 18	<i>LMCD-1</i> in PASMC.....	58

Literaturverzeichnis

- Arciniegas E, Poce L, Hartt Y, Carlini R G (2000) Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat. Rec.* 258 (1) 47-57
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005) Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ. Res.*; 97; 512-523
- Atkinson C, Stewart S, Upton P D, Machado R, Thomson J R, Trembath R C, Morrell N W (2002) Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation*; 105:1672–1678
- Bach I (2000) The LIM Domain: Regulation by Association. *Mechanisms of Development* 91(1-2): 5-17
- Bespalova I N, Burmeister M (2000) Identification of a novel LIM Domain Gene, LMCD-1, and Chromosomal Localization in Human and Mouse. *Genomics* 63, 69 – 74
- Bian Z Y, Huang H, Jiang H, Shen D F, Yan L, Zhu L H, Wang L, Cao F, Liu C, Q Z Tang, Li H (2010) LIM and Cysteine-Rich Domains 1 Regulates Cardiac Hypertrophy by Targeting Calcineurin/Nuclear Factor of Activated T Cells Signaling. *Hypertension*; 55:00-00
- Bobik A (2006) Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(8): 1712-20
- Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer S L, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet S N, Michelakis E D (2007) The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *PNAS*, 104 (27) 11418-11423
- Botney M D, Bahadori L, Gold L I.(1994) Vascular remodelling in primary pulmonary hypertension: potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol*; 144:286–295
- Brenner B, Muskulatur, in Klinker R, Pape H C, Kurtz A, Silbernagl S, et al. (2010) *Physiologie*. 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, pp. 98-127
- Christman B W, McPherson C D, Newman J H, King G A, Bernard G R, Groves B M, Loyd J E (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and

- prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992;327:70–75
- D’Armiento J (2003) Decreased elastin in vessel walls puts the pressure on. *J Clin Invest.*; 112(9):1308
- Davies R J, Morrell N W (2008) Molecular Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension: Role of Mutations in the Bone Morphogenetic Protein Type II. *Chest* 134:1271 – 1277
- Dawid, I B, Breen J J, Toyama R (1998) LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.* 14, 156–162
- Day R M, Cioce V, Breckenridge D, Castagnino P, Bottaro D P (1999) Differential signaling by alternative HGF isoforms through c-Met: activation of both MAP kinase and PI 3-kinase pathways is insufficient for mitogenesis. *Oncogene*; 18: 3399–406
- Day R M, Agyeman A S, Segel M J, Chévere R D, Angelosanto J M, Suzuki Y J, Fanburg B L (2006) Serotonin induces pulmonary artery smooth muscle cell migration. *Biochem Pharmacol.*; 71(3): 386–397
- De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, Schwabe R F (2007) Gene Expression Profiles During Hepatic Stellate Cell Activation in Culture and In Vivo. *Gastroenterology*; 132: 1937 – 1946
- Deng Z, Morse J H, Slager S L, Cuervo N, Moore K J, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer S G, Barst R J, et al. (2000) Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet* ;67: 737-744
- Drenckhahn D, Blutgefäße, in: Benninghoff A, Drenckhahn D, et al (2008) *Anatomie, Band 1. 17. Auflage, Elsevier, München, pp. 72-97*
- Drenckhahn D, Muskelgewebe, in: Benninghoff A, Drenckhahn D, et al (2008) *Anatomie, Band 1. 17. Auflage, Elsevier, München, pp. 149-170*
- Dresdale D T, Schultz M, Michtom R J (1951) Primary pulmonary hypertension. I. Clinical and hemodynamic study. *Am J Med.*; 11(6):686-705
- Dresdale D T, Schultz M, Michtom R J (1954) Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. *Bull N Y Acad Med.*; 30(3): 195-207

- Drumm M L, Konstan M D, Schluchter M D, Handler A, Pace R, Zou F, et al. (2005) Gene Modifier Study Group. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med.*;353:1443-53
- Duncker H R, Kummer W, Atemsystem, in: Benninghoff A, Drenckhahn D, et al (2008) *Anatomie*, Band 1. 17. Auflage, Elsevier, München, pp. 533-580
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Chiba T, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K (2001) Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J Biol Chem* 276(16):12477-80
- Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Dartevielle P, Hamon M, Adnot S. (2001) Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*; 108:1141–1150
- Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A M, et al. (2006) Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*; 113:1857–1864
- Ehmke H, Das Kreislaufsystem, in Klinker R, Pape H C, Kurtz A, Silbernagl S, et al. (2010) *Physiologie*. 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, pp. 174-219
- Eickelberg O, Centrella M, Reiss M, Kashgarian M, Wells R G (2002) Inhibits TGF- β Signaling by Preventing Type I-Type II Receptor Complex Formation. *J Biol Chem*; 277(1):823-9
- Eickelberg O, Morty R E (2007) Transforming Growth Factor /Bone Morphogenic Protein Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension: Remodeling Revisited. *Trends Cardiovasc Med* 17 :263-269
- Eickelberg O, Seeger W (2005) Pulmonale Hypertonie. *Internist* 46:759-768
- Farber, H W, Loscalzo J (2004) Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 351(16): 1655-65
- Foletta V C, Lim M A, Soosairaiiah J, Kelly A P, Stanley E G, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O (2003) Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *The Journal of Cell Biology*, Volume 162, no 6, 1089–1098
- Frid M G, Shekhonin B V, Koteliansky V E, Glukhova M A (1992) Phenotypic changes of human smooth muscle cells during development: late expression of heavy caldesmon and calponin. *Dev Biol* ; 153:185-193

- Frid M G, Aldashev A A, Dempsey E C, Stenmark K R (1997) Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res*; 81: 940-952
- Frid M G, Dempsey E C, Durmowicz A G, Stenmark K R (1997) Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels: importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 17: 1203-1209
- Frid M G, Brunetti J A, Burke D L, et al. (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol*; 168: 659–669
- Freyd G, Kim S K, Horvitz H R (1990) Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*; 344 :876-9
- Ghofrani H A, Wilkins M W, Rich S (2008) Uncertainties in the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 118:1195-1201
- Goto D, Nakajima H, Mori Y, Kurasawa K, Kitamura N, Iwamoto I. (2001) Interaction between Smad anchor for receptor activation and Smad3 is not essential for TGF-beta/Smad3 mediated signalling. *Biochem Biophys Res Commun*; 281(5):1100-5
- Goumans M J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*; 21(7):1743-53
- Goumans M J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P (2003) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF- β /ALK5 signaling. *Mol Cell*; 12:817–828
- Gubb D, Green C, Huen D, Coulson D, Johnson D, Tree D, Collier S, Roote S (1999) The balance between isoforms of the Prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs. *Genes & Dev*. 13: 2315–2327
- Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, et al. (2005) Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation*;111:2812–2819
- Guignabert C, Izikki M, Tu L I, et al. (2006) Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res*; 98:1323–1330

- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A (1998) Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev*; 12(2):186-97
- Haveri H, Ashorn M, Iltanen S, Wilson D B, Andersson L C, Heikinheimo M (2009) Enhanced Expression of Transcription Factor GATA-4 in Inflammatory Bowel Disease and Its Possible Regulation by TGF- β 1. *J Clin Immunol* 29:444–453
- Herold G (2009) *Innere Medizin*; 378-381
- Hervé P, Launay J M, Scrobohaci M L et al. (1995) Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med.*; 99: 249-254
- Humbert M, Morrell N W, Archer SL, et al (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*; 43:13S-24S
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2004) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.*; 351(14):1425-36
- Hyduk A, Croft J B, Ayala C, Zheng K, Zheng Z J, Mensah G A (2005) Pulmonary hypertension surveillance: United States, 1980-2002. *MMWR Surveill Summ.*; 54:1–28.
- Itoh S, Thorikay M, Kowanetz M, Moustakas A, Itoh F, Heldin CH, ten Dijke P (2003) Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* 2003;278: 3751–3761
- Jurata L W, Gill G N (1998) Structure and function of LIM domains. *Curr Top Microbiol Immunol*; 228:75-113
- Kadrmas, J L, Beckerle M C (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 5, 920–931
- Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T (1990) Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344: 879-82
- Kavsak P, Rasmussen R K, Causing C G, Bonni S, Zhu H, Thomsen G H, JL (2000) Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell*; 6(6):1365-75
- Khan R, Agrotis A, Bobik A (2007) Understanding the role of transforming growth factor- β 1 in intimal thickening after vascular injury. *Cardiovasc. Res.*; 74: 223-234

- King J, Hamil T, Creighton J, Wu S, Bhat P, McDonald F, Stevens T (2004) Structural and functional characteristics of lung macro- and microvascular endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res*;67:139–151
- Kiyono M, Shibuya M (2006) Inhibitory Smad transcription factors protect arterial endothelial cells from apoptosis induced by BMP4. *Oncogene* 25:7131–7137
- Kozak L J, Owings M F, Hall M J (2005) National Hospital Discharge Survey: 2002 Annual Summary With Detailed Diagnosis and Procedure Data. *Vital Health Stat* 13; (158): 1-199.
- Lane K B, Machado RD, Pauciulo M W, Thomson J R, Philips J A, Loyd J E, Nichols W C, Trembath R C (2000) Heterozygous germ-line mutations in *BMPR2*, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*; 26: 81-84
- Lee S D, Shroyer K R, Markham N E, Cool C D, Voelkel N F, Tuder R M (1998) Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*; 101: 927-34.
- Lee S L, Wang W W, Moore B J, Fanburg B (1991) Dual effect of serotonin on growth of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture. *Circ Res*; 68: 1362-1368
- Leiper, J. M. (2005). The DDAH-ADMA-NOS pathway. *Ther. Drug Monit.*, 27, 744–746
- Le Roy C, Wrana JL (2005) Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*; 6(2): 112-26
- Liang C C, Park A Y, Guan J L (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.*; 2(2):329-33
- Long L, MacLean M R, Jeffery T K, Morecroft I, Yang X, Rudarakanchana N, Southwood M, James V, Trembath R C, Morrell N W (2006) Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in *BMPR2*- deficient mice. *Circ Res*; 98:818–82792
- Loyd J E, Primm R K, Newman J H (1984) Familial primary pulmonary hypertension: clinical patterns. *Am Rev Respir Dis.* 1984 Jan; 129(1):194-7.

- Luosujärvi H, Aro J, Tokola H, Leskinen H, Tenhunen O, Skoumal R, Szokodi I, Ruskoaho H, Rysä J (2010) A novel p38 MAPK target dyxin is rapidly induced by mechanical load in the heart. *Blood Press*; 19(1):54-63
- Machado R D, Rudarakanchana N, Atkinson C, Flanagan J A, Harrison R, Morrell N W, Trembath R C (2003) Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Human Molecular Genetics*; Vol. 12, no. 24, 3277–3286
- Machado R D, Aldred M A, James V, Harrison R E, Patel B, Schwalbe E C, Gruenig E, Janssen B R, Koehler R, Seeger W, et al (2006) Mutations of the TGF- β type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*; 27:121-132
- MacLean M R, Herve P, Eddahibi S, Adnot S (2000) 5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension. *Br J Pharmacol*; 131:161–168
- MacLean M R, Deuchar G A, Hicks M N, et al. (2004) Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*; 109:2150–2155
- Massague J (2003) Integration of Smad and MAPK pathways: a link and a linker revisited. *Genes Dev*; 17 (24): 2993-7
- McDonald P P, Fadok V A, Bratton D, Henson P M (1999) Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF- β in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol*;163:6164–6172
- Mecham R P, Whitehouse L A, Wrenn D S, Parks W C, Griffin G L, Senior R M, Crouch E C, Stenmark K R, Voelkel N F (1987) Smooth muscle-mediated connective tissue remodeling in pulmonary hypertension. *Science* ;237:423-426
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T (2005) BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*;16:251–263
- Morrell N W, Yang X, Upton P D, Jourdan K B, Morgan N, Sheares K K, Trembath R C (2001) Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic proteins. *Circulation*; 104:790–795

- Morrell N W (2006) Pulmonary Hypertension Due to BMPR2 Mutation; Proc Am Thorac Soc Vol 3: pp 680-686
- Morse J H, Jones A C, Barst R J, Hodge S E, Wilhelmsen K C, Nygaard T G (1997) Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus (PPH1) to chromosome 2q31-q32. Circulation; 95: 2603-2606
- Morty R E, Nejman B et al. (2007) Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(5): 1072-8
- Munger J S, Harpel J G, Gleizes P E, Mazziere R, Nunes I, Rifkin D B (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. Kidney Int; 51(5):1376-82
- Newman J H, Phillips III J A, Loyd J E (2008) Narrative Review: The Enigma of Pulmonary Arterial Hypertension: New Insights from Genetic Studies. Ann Intern Med 148 : 278 - 283
- Newman J H, Wheeler L, Lane K B, Loyd E, Gaddipati R, Phillips J A III, Loyd J E. (2001) Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. N Engl J Med; 345: 319-324
- Newman J H, Trembath R C, Morse J A, Grunig E, Loyd J E, Adnot S, Coccolo F, Ventura C, Phillips J A III. (2004) Genetic basis of pulmonary arterial hypertension: current understanding and future directions. J Am Coll Cardiol; 43: S33-S39
- Nichols W C, Koller D L, Slovis B, Foroud T, Terry V H, Arnold N D, Siemieniak D R, Wheeler L, Phillips J A, Newman J H, et al. (1997) Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. Nat Genet; 15: 277-280
- Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen N O (2004) Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. Cell Signal; 16 (3): 291-9
- Olschewski H, Rose F, Grüning E, Ghofrani H A, Walrmath D, Schulz R, Schermuly R, Grimminger F, Seeger W (2001) Cellular pathophysiology and therapy of pulmonary hypertension. J Lab Clin Med.; Volume 138, Number 6, 367-377
- Owens G K (1995) Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. Physiol Rev; 75: 487-517

- Owens G K, Kumar M S, Wamhoff B R (2004) Molecular Regulation of Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation in Development and Disease. *Physiol Rev*; 84: 767–801
- Penheiter S G, Mitchell H, Garamszegi N, Edens M, Dore J J Jr, Leof E B (2002) Internalization dependent and -independent requirements for transforming factor beta receptor signaling via the Smad pathway. *Mol Cell Biol.*; 22(13): 4750-9.
- Perrella M A, Edell E S, Krowka M J, Cortese D A, Burnett J C Jr. (1992) Endothelium-derived relaxing factor in pulmonary and renal circulations during hypoxia. *Am J Physiol* ;263:R45–R50
- Pietra G G, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins I M, Reid L M, Tuder R M (2004) Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.*; 43(12 Suppl S):25S-32S
- Poling J S, Prince M A, Stanton, K C, Cogan J D, Wheeler L, Loyd J E, et al. (2007) Functional TGF- β 1 polymorphism modulates clinical expression of BMPR2 mutations in familial pulmonary arterial hypertension (FPAH). *Proc Am Thorac Soc.* 2007; A557
- Rahimi R A, Leof E B (2007) TGF- β Signaling: A Tale of Two Responses. *J. Cell. Biochem.*; 102:593 – 608
- Rath N, Wang Z, Lu M M, Morrisey E E (2005) LMCD1/Dyxin Is a Novel Transcriptional Cofactor That Restricts GATA6 Function by Inhibiting DNA Binding. *Molecular and Cellular Biology*; p. 8864–8873 Vol. 25, No. 20
- Richter A, Yeager M E, Zaiman A, Cool CD, Voelkel N F, Tuder R M (2004) Impaired transforming growth factor- β signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*; 170:1340–1348
- Rose F, Grimminger F et al. (2002) Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of smooth muscle cells-Role of hypoxia inducible transcription factors. *FASEB J.* (12): 1660-1
- Rosenzweig B L, Imamura T, Okadome T, Cox G N, Yamashita H, ten Dijke P, Heldin C H, Miyazano K (1995) Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:7632–7636
- Ross S, Hill C S (2008) How The SMADs Regulate Transcription. *Int J Biochem Cell Biol.* 40(3):383-408
- Rubin I J (1997) Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.*; 336: 111-117

- Rudarakanchana N, Flanagan J A, Chen H, Upton P D, Machado R D, Patel D, Trembath R C, Morrell N W (2002) Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet*; 11: 1517-1525
- Sanchez O, Marcos E, Perros F, et al. (2007) Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*; 176:1041–1047
- San Martin A, Lee M Y, Williams H C, Mizuno K, Lassègue B, Griendling K K (2008) Dual Regulation of Cofilin Activity by LIM Kinase and Slingshot-1L Phosphatase Controls Platelet-Derived Growth Factor–Induced Migration of Human Aortic Smooth Muscle Cells. *Circ Res.*;102(4):432-8
- Schiebler T H, Schmidt W, et al. (2003) *Anatomie*. 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp 492-506
- Sharma S, Kashour T, Philipp R (2005) Secondary pulmonary arterial hypertension: treated with endothelin receptor blockade. *Tex Heart Inst J*. 32 (3):405-10
- Shi Y, Massague J (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700
- Shi W, Sun C, He B, Xiong W, Shi X, Yao D, Cao X (2004) GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol.*; (2): 291-3004
- Short M, Nemenoff R A, Zawada W M, Stenmark K R, Das M (2004) Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C416-C425
- Siegel P M, Massague J (2003) Cytostatic and Apoptotic Actions of TGF – β in Homeostasis and Cancer. *Nature Reviews Cancer* Vol 3: 807 – 820
- Stenmark K R, Davie N, Frid M, Gerasimovskaya E, Das M (2006) Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)*; 21:134-45
- Stenmark K R, Fagan K A, Frid M G (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*; 99: 675-691
- Stevens T (2005) Molecular and cellular determinants of lung endothelial cell heterogeneity. *Chest*;128(6, Suppl):558S–564S
- Stevens T, Phan S, Frid MG, Alvarez D, Herzog E, Stenmark KR (2008) Lung vascular cell heterogeneity: endothelium, smooth muscle, and fibroblasts. *Proc Am Thorac Soc.*; Vol. 5, pp 783-91

- Sun P D, Davies D R (1995) The Cystine-Knot Growth-Factor Superfamily. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure; Vol. 24, pp 269-292
- Suzuki Y J, Day R M, Tan C C, Sandven T H, Liang Q, Molkenin J D, Fanburg B L (2003) Activation of GATA-4 by Serotonin in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem.*; 278(19):17525-31
- Tannenbaum J E, Waleh N S, Mauray F, Breuss J, Pytela R, Kramer R H, Clyman R I (1995) Transforming growth factor beta 1 inhibits fetal lamb ductus arteriosus smooth muscle cell migration. *Pediatr Res.* 37 (5): 561-70
- Teichert-Kuliszewska K, Kutryk M J, Kuliszewski M A, et al. (2006) Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 98:209–217
- Thomas M, Docx C, Holmes A M, Beach S, Duggan N, England K, Leblanc C, Leuret C, Schindler F, Raza F, Walker C, Crosby A, Davies RJ, Morrell N W, DC Bud (2009) Activin-Like Kinase 5 (ALK5) Mediates Abnormal Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells from Patients with Familial Pulmonary Arterial Hypertension and Is Involved in the Progression of Experimental Pulmonary Arterial Hypertension Induced by Monocrotaline. *The American Journal of Pathology*, Vol. 174, No. 2
- Tuder R M, Groves B, Badesch D B, Voelkel N F (1994) Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.*;144:275-85.
- Tuder R M, Cool C D, Geraci M W, Wang J, Abman S H, Wright L, Badesch D B, Voelkel N F (1999) Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*; 159:1925-1932
- Tuder R M, Marecki J C, Richter A, et al. (2007) Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med.*; 28: 23-42
- Wagenvoort C A, Wagenvoort N (1970) Primary pulmonary hypertension: a pathologic study of the lung vessels in 156 clinically diagnosed cases. *Circulation* ;42: 1163-1184
- Way J C, Chalfie M (1988) *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*. *Cell*; 54 :5-16

- Yang X, Long L, Southwood M, et al. (2005) Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 96:1053–1063
- Yin F, Herring B P (2005) GATA-6 can act as a positive or negative regulator of smooth muscle-specific gene expression. *J Biol Chem.*;280(6):4745-52
- Yi E S, Kim H, Ahn H, Strother J, Morris T, Masliah E, et al. (2000) Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am J Respir Crit Care Med.*; 162: 1577-86
- Yin F, Herring B P (2005) GATA-6 Can Act as a Positive or Negative Regulator of Smooth Muscle-specific Gene Expression. *Journal Of Biological Chemistry Vol.* 280, No. 6, pp. 4745–4752
- Yurchenco, P D, Schittny J C (1990) Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 4, 1577–1590
- Zaiman A, Fijalkowska I, Hassoun P M, Tuder R M (2005) One hundred years of Research in the Pathogenesis of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 425-431
- Zakrzewicz A, Hecker M, Marsh L M, Kwapiszewska G, Nejman B, Long L, Seeger W, Schermuly R T, Morrell N W, Morty R E, Eickelberg O (2007) Receptor for activated C-kinase 1, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 115(23):2957-68
- Zheng Q, Zhao Y (2007) The Diverse Biofunctions of LIM Domain Proteins: Determinated by Subcellular Localization and Protein-Protein Interaction. *Biol. Cell*, Sep 99, 9489–502

Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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 an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Hannover 2012

Axel Hage