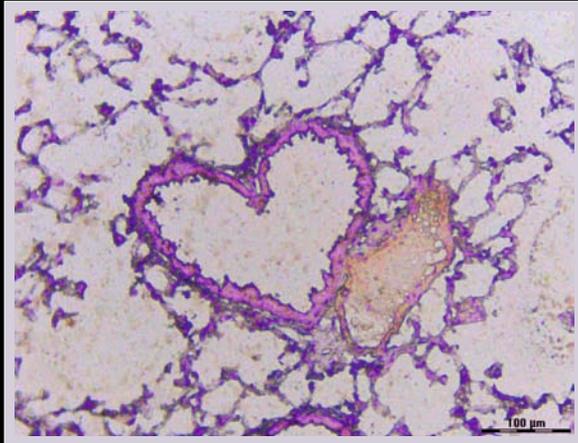


Die Rolle von TGFBR3 in der pulmonalen Gefäßentwicklung

Gero Nieß



INAUGURALDISSERTATION im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erlangung
des Grades Doktor der Naturwissenschaften - Dr. rer. nat. -



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung,
Bad Nauheim

Die Rolle von TGFBR3 in der pulmonalen Gefäßentwicklung

Inauguraldissertation

im Fachbereich Biologie und Chemie
an der Justus-Liebig-Universität Gießen
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Gero Nieß

aus Köln

Gießen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Holger Zorn

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Lakes-Harlan
Institut für Tierphysiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Werner Seeger
Medizinische Klinik und Poliklinik II
Justus-Liebig Universität Gießen

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2014

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	11
1.1 Lungenentwicklung	11
1.1.1 Die fünf Phasen der Lungenentwicklung.....	11
1.1.2 Gefäßwachstum	13
1.2 Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)	14
1.2.1 Definition.....	14
1.2.2 Die "alte" und "neue" Form der BPD	16
1.2.3 Epidemiologie.....	17
1.2.4 Beziehung zwischen Gefäßwachstum und Alveolarisierung.....	17
1.2.5 TGF- β -Rezeptoren-assoziierte Gefäßkrankheit	18
1.2.6 Die Rolle von TGF- β in BPD	18
1.2.7 Therapieansätze, die auf die Gefäßentwicklung abzielen	20
1.2.8 Tiermodelle der bronchopulmonalen Dysplasie	20
1.3 Signalweg des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- β	21
1.3.1 Die Liganden	21
1.3.2 Die Rezeptoren	21
1.3.2.1 Die Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren.....	21
1.3.2.2 Die akzessorischen-Typ-III-Rezeptoren.....	22
1.3.3 Die Smad-Proteine.....	23
1.3.4 Der TGF- β -Signalweg	24
2 Hypothese und Ziel dieser Studie	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Materialien.....	26
3.1.1 Geräte.....	26
3.1.2 Reagenzien.....	27
3.1.3 Zellkultur	29
3.1.3.1 Zelllinien	29
3.1.3.2 Primärzellen	29
3.1.4 Primer	30
3.1.5 Antikörper.....	31
3.1.6 <i>Small interfering RNA</i> (siRNA).....	32
3.2 Methoden.....	33
3.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	33
3.2.2 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	33
3.2.3 Mini- und Midi-Plasmidisolierung aus Bakterien.....	33
3.2.4 Klonierung der TGF- β -Rezeptoren in pIRES-hrGFPII.....	34
3.2.5 <i>Side-directed mutagenesis</i> (SDM).....	34

3.2.6	Klonierung von Plasmiden zur Erstellung von lentiviralen Partikeln	34
3.2.7	Generierung von lentiviralen Partikeln	35
3.2.8	<i>Microarray</i> -Studien	36
3.2.9	Kultivierung von humanen Zellen	36
3.2.10	Transfektion von Primärzellen mit siRNA	36
3.2.11	Transduktion von Primärzellen mit lentiviralen Partikeln	36
3.2.12	Genehmigung für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2	37
3.2.13	Proteinisolation	37
3.2.13.1	Proteinisolation aus Gewebe	37
3.2.13.2	Proteinisolation aus Zellen	37
3.2.13.3	Messung der Proteinkonzentration	38
3.2.14	Protein-Gelelektrophorese und Western Blot	38
3.2.15	RNA-Isolation	40
3.2.15.1	RNA-Isolation aus Gewebe	40
3.2.15.2	RNA-Isolation aus Zellen	40
3.2.15.3	Bestimmung der RNA-Konzentration	40
3.2.16	Reverse Transkription	40
3.2.17	Quantitative real-time RT PCR	41
3.2.18	Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen	41
3.2.19	Bestimmung der Migrationsrate von Zellen	42
3.2.20	Bestimmung der <i>in vitro</i> -Angiogeneserate von Endothelzellen	42
3.2.21	Lasermikrodissektion	43
3.2.21.1	RNA-Isolation nach Lasermikrodissektion	43
3.2.21.2	cDNA-Synthese nach Lasermikrodissektion	43
3.2.22	Tiermodell	43
3.2.22.1	Versuchstiere und Tierhaltung	43
3.2.22.2	Tierversuchsgenehmigung	44
3.2.22.3	Hyperoxie-Modell	44
3.2.22.4	Lungenentnahme	44
3.3	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Expressionsanalyse der TGF- β -Rezeptoren im Tiermodell der BPD	46
4.2	Überexpression der TGF- β -Rezeptoren in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen	47
4.3	<i>Knockdown</i> der TGF- β -Rezeptoren in HPASM-Zellen	49
4.4	<i>Tgfb3</i> -Expression im Mausmodell der BPD	50
4.5	<i>Tgfb3</i> -Expression in den pulmonalen Gefäßen der Maus im Tiermodell der BPD	51
4.6	Veränderte Zelleigenschaften von HPASM-Zellen nach <i>Knockdown</i> von TGFBR3	52
4.6.1	Erhöhte Proliferation von HPASM-Zellen	52
4.6.2	Erhöhte Migration von HPASM-Zellen	54
4.7	Einfluss von Hyperoxie auf die Zelleigenschaften von HPASM-Zellen	54
4.8	ERK1/2 Phosphorylierung nach TGFBR3 <i>Knockdown</i>	55

4.9	Identifikation von ADAMTS5 und ADAMTS9 als mögliche Kandidatengene durch eine <i>Microarray</i> -Analyse	56
4.10	Überexpression von TGFBR3 sowie einzelner Domänen.....	57
4.11	Veränderte Zelleigenschaften von humanen pulmonalarteriellen Endothel- (HPAE) Zellen.....	61
4.11.1	Knockdown von TGFBR3 in HPAE-Zellen	61
4.11.2	Erhöhte Proliferation von HPAE-Zellen.....	62
4.11.3	Reduzierte <i>in vitro</i> "Tube" Formierung von HPAE-Zellen.....	62
5	Diskussion.....	65
5.1	Dysregulation der TGF- β -Rezeptoren im Mausmodell der BPD.....	65
5.2	Veränderung der Zelleigenschaften humaner pulmonalen Blutgefäßzellen.....	68
5.3	Signaltransduktion von TGFBR3	70
5.4	Die Rolle von TGFBR3 in der pulmonalen Gefäßentwicklung	73
5.5	Ausblick.....	74
6	Zusammenfassung	76
7	Summary	78
8	Literaturverzeichnis	79
9	Danksagung.....	88
10	Abbildungsverzeichnis	89
11	Tabellenverzeichnis	91
12	Anhang.....	92
12.1	Vektorkarten der pIRES:GFP Konstrukte	92
12.2	Vektorkarten der pLENTI7.3/V5-DEST Konstrukte	93
12.3	Signifikant regulierte Gene im <i>cDNA-Microarray</i>	94
13	Lebenslauf	103
14	Eidesstattliche Versicherung	106

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro (10^{-6})
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ACVRL1	<i>activin receptor-like kinase 1</i>
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> - Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
ca	<i>constitutively active</i> - konstitutiv aktiv
cDNA	<i>complementary DNA</i> - komplementäre DNA
Ct	<i>cycle Threshold</i> - Schwellenzyklus
DGKJ	Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	<i>dominant negative</i> - dominant negativ
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> - Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECM	Extrazellulärmatrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENG	<i>Endoglin</i>

ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1 and 2</i> - Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase 1 und 2
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> - und andere
EV	<i>empty vector</i> - Kontrollvektor
FCS	<i>fetal calf serum</i> - Fetales Kälberserum
FiO ₂	<i>fraction of inspired oxygen</i> - Inspiratorische Sauerstofffraktion
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GNPI	Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HHT	Hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie
HPAEC	<i>human pulmonary artery endothelial cell</i> - Humane pulmonarterielle Endothelzellen
HPASMC	<i>human pulmonary artery smooth muscle cell</i> - Humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen
HYX	Hyperoxie
kDa	Kilodalton
Ki67	Antigen Ki67
LAP	Latenzassoziertes Peptid
LB	<i>lysogeny broth</i> - Nährmedium für Bakterien
LTBP	Latentes TGF-β-Bindungsprotein
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> - Mitogen aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
Min.	Minute

ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> RNA - Boten-RNA
n	Nummer an biologischen Replikaten
n.s.	Nicht signifikant
NCPAP	<i>nasal continuous positive airway pressure</i> - kontinuierliche nasale Druckbeatmung
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
nm	Nanometer
NOX	Normoxie
Opti-MEM	Serumreduziertes Medium
P	Postnataler Tag
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> - Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cellular nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - Polymerasekettenreaktion
PEN	Polyethylenphthalat
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
PMA	Postmenstruales Alter
PPV	<i>positive pressure ventilation</i> - Positive Druckbeatmung
PVR	Pulmonale vaskuläre Resistenz
RLT	RNA-Lysepuffer
RNA	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDM	<i>side-directed-mutagenesis</i> - Seitenspezifische Mutagenese

SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> - Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
siRNA	<i>small-interfering</i> RNA - kleine interferierende RNA
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TGFBR1	<i>transforming growth factor beta receptor 1</i>
TGFBR2	<i>transforming growth factor beta receptor 2</i>
TGFBR3	<i>transforming growth factor beta receptor 3</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> - transformierender Wachstumsfaktor beta
TSP	Thrombospondin
UpM	Umdrehungen pro Minute
UT	<i>untreated</i> - Unbehandelt
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
w/v	<i>weight per volume</i> - Gewicht pro Volumen
Δ	Delta, Differenz

1 Einleitung

1.1 Lungenentwicklung

Die Lunge entsteht als Ausstülpung des Vorderdarm-Endoderms. Diese endodermalen Knospen verzweigen und differenzieren sich innerhalb des umgebenden Mesoderm letztendlich zu den Atemwegen, den Blutgefäßen und den Alveolen der reifen Lunge. Die Morphogenese der Lungenverzweigung und die epitheliale Entwicklung sind bereits seit 50 Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen (1-5), doch Untersuchungen über die Mechanismen der pulmonalvaskulären Entwicklung sind relativ neu und bisher von begrenzter Tragweite. Dies ist überraschend, angesichts der zentralen Rolle die der Lungenkreislauf beim Gasaustausch in der Lunge spielt.

1.1.1 Die fünf Phasen der Lungenentwicklung

Die Lungenentwicklung wird klassischerweise in fünf Phasen aufgeteilt: die embryonale, die pseudoglanduläre, die kanalikuläre, die sakkuläre und die alveoläre Phase. Jedoch wird zurzeit diskutiert, ob die alveoläre Phase in zwei Phasen mit einer zusätzlichen sechsten Phase, der sog. mikrovaskulären Reifung, unterteilt werden sollte (6).

In Abbildung 1: sind die fünf Phasen der Lungenentwicklung grafisch, mit jeweils einer Zeitlinie für die Lungenentwicklung von Mensch und Maus, dargestellt. Bis auf zwei Ausnahmen ist die Lungenentwicklung von Mensch und Maus vergleichbar. Im Unterschied zur Maus teilt sich die Lunge des Menschen in fünf Lappen auf. Zwei Lungenlappen entstehen aus dem linken und drei Lungenlappen entstehen aus dem rechten primären Bronchus. Bei der Maus hingegen entsteht aus dem linken primären Bronchus nur ein Lungenlappen und aus dem rechten primären Bronchus entstehen vier Lungenlappen. Darüber hinaus unterscheiden sich die Lungenentwicklung von Mensch und Maus hinsichtlich ihrer zeitlichen Abläufe. Der Mensch wird in der alveolären Phase geboren, in der die Lungenentwicklung praktisch vollständig, bis auf einen Teil der Alveolarisierung und der mikrovaskulären Reifung, abgeschlossen ist. Die Maus hingegen wird in der sakkulären Phase, also im Vergleich zum Menschen in einer unreiferen Phase, geboren.

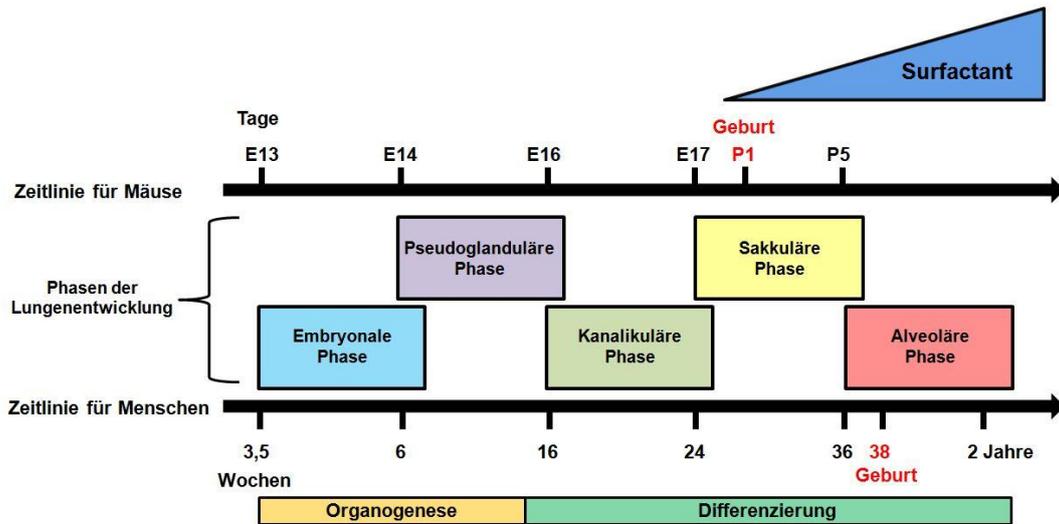


Abbildung 1: Zeitliche Abfolge der humanen und murinen Lungenentwicklung. Modifiziert nach (7).

Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der humanen und murinen Lungenentwicklung. Einteilung in fünf Phasen: Embryonale, pseudoglanduläre, kanalikuläre, sakkuläre und alveoläre Phase. Bei Mäusen erfolgt die Geburt nach 20 embryonalen Entwicklungstagen und der Tag der Geburt wird als P1 (rot) bezeichnet. Mäuse werden in der sakkulären Phase geboren. Beim Menschen erfolgt die Geburt in der 38. Woche (rot). Der Embryo befindet sich in der alveolären Phase.

Die embryonale Phase ist charakterisiert durch Formierung der Lungenknospen aus dem Vorderdarm-Endoderm, der Bildung der Trachea, der Aufteilung der primären Bronchi und den Hauptatemwegen, welche von undifferenziertem Epithel umgeben sind.

Die pseudoglanduläre Phase startet beim Menschen ca. in der fünften Woche der Gestation. Es kommt zur Vervollständigung der Atemwege bis zu den terminalen Bronchi und zur zellulären Differenzierung des proximalen und distalen Atemwegsepithel und des Mesenchyms.

In der kanalikulären Phase kommt es zum Wachstum des respiratorischen Epithels und der Entwicklung der respiratorischen Bronchiolen. Des Weiteren kommt es zu einem starken Wachstum des Kapillarbett in der distalen Lunge. Kommt es am Ende dieser Phase zu einer Frühgeburt, so ist ein Überleben des menschlichen Fötus möglich, da das notwendige respiratorische Epithel mit dem assoziiertem Kapillarbett vorhanden ist, was einen eingeschränkten Gasaustausch ermöglicht.

In der sakkulären Phase kommt es zu einer gleichzeitigen Expandierung der peripheren Lufträume und einer Reduzierung des umgebenden Mesenchyms. Des Weiteren treten vermehrt Clarazellen sowie Epithelzellen mit Zilien auf. Es kommt zur

Reifung von Typ-I- und Typ-II-Pneumozyten, das Interstitium wird dünner und die großen pulmonalen Gefäße muskularisieren.

In der letzten Phase der Lungenentwicklung, der alveolären Phase, führt die Ausbildung von sekundären Septen, die immer noch eine kapilläre Doppelschicht besitzen, zu einer weiteren Unterteilung der Alveolen und somit zu einer starken Vergrößerung der Gasaustauschfläche. Die mikrovaskuläre Reifung führt zu einem Verschmelzen der kapillaren Doppelschicht zu einem einschichtigem Netzwerk.

1.1.2 Gefäßwachstum

Die Mechanismen der Gefäßbildung in der sich entwickelnden Lunge erfordern die Koordinierung von mehreren Prozessen, die auch für alle Bereiche der embryonalen Herz-Kreislauf-Entwicklung zutreffen (8). Die Differenzierung von Endothel-Vorläuferzellen gefolgt von Migration und Kanalbildung (engl. tube formation) führt zur Ausbildung eines hochkomplexen und organisierten Gefäßnetzwerks. Es wird davon ausgegangen, dass bei diesem Prozess zwei Mechanismen zum Tragen kommen: Angiogenese, Sprossung und Verzweigung neuer Gefäße aus bereits bestehenden Gefäßen und Vaskulogenese, sowie die *de novo*-Organisation von Blutgefäßen durch Differenzierung von Endothelzellen aus dem Mesoderm (9-11).

1.2 Bronchopulmonale Dysplasie (BPD)

BPD wurde erstmals im Jahre 1967 von William Northway, einem Radiologen an der Universität von Stanford, als eine chronische Lungenkrankheit beschrieben, die bei Frühgeborenen auftrat, die eine intensive Sauerstofftherapie benötigten, um ein Atemnotsyndrom (RDS) zu überleben. William Northway war aufgefallen, dass sich die Röntgenaufnahmen der Brust dieser von Neugeborenen mit RDS unterschieden (12).

Im Detail beschrieb Northway das Fortschreiten der Krankheit in vier Stufen, die mit schweren chronischen Veränderungen endeten. Dazu gehörten: Respiratorische Insuffizienz, Hypoxämie und Hyperkapnie. Die Röntgenaufnahmen von Neugeborenen in der Stufe IV zeigten sowohl Lungenabschnitte mit einer erhöhten Dichte aufgrund von fibrotischen Veränderungen als auch Bereiche mit Hyperinflation. Die Entwicklung dieser Patienten wurde 14 - 23 Jahre weiter verfolgt, was aufzeigte, dass weiterhin eine signifikant erhöhte pulmonale Morbidität bestand (13).

In den späten 1970er Jahren wurde erkannt, dass eine großvolumige Ventilation zu Schädigungen führt, die eine BPD begünstigen. Es wurden daher Veränderungen bei der Therapie vorgenommen, die das Auftreten der klassischen Stufen einer BPD, wie sie von Northway beschrieben wurden, verringerten. Deswegen schlugen Wissenschaftler eine einheitliche Definition, basierend auf klinischen und radiografischen Charakteristika, vor.

1.2.1 Definition

Eine der ersten klinischen Definitionen für BPD wurde 1979 von Bancalari und Kollegen aufgestellt und besagte, dass es sich dann um BPD handele, wenn am Tag 28 der ersten 28 Lebenstage immer noch eine Sauerstofftherapie von Nöten ist, d. h. ein FiO_2 (*Fraction of inspired oxygen*) von $>0,21$ (entspricht einer Sauerstoffkonzentration von $>21\%$) vorliegt, zusammen mit einer bestätigenden Röntgenaufnahme der Brust (14). Bei dieser Definition wurden jedoch das Gewicht und das Gestationsalter bei der Geburt außer Acht gelassen. Die von Shennan und Kollegen eingeführte Definition für BPD bezieht sich auf das korrigierte Gestationsalter. Hier spricht man von einer BPD, wenn das Neugeborene zu dem korrigierten Gestationsalter von 36 Wochen (auch PMA = postmenstruales Alter genannt), also dem eigentlichen Geburtstermin, immer noch eine Sauerstofftherapie ($\text{FiO}_2 > 0,21$) be-

nötigt (15). Diese Definition wurde von Walsh um eine weitere Komponente erweitert. Er schlug vor, Patienten mit zusätzlichem O₂-Bedarf im postmenstrualem Alter von 36 Wochen einem Belastungstest zu unterziehen. Den Patienten wurde dabei die Sauerstoffunterstützung für eine halbe Stunde entzogen. So wurde eine BPD diagnostiziert bei Patienten, die in dieser Zeit bei Raumluft keine Sauerstoffsättigung von $\geq 90\%$ halten konnten (16).

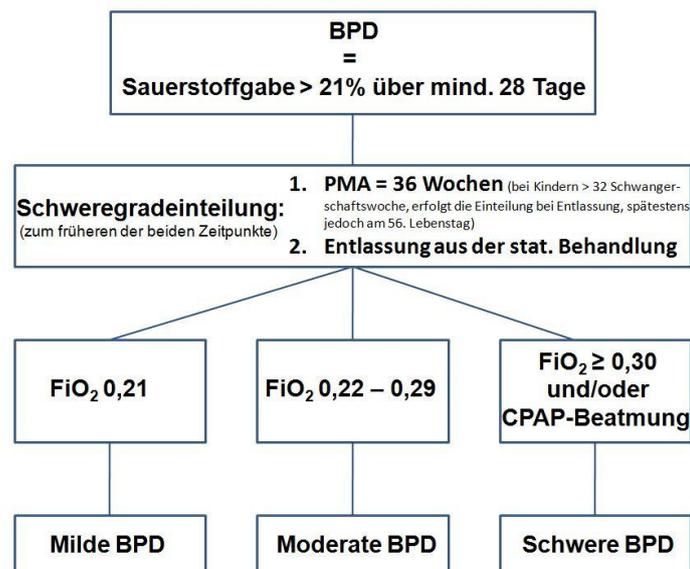


Abbildung 2: Definition der bronchopulmonalen Dysplasie nach dem NIH Konsens. Modifiziert nach (17).

Schematische Zusammenfassung der Definition von BPD. Die Einteilung der Patienten in die drei Kategorien (milde, moderate oder schwere BPD) beginnt für Kinder, die vor der 32. Woche geboren werden, in der 36. Woche postmenstruales Alters (PMA) und für Kinder, die nach der 32. Woche geboren werden, am Tag der Entlassung, spätestens jedoch am 56. Lebenstag.

Eine einheitliche Definition wurde erst 2001 bei einem Konsenstreffen des NIH (*National Institutes of Health*) festgelegt (17). Diese Definition ist in Abbildung 2 zusammengefasst. Eine BPD liegt vor, wenn eine Sauerstoffgabe über mindestens 28 Tage erfolgen muss. Danach wird eine Schweregradeinteilung, entsprechend dem Gestationsalter bei der Geburt des Patienten, vorgenommen. Bei Patienten die vor der 32. Woche geboren werden, erfolgt die Einteilung in der 36. Woche postmenstruales Alter (PMA) oder am Tag der Entlassung, je nachdem, was zuerst erfolgt. Bei Patienten die nach der 32. Woche geboren wurden, erfolgt die Einteilung am Tag der Entlassung, spätestens jedoch am 56. Lebenstag. Es handelt sich um eine milde Form der BPD, wenn der Patient nach der 36. Woche PMA bzw. bei der

Entlassung Raumlufte atmen kann. Wird hingegen bis zu <30 % Sauerstoff benötigt, handelt es sich um eine moderate Form der BPD. Werden höhere Sauerstoffkonzentrationen bzw. PPV (*positive pressure ventilation* - Positive Druckbeatmung) oder NCPAP (*nasal continuous positive airway pressure* - kontinuierliche nasale Druckbeatmung) benötigt, handelt es sich um eine schwere Form der BPD.

1.2.2 Die "alte" und "neue" Form der BPD

Die Frühgeborenen, die von Northway und Kollegen vor etwa 45 Jahren beschrieben wurden, kamen in einer späteren Phase der Lungenentwicklung zur Welt, als dies heute der Fall ist. Deren Lungenentwicklung befand sich bereits in der späten sakkulären bzw. frühen alveolären Phase, wenn sich die ersten Alveolen entwickeln. Die histologischen Befunde zeigten schwere Verletzungen an den großen Atemwegen und interstitielle Fibrose. Die Langzeitergebnisse dieser Patienten waren durch eine persistierende pulmonale Dysfunktion gekennzeichnet (13).

Tabelle 1: Vergleich zwischen der "alten" und "neuen" Form der BPD. Modifiziert nach (18).

	"alte" BPD	"neue" BPD
Charakterisiert durch:	Northway <i>et.al.</i>	Jobe und Bancalari
Gestationsalter:	32. Woche	24. - 26. Woche
Geburtsgewicht (Durchschnitt):	1900 g	600 g
Neugeborene mit Risiko:	Eher reifere	Extrem niedriges Gestationsalter
Verletzung der Atemwege:	Schwer	Mild bis keine
Fibrose:	Schwer	Minimal
Alveolen:	Gut entwickelt	Einheitlicher Arrest in der Entwicklung
Gründe:	Sauerstoffschädigung, mechanische Ventilation	Störung der Entwicklung

Diese Form der BPD wird heute als die "alte" Form bezeichnet, da diese durch den Fortschritt u.a. durch den Einsatz von Surfactant in der Neonataltherapie nicht mehr auftritt. Dieser Fortschritt führte jedoch dazu, dass nun Frühgeborene mit einem extrem niedrigen Gestationsalter überleben können, was wiederum aufgrund der zunehmenden Unreife der Lunge zu einer "neuen" Form der BPD führte. Diese ist durch einen einheitlichen Arrest in der Lungenentwicklung, mit weniger Alveolen und einer gestörten mikrovaskulären Entwicklung, charakterisiert. Des Weiteren

kommt es häufig zu einer Erhöhung der pulmonalen vaskulären Resistenz (PVR), was zu einer Ausbildung einer pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) führen kann (19). Die Atemwege zeigen nur wenig bis keine Verletzungen und eine Fibrose kann ebenfalls nicht detektiert werden (20, 21).

1.2.3 Epidemiologie

Trotz der Fortschritte in der Peri- und Neonatologie bleibt die BPD auch heute noch ein Hauptmorbidityfaktor im Rahmen der Frühgeburtlichkeit und eine der Hauptursachen für chronische Komplikationen bei den Überlebenden. Nach der Leitlinie der GNPI und der DGKJ (Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin und der Deutschen Gesellschaft für Kinderheilkunde und Jugendmedizin) ist die Inzidenz der BPD eng mit der Unreife der Frühgeborenen korreliert. Etwa 15 - 30 % der Frühgeborenen mit einem Geburtsgewicht <1000 g oder einer Schwangerschaftsdauer von <28 Wochen erkranken an einer BPD (22).

1.2.4 Beziehung zwischen Gefäßwachstum und Alveolarisierung

Dass ein gestörtes Gefäßwachstum eine wichtige Rolle, vor allem im Bezug auf eine PAH, bei der Pathogenese und dem klinischen Langzeitergebnis von BPD spielt, ist schon länger bekannt (23). Neuere Daten aus Tierversuchen und klinischen Studien deuten nun darauf hin, dass ein beeinträchtigt Gefäßwachstum auch zu Störungen der Lungenarchitektur, vor allem zu einer verringerte Alveolarisierung, führen kann (24, 25). Injiziert man neugeborenen Ratten für zwei Wochen täglich entweder Thalidomid oder Fumagillin, zwei antiangiogenetische Pharmazeutika, so führt dies im Vergleich zu Ratten, die mit einer Kontrollsubstanz behandelt wurden, wie erwartet zu einer Reduzierung der Gefäßdichte in der Lunge. Darüber hinaus zeigt sich jedoch auch, dass die Alveolarisierung und das Lungengewicht reduziert sind (25). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Angiogenese notwendig für die Alveolarisierung während der Lungenentwicklung ist und dass Mechanismen, die das Lungengefäßwachstum nach einer Frühgeburt hemmen, auch die alveoläre Entwicklung behindern. Ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Angiogenese während der Lungenentwicklung ist VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Es liegt daher nahe, dass VEGF über das Gefäßwachstum wichtigen Einfluss auf die Alveolarisierung während des frühen postnatalen Lebens nehmen kann. Wird eine einzelne Injektion des selektiven VEGF-Rezeptor-Inhibitors,

SU5416 bei neonatalen Ratten vorgenommen, so führt dies zu einer pulmonalen Hypertonie, einer reduzierten Gefäßdichte und zu einer reduzierten Alveolarisierung (26). Somit führt eine Hemmung des Lungengefäßwachstums während einer kritischen Phase des postnatalen Lungenwachstums zu einer Beeinträchtigung der Alveolarisierung, was auf einen Endothel-Epithel-*Crosstalk* hindeutet, der für eine normale Lungenentwicklung nach der Geburt entscheidend ist.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass insbesondere Endothelzellen anfällig für eine durch Hyperoxie oder Entzündung hervorgerufene Schädigung sind (27, 28). Auch die Mediaschicht der kleinen pulmonalen Arterien durchläuft eine drastische Veränderungen, einschließlich Proliferation von glatten Muskelzellen und Inkorporation von Fibroblasten bzw. Myofibroblasten in die Gefäßwand (29, 30). Diese strukturellen Veränderungen in den Lungengefäßen führen zu einer Erhöhung der PVR durch ein Verkleinern des Gefäßdurchschnitts und einer Erniedrigung der vaskulären *Compliance* (dt. Nachgiebigkeit). Zusätzlich zu diesen strukturellen Veränderungen zeichnet sich die pulmonale Zirkulation in BPD durch eine anomale Vasoreaktivität aus, welche ebenfalls zu einer Erhöhung der PVR führt (31, 32). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine frühe Schädigung der Lungenzirkulation zu einer rapiden Entwicklung einer PAH führt, welche signifikant zu der Morbidität und Mortalität in BPD beiträgt (33).

1.2.5 TGF- β -Rezeptoren-assoziierte Gefäßkrankheit

Im Menschen führen Mutationen in den TGF- β -Rezeptoren Endoglin (34) bzw. Acvrl1 (35) zu einer Gefäßkrankheit, die unter den Namen Morbus-Osler, Morbus-Osler-Weber-Rendu bzw. hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT) bekannt ist. HHT ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, bei der es zu einer krankhaften Weitung der Blutgefäße kommt. Dadurch bedingt kommt es zu Nasenbluten, Haut- oder Schleimhaut-Teleangiektasien und seltener zu arteriovenösen Missbildungen in Lunge, Leber oder Gehirn.

1.2.6 Die Rolle von TGF- β in BPD

Ergebnisse aus *in vitro* und *in vivo*-Studien legen nahe, dass Faktoren wie Unreife, Sauerstoffkonzentration, Sepsis oder ein ventilationsinduziertes Volumentrauma die Expression von Wachstumsfaktoren in der sich entwickelnden Lunge verändern

können. Ob die sichtbaren strukturellen Veränderungen in der Lunge von Patienten mit BPD durch eine veränderte Sekretion von Wachstumsfaktoren hervorgerufen wird, ist bisher jedoch nicht vollständig geklärt.

TGF- β nimmt jedoch eine wichtige Rolle bei der Lungenentwicklung ein. Bisher wurde dabei das Augenmerk auf die frühe Lungenentwicklung, die sogenannte Verzweigungsmorphogenese (engl. *branching morphogenesis*), gelegt. So ist bekannt, dass exogen hinzugefügtes TGF- β zu einer reduzierten Verzweigung der Luftwege führt (36) und eine Verminderung der Aktivität des TGF- β -Signalwegs zu einer vermehrten Verzweigung der Luftwege führt (37, 38).

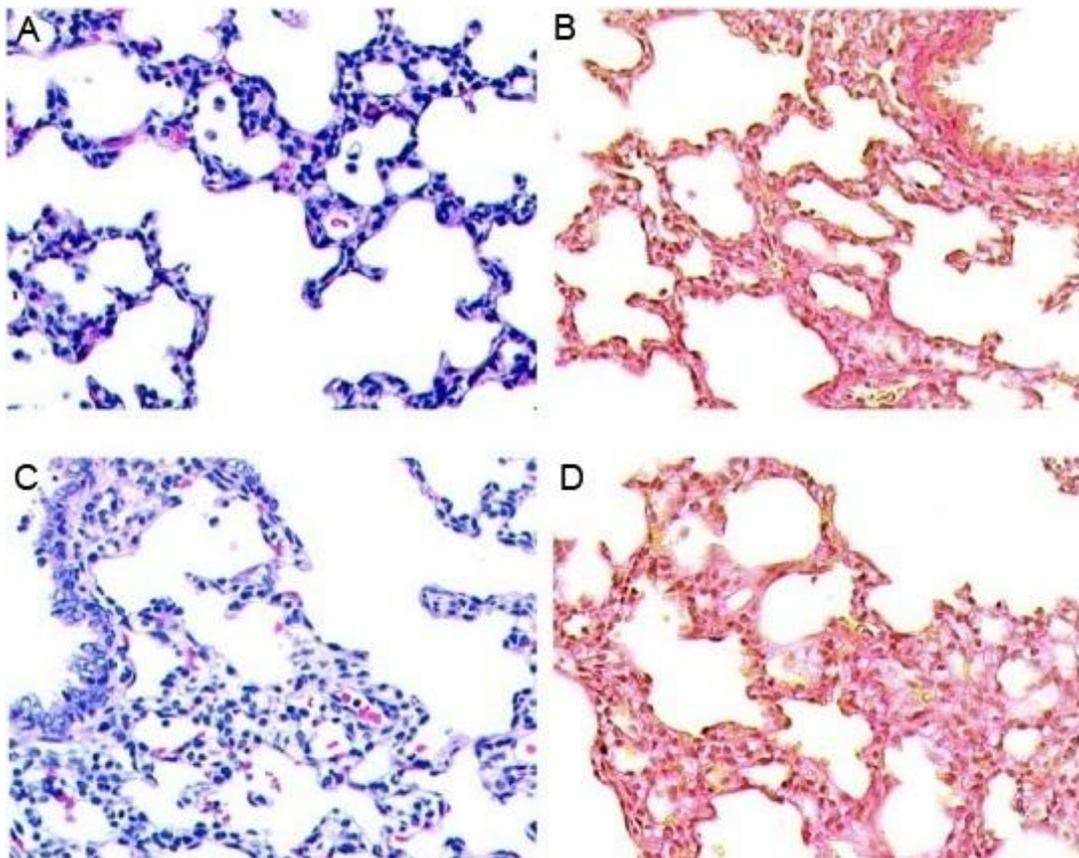


Abbildung 3: Histologie einer acht Tage alten Rattenlunge nach Überexpression von aktivem TGF- β 1. Modifiziert nach (39).

A und B: Lunge behandelt mit einem adenoviralen-Kontrollvektor AdDL70-3. **C und D:** Lunge die aktives TGF- β 1 überexprimiert. **A und C** wurden mit H&E gefärbt. **C und D** wurden mit Picosirius Red gefärbt. Original Vergrößerung, $\times 200$.

BPD ist jedoch eine Krankheit, bei der die späte Lungenentwicklung gestört ist. Der TGF- β Signalweg nimmt auch in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle ein, die bisher jedoch nicht in der gleichen Intensität beleuchtet wurde wie die Rolle während der frühen Lungenentwicklung. Dennoch ist bekannt, dass eine exzessive Aktivierung des TGF- β -Signalwegs zu einer Inhibierung der sekundären Septierung

und damit zu einem BPD-ähnlichen Phänotyp führt (39, 40). Im Jahr 2003 konnte dies von der Arbeitsgruppe um Jack Gaudie gezeigt werden, als sie Ratten einen Tag nach der Geburt für die nächsten sieben Tage intranasal einen Adenovirus verabreichten. Der Adenovirus führte dazu, dass TGF- β 1 in der Lunge überexprimiert wurde. Die histologische Analyse der Rattenlungen zeigte, dass die Überexpression von TGF- β 1 zu einem Arrest der sekundären Septierung im Vergleich zu Rattenlungen, die mit einem Kontrollvirus behandelt wurden, führte.

Des Weiteren zeigen neonatale Ratten, die 100 % Sauerstoff ausgesetzt werden, eine erhöhte Expression von Tgfbr1 und Tgfbr2 (41). Ebenso zeigen neonatale Mäuse, die 85 % Sauerstoff ausgesetzt werden, eine erhöhte Expression von TGF- β , Tgfbr2 und Acvrl1 (40, 42).

1.2.7 Therapieansätze, die auf die Gefäßentwicklung abzielen

Das Konzept, dass ein gestörtes Gefäßwachstum zu einer verminderten Alveolarisierung in BPD führt (43), hat dazu geführt, dass versucht wurde, die in BPD reduzierte VEGF-Expression als mögliche Therapie von BPD anzuheben. Dies wurde durch Manipulation von stromaufwärts (engl. *upstream*) liegenden Regulatoren, wie z.B. von HIF-1 α (44) bzw. von stromabwärts (engl. *downstream*) liegenden Mediatoren, wie z.B. von Stickstoffmonoxid (NO) (45), erreicht. Werden Ratten für 14 Tage bei 75 % Sauerstoff (Hyperoxie) gehalten, um einen BPD-ähnlichen Phänotyp auszubilden, und dann während einer 7 tägigen Erholungsphase bei Raumluft mit humanem rekombinaten VEGF behandelt, so zeigt sich, dass im Vergleich zu unbehandelten, die VEGF behandelten Tiere eine verbesserte Lungenstruktur und Alveolarisierung sowie eine erhöhte Gefäßdichte aufweisen (46). Wird VEGF jedoch während der 14 tägigen Hyperoxie-Haltung angewandt, so führt dies zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität und zu einem Lungenödem (47, 48).

1.2.8 Tiermodelle der bronchopulmonalen Dysplasie

Bei der wissenschaftlichen Analyse der bronchopulmonalen Dysplasie spielen Tiermodelle eine wichtige Rolle, insbesondere da humanes Versuchsmaterial nur in begrenztem Maß zur Verfügung steht. Am Verbreitetsten sind die Hyperoxie-Tiermodelle bei Mäusen und Ratten. Bereits 1975 beschrieben Northway *et al.* die Effekte von 100 % Sauerstoff auf die Lungenentwicklung von Mäusen (49).

1.3 Signalweg des transformierenden Wachstumsfaktors (TGF)- β

Der TGF- β Signalweg ist an vielen zellulärer Prozessen sowohl im adulten Organismus als auch im sich entwickelnden Embryo beteiligt. Dies schließt Zellwachstum, Differenzierung, Apoptose, zelluläre Homöostase und anderen zelluläre Funktionen ein.

1.3.1 Die Liganden

Die in Säugetieren sezernierten Proteine der TGF- β -Familie bestehen aus den drei Isoformen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 (50, 51).

TGF- β ist ein homodimeres Polypeptid, dass als latenter Komplex synthetisiert und in der Extrazellulärmatrix (ECM) gespeichert wird (52). Dieser Komplex besteht aus dem reifen, dimeren TGF- β , dem nicht kovalent gebundenen Latenz-assoziierten Peptid (LAP) sowie dem an dieses Peptid gebundenen latenten TGF- β -Bindungsprotein (LTBP) (53). Zur Aktivierung kann das reife TGF- β entweder aus der latenten Form von Proteasen abgespalten werden, oder es erfolgt eine nicht proteolytische Dissoziation vom Latenz-assoziierten Peptid (54).

Die sogenannte TGF- β -Superfamilie von Wachstumsfaktoren umfasst jedoch mehr als 40 Mitglieder. Darunter finden sich Inhibin, Aktivin, das Anti-Müllersche Hormon, die knochenmorphogenetische Proteine (*bone morphogenic proteins*, BMPs), Decapentaplegic und Vg-1.

1.3.2 Die Rezeptoren

1.3.2.1 Die Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren

Die TGF- β -Superfamilie von Rezeptoren umfasst zwei Gruppen von Transmembran-Serin-Threonin-Kinase-Rezeptoren, die sogenanntenn Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren, die durch Liganden der TGF- β -Superfamilie aktiviert werden können. Diese beiden Rezeptorklassen haben eine kurze cysteinreiche extrazelluläre Domäne, die über N-Glykolsilierung modifiziert werden kann, eine einzelne Transmembrandomäne und eine Intrazellulardomäne, die von der Kinasedomäne dominiert wird. Die Typ-I und Typ-II-Rezeptoren können jedoch strukturell an einer Glycin-Serin-Wiederholung (GS-Domäne) unterschieden werden, die die Typ-I-

Rezeptoren in der Nähe der zytosolischen Kinasedomäne tragen (55). Die Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren kommen als Homodimere vor, können jedoch in Anwesenheit von Liganden Heterodimere ausbilden (56).

1.3.2.2 Die akzessorischen-Typ-III-Rezeptoren

Es gibt zwei akzessorische Typ-III-Rezeptoren: TGF- β -Rezeptor III (TGFBR3, auch Betaglykan genannt) und Endoglin.

TGFBR3 ist ein in der Zellmembran verankertes Proteoglykan, das alle drei TGF- β Isoformen binden kann. Es wurde gezeigt, dass TGFBR3 die Bindung von TGF- β 2 an TGFBR2 vermittelt (57). TGFBR3 ist strukturell verwandt mit Endoglin und besitzt eine große extrazelluläre Domäne, die durch Heparin- und Chondroitin-Glykosaminoglykane modifiziert werden kann (58). Darauf folgt eine einzelne Transmembrandomäne und eine kurze zytosolische Domäne, die Endozytose regulieren kann (59). TGFBR3 kann über mehrere extrazelluläre Domänen TGF- β binden. Die Bindung erfolgt entweder über die sogenannte Endoglin-*like* Domäne in der aminoterminalen Hälfte (60) oder über die in der carboxyterminalen Hälfte lokalisierte Uromodulin-Domäne (61). Daher scheinen die Glykosaminoglykane bei der Bindung von TGF- β nicht beteiligt zu sein, dennoch wurde gezeigt, dass hochmolekulare Glykosaminoglykanketten die Assoziation zwischen Typ-I und Typ-II-Rezeptoren verhindern und so den TGF- β -Signalweg inhibieren können (62). Die gesamte extrazelluläre Domäne kann auch von der Zellmembran freigesetzt werden, was zu der sogenannten "löslichen" Form von TGFBR3 führt. Das "lösliche" TGFBR3 kann TGF- β binden und so dessen Wirkung reduzieren (58). Während der Entwicklung des Herzens ist TGFBR3 notwendig für die Transformation von endothelialen Vorläuferzellen in endokardiale Zellen (63). Ein globaler *Knockout* von TGFBR3 in der Maus führt zu Defekten am Herz und der Leber (64).

Endoglin ist ein über Disulfidbrücken verbundenes homodimeres Glykoprotein, mit einer hohen Ähnlichkeit zu TGFBR3 in der transmembran- und zytosolischen Domäne (65). Im Gegensatz zu TGFBR3, das alle drei Isoformen der TGF- β -Liganden binden kann, bindet Endoglin lediglich TGF- β 1 und TGF- β 3 (66). Neuere Studien besagen jedoch, dass Endoglin alleine keinen TGF- β Liganden binden kann und dazu die Präsenz der Signalrezeptoren TGFBR1 oder TGFBR2 benötigt (67). Es gibt zwei *splice* Isoformen von Endoglin: Eine lange (L-) und eine kurze (S-) Form, wobei die lange (L-) Form häufiger exprimiert wird als die kurze (S-) Form

(68). Endoglin wird besonders von Endothelzellen exprimiert. Zudem gibt es Hinweise, dass Endoglin entscheidend an der kardiovaskulären Entwicklung beteiligt ist. So führt eine genetische Inaktivierung von Endoglin in der Maus zu einem Absterben des Embryos zwischen dem embryonalen Tag 10 und 11,5 aufgrund von kardiovaskulären Anomalitäten (69). Im Menschen führt eine Mutation von Endoglin zu einer Gefäßkrankheit, die unter dem Namen Morbus Osler bekannt ist und bereits unter Punkt 1.2.5 näher besprochen wurde (34).

1.3.3 Die Smad-Proteine

Die wichtigsten intrazellulären Signalgeber der Typ I-Rezeptor-Kinasen sind die sogenannten Smad-Proteine. Der Name Smad stammt aus der Fusion des in *Drosophila* gefundenen Proteins Mad (*mothers against decapentaplegic*) und der in *C. elegans* entdeckten Sma-2, Sma-3 und Sma-4 Proteine, welche Ähnlichkeiten zu Mad aufwiesen (70-72).

Das Säugetiergenom beinhaltet acht Mitglieder der Smad-Familie, die wie folgt eingeteilt werden können:

- 1) Die Rezeptor-aktivierten Smads (R-Smads): Sie sind direkte Substrate der TGF- β Familie von Rezeptorkinasen. Sie können weiter unterteilt werden in
 - a. BMP-Smads: Werden im BMP-Signalweg durch Phosphorylierung von BMP Typ I Rezeptoren, aktiviert. (Smad1, Smad5 und Smad8)
 - b. TGF- β /activin-Smads: Werden im TGF- β -Signalweg durch Phosphorylierung von TGF- β Typ I Rezeptoren aktiviert (Smad2 und Smad3)
- 2) Die gemeinsamen "common" Smads (Co-Smads): Sie interagieren zusammen mit den Rezeptor-aktivierten Smads (Smad4)
- 3) Die inhibitorischen Smads (I-Smads): Die I-Smads (Smad6 und Smad7) konkurrieren mit Smad4 und führen zu einer Hemmung der Signaltransduktion.

1.3.4 Der TGF- β -Signalweg

Die TGF- β -Signalkaskade startet mit der Bindung eines TGF- β Liganden an den Typ-II-Rezeptor Tgfr2. Diese Bindung kann durch einen Typ III Rezeptor (Tgfr3 oder Endoglin) verstärkt werden. Bei dem Typ-II-Rezeptor Tgfr2 handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die nach Ligandenbindung autophosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Danach kommt es zur Ausbildung eines heterotetrameri-schen Komplexes mit einem Typ-I-Rezeptor (Acvr11 oder Tgfr1). Der Typ I Rezeptor wird dabei von dem Typ-II-Rezeptor in seiner GS-Domäne phosphoryliert und damit ebenfalls aktiviert.

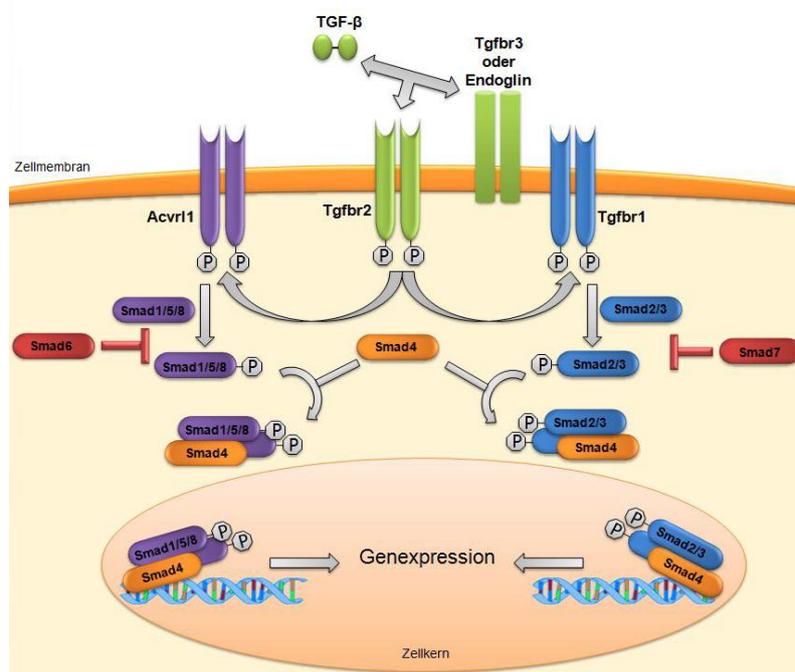


Abbildung 4: Schematische Darstellung des TGF- β Signalwegs.

Der TGF- β -Ligand bindet an den TGF- β Rezeptor Tgfr2. Dadurch kommt es zur Aktivierung und Autophosphorylierung dieses Rezeptors. Tgfr2 bindet daraufhin entweder Acvr11 oder Tgfr1, worauf es zur Aktivierung und Phosphorylierung dieser Rezeptoren kommt. Die entstandenen Rezeptorkomplexe aktivieren nachfolgend die Smad Proteine, die in den Zellkern transloziert werden und dort die Genexpression verändern können.

Der aktive Typ-I-Rezeptor erkennt die Rezeptor-spezifischen Smad (R-Smads) Proteine und bewirkt ihre Phosphorylierung. Durch die Phosphorylierung bilden die R-Smad-Proteine einen heteromeren Komplex, mit dem sogenannten "gemeinsamen" (engl. "common", oder Co-Smad) Smad4 aus. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern, wo er weitere DNA Bindeproteine rekrutiert, an die DNA bindet und schließlich die Genexpression steuert (Abbildung 4: Schematische Darstellung des TGF- β Signalweg) (73, 74).

2 Hypothese und Ziel dieser Studie

Eine gestörte Entwicklung der pulmonaren Gefäße nimmt eine Schlüsselrolle bei verschiedenen Krankheiten von Neugeborenen Kindern ein, die sich in stationärer Behandlung befinden. Darunter finden sich unter anderem die kogenitale alveolar-kapilläre Dysplasie, die angeborene Zwerchfellhernie sowie die bronchopulmonale Dysplasie (BPD). Da der TGF- β -Superfamilie eine wichtige Rolle in Organogenese sowie Zell- und Gewebedifferenzierung zugeschrieben wird, wurde für dieses Projekt die Hypothese aufgestellt, dass *die fehlgeleitete TGF- β Signaltransduktion ein beeinträchtigt es pulmonares Gefäßwachstum, wie es in Patienten mit BPD beobachtet wird, mitverursacht*. Diese Krankheit wurde im Hinblick auf die folgenden drei Ziele näher untersucht:

1. Bewertung der Expressionslevel der TGF- β Signaltransduktionsmaschinerie in experimenteller BPD
2. *In-vitro* Charakterisierung des Einflusses verschiedener ausgewählter TGF- β -Rezeptoren auf die Eigenschaften von glatten pulmonararteriellen Muskelzellen.
3. Identifizierung der molekularen Mechanismen, die die Eigenschaften von glatten pulmonararteriellen Muskelzellen beeinflussen können.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav	Systec, Deutschland
Elektrophorese-Kammern	Bio-Rad, USA
Inkubator für Bakterienkulturen	Heraeus, Deutschland
Kühlfähige Minizentrifuge CT15RE	VWR, USA
Laminar Flow Werkbank	Thermo Scientific, USA
Membraneinsätze	BD Falcon™, USA
MicroAmp® FAST 96-Well Platte	Applied Biosystems, USA
Microzentrifuge	VWR, USA
NanoDrop® ND 1000	Peqlab, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Bio-Rad, USA
PCR Maschine: peqSTAR	Peqlab, Deutschland
Petrischalen	Eppendorf, Deutschland
Pipetierhilfe: <i>Pipetboy</i>	Eppendorf, Deutschland
Precellys® 24 Homogenisator	Peqlab, Deutschland
Reaktionsgefäße: 0,5, 1,5, 2 ml	Eppendorf, Deutschland
Serologische Pipetten	Falcon, USA
StepOnePlus™ Real-Time PCR	Applied Biosystems, USA
Transferkammern: Mini Trans-Blot®	Bio-Rad, USA
VersaMax Mikroplattenleser	Molecular Devices, USA
Vortex-Mixer	VWR, USA
Zellkultur-Flasche (250 ml)	Greiner Bio-One, Deutschland

Zellkulturinkubator HERAcell 150i	Thermo Scientific, USA
Zellkultur-Platten (6-, 24- und 96- <i>Well</i>)	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellkultur-Schale (100 mm)	Greiner Bio-One, Deutschland
Zellzähler, Countess®	Invitrogen, Großbritannien

3.1.2 Reagenzien

Acrylamid-Lösung, Rotiphorese Gel 30	Roth, Deutschland
Agarose	Promega, USA
Agarose, <i>low melting point</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Promega, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bovine serum albumin	Sigma-Aldrich, Deutschland
Bromophenol blau	Sigma-Aldrich, Deutschland
Complete™ Proteaseinhibitor	Roche, Deutschland
DNA Marker (1 kb)	Promega, USA
DNase I	Serva, Deutschland
DTT	Promega, USA
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> 10×	PAA Laboratories, Österreich
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> 1×	PAA Laboratories, Österreich
Ethylendinitrilo- <i>N,N,N',N'</i> -tetra- acetic-acid (EDTA)	Promega, USA
Ethanol absolut	Riedel-de Haën, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Deutschland

Gel extraction kit	Qiagen, Deutschland
Glycin	Roth, Deutschland
Glycerol	Roth, Deutschland
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Großbritannien
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Deutschland
β-mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deutschland
Methanol	Fluka, Deutschland
MuLV reverse Transkriptase	Applied Biosystems, USA
Natrium-orthovanadat	Sigma-Aldrich, Deutschland
<i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl-ethan-1,2-diamin (TEMED)	Bio-Rad, USA
NucleoBond® Xtra midi plasmid midiprep kit	Macherery-Nagel, Deutschland
Nuklease freies Wasser	Ambion, USA
Oligo(dT) primer	Promega, USA
Opti-MEM® Medium	Gibco BRL, Deutschland
PCR Nucleotide Mix	Promega, USA
Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG kit	Invitrogen, USA
Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad, USA
Proteinase K	Promega, USA
2-Propanol	Merck, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Deutschland
QuikChange II Site-directed mutagenesis Kit	Stratagene, Deutschland
Quick Start™ Bradford Dye	Bio-Rad, USA
RNAase Inhibitor	Applied Biosystems, USA

RNeasy Midi Kit	Qiagen, Deutschland
SB431542	Calbiochem, USA
<i>Scott's tap water substitute</i>	Sigma-Aldrich, Deutschland
SDS, 10 % Lösung	Promega, USA
Select agar	Sigma-Aldrich, Deutschland
Smooth muscle cell medium	Invitrogen, Großbritannien
SuperSignal® West Femto chemilumineszenz Substrat	Thermo Scientific, USA
TGF-β1	R&D Systems, USA
Triton X-100	Promega, USA
Tris	Roth, Deutschland
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Deutschland

3.1.3 Zellkultur

3.1.3.1 Zelllinien

A549	ATCC, USA
HEK293T	ATCC, USA

3.1.3.2 Primärzellen

HPASMC	Invitrogen, USA
HPAEC	Invitrogen, USA

3.1.4 Primer

Tabelle 2: Primer für Expressionsanalysen

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Primersequenz (3'-5')
mm_Polr2A	CTAAGGGGCAGCCAAAGAAAC	CCATTCAGCATACAACCTCTAGGC
mm_Acvrl1	CACCTACATGTGGAGATC	CGATATCCAGGTAATCGCTG
mm_Eng	CGTGCTACTCATGTCCCTGAT	CAGGACAAGATGGTTCGTCAGT
mm_Tgfr2	CCAAGATGCCATTGTTTACA	CATCCTGGATTCTAGAACTTC
mm_Tgfr1	CAGAGGGCACCACCTTAAA	AATGGTCCTGGAAGTTC
mm_Tgfr3	GGTGTGAACTGTCACCGATCA	GTTTAGGATGTGAACCTCCCTTG
h_KI67	GAGGTGTGCAGAAAATCCAAA	CTGTCCCTATGACTTCTGGTTGT
h_PCNA	GCGCTAGTATTTGAAGCACCAA	CGATCTTGGGAGCCAAGTAGTA
h_ADAMTS5	GGCCTCCATCGCCAATAGG	GGATAGCTGCATCGTAGTGCT
h_ADAMTS9	CAACCCCTGGATGTGGTCAA	AGTTGGACAGGCAAAGGGTAG
h_HPRT	AAGGACCCACGAAGTGTTG	GGCTTTGTATTTGCTTTTCCA

Tabelle 3: Primer für die Klonierung der TGF- β Rezeptoren

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Primersequenz (3'-5')
ACVRL1	AAGGATCCATACCTT- GGGCTCCCCCAG (BamHI)	AAGAATTCCTATTGAATCACTT- TAGGCT (EcoRI)
TGFBR1	AAGATATCATGG- AGGCGGCGGTTCGCTGC (EcoRV)	AAGCGGCCGCTTACATTTT- GATGCCTTCCT (NotI)
TGFBR2	AAGGATCCATGGG- TCGGGGGCTGCTCAG (BamHI)	AAGAATTCCTATTTGGTAGTGTT- TAGGG (EcoRI)
TGFBR3	AAGATATCATGACTTCCATTAT- GTGAT (EcoRV)	AAGCGGCCGCTTAGGCCGTGCT- GCTGCTGG (NotI)
ENG	AAGGATCCATGGACCG- CGGCACGCTCCC (BamHI)	AAGAATTCCTATGCCATGC- TGCTGGTGG (EcoRI)

Tabelle 4: Primer für die *side-directed-mutagenesis* (SDM)

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Primersequenz (3'-5')
caACVRL1 (Q201D)	ACAGTGGCACGGGACGTT- GCCTTGGTG	CACCAAGGCAACGTCCTCGTGC- CACTGT
dnACVRL1 (K229R)	AGTGTGGCCGTCAGGATCTTC- TCCTCG	CGAGGAGAAGATCCTGACGGCCA- CACT
caTGFBR1 (T204D)	ACAATTGCGAGAGACATTGTGTTA- CAA	TTGTAACACAATGTCTCTGGC- AATTGT
dnTGFBR1 (K232R)	GAAGTTGCTGTTAGGATATTC- TCCTCT	AGAGGAGAATATCCTAACAGC- AACTTC

Tabelle 5: Primer zur Plasmidklonierung für die Herstellung von lentiviralen Partikel

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Primersequenz (3'-5')
TGFBR3 - Volllänge	ATGACTTCCCATTATGTGAT	CTAGGCCGTGCTGCTGCTGG
TGFBR3 - Δ Ekto/TM	ATGTCTCACACAGGGGAGACA	CTAGGCCGTGCTGCTGCT
TGFBR3 - Δ Zyto/TM	CTAACGGTTAGGGTGTCCAG	ATGACTTCCCATTATGTGAT
TGFBR3 - Δ Zyto	ATGACTTCCCATTATGTGAT	CTAATAGATGTACCACAA GGC
TGFBR3 - Δ Ekto	ATGACTTCCCATTATGTGATT- GCCATC TTTGCCCTGATGAGCTC- CTGTTTAGCCACTGCAACCCTAAC- CGTGATGGGCATT	AACCCGGGCTAGGCC- GTGCTGCTGCTGGA
TGFBR3 - Δ Ekto/TM-V5	ATGTCTCACACAGGGGAGACA	GGCCGTGCTGCTGCT

3.1.5 Antikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper

Name	Bestellnr.	Verdünnung	Hersteller
TGF- β Receptor III	#2519	1:1000	Cell Signaling, USA
TGF- β Receptor II (K105)	#3713	1:1000	Cell Signaling, USA
TGF- β Receptor I	#3712	1:1000	Cell Signaling, USA
ALK-1 (H-150)	sc-28976	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Endoglin (H-300)	sc-20632	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
PCNA (C-20)	sc-9857	1:800	Santa Cruz Biotechnology, USA
Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2)	#9101	1:1000	Cell Signaling, USA
PCNA (C-20)	sc-9857	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5)	#4695	1:1000	Cell Signaling, USA

α -Tubulin (B-7)	sc-5286	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, USA
Goat anti-Rabbit IgG	31460	1:3000	Thermo Scientific, USA
Rabbit anti-Goat IgG	31402	1:3000	Thermo Scientific, USA
Goat anti-Mouse IgM	31440	1:3000	Thermo Scientific, USA
β -Actin (13E5)	#4970	1:1000	Cell Signaling, USA

3.1.6 *Small interfering RNA (siRNA)*

Die siRNA wurde von SantaCruz Biotechnology, Texas, USA unter folgenden Katalognummern bezogen: Acvr11 (sc-40212), Tgfr1 (sc-40222), Tgfr2 (sc-36657), Tgfr3 (sc-40224), Eng (sc-35302).

3.2 Methoden

3.2.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Bei der DNA Gelelektrophorese wurden 1 % Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 200 ml Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer (40 mM Tris-Acetat, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Für die Visualisierung der DNA wurde dem Agarosegel im flüssigen Zustand 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Nach einer 10 minütigen Abkühlphase wurde das Gel in die Form gegossen und der Kamm eingesetzt. Nach einer 30 minütigen Polymerisationsphase wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und mit 1× TAE Puffer übergossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer (0,01 % Bromphenolblau, 40 % Glycerol in 1× TAE Puffer) in die *Wells* geladen und die Elektrophorese wurde bei 110 V für 20 - 40 Minuten je nach Probengröße durchgeführt. Das Gel wurde anschließend unter UV Licht ($\lambda=257$ nm) betrachtet, und die Dokumentation erfolgte mit einer Kodak 1D 3.5 Kamera.

3.2.2 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die zu transformierende DNA wurde mit 50 µl auf Eis aufgetauten, chemisch-kompetenten Zellen vermischt. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wurde ein Hitzeschock von 2 Min. bei 42 °C durchgeführt. Danach wurde 1 ml LB Medium zu den Bakterien gegeben. Diese wurden dann 45 Min. bei 37 °C auf einem Schüttler (900 UpM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 Min. bei 4.000 UpM pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Die Ausplattierung der Bakterien erfolgte auf einer LB-Platte mit den für die Selektion wichtigen Antibiotika. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.3 Mini- und Midi-Plasmidisolierung aus Bakterien

Für die Mini-Plasmidisolierung wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin (oder mit dem Plasmid entsprechenden Antibiotikum) für 16 h bei 37 °C unter Schütteln bei 190 UpM inokuliert. Die Plasmid-DNA wurde dann aus der Bakterienkultur mit Hilfe eines Qiagen QIAprep Spin Miniprep Kit, entsprechend der Anweisungen des Herstellers, extrahiert.

Für die Midi-Plasmidisolierung wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin für 8 h bei 37 °C unter Schütteln bei 190 UpM inokuliert. Danach wurden 200 µl Bakterienvorkultur in einem Erlenmeyerkolben mit 200 ml LB-Medium mit 100 µg / ml Ampicillin überführt und bei 37 °C über Nacht unter Schütteln bei 190 UpM inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann aus der Bakterienkultur mit Hilfe eines NucleoBond® Xtra Midi Kit, entsprechend der Anweisungen des Herstellers, extrahiert.

3.2.4 Klonierung der TGF-β-Rezeptoren in pIRES-hrGFPII

Zunächst wurde RNA aus HPASM-Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente als *Template* für die PCRs zur Amplifikation der TGF-β-Rezeptoren. Für die PCRs wurden die in Tabelle 3 angegebenen Primer verwendet. Zunächst fand eine Subklonierung in den pGEM-T easy Vektor statt. Danach wurden die Vektoren mit Endonukleasen geschnitten (ACVRL1 - BamHI/EcoRI, TGFBR1 - EcoRV/NotI, TGFBR2 - BamHI/EcoRI, TGFBR3 - EcoRV/NotI und ENG - BamHI/EcoRI), die Fragmente über ein Agarosegel aufgereinigt und in den Vektor pIRES-hrGFPII von Agilent Technologies (Santa Clara, USA), der mit den gleichen Endonukleasen geschnitten wurde, ligiert.

3.2.5 Side-directed mutagenesis (SDM)

Für die *side-directed-mutagenesis* des pIRES::ACVRL1 und des pIRES::TGFBR1 Konstrukts wurde das QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Herstellerangaben unter Verwendung der in Tabelle 4 angegebenen Primer verwendet.

3.2.6 Klonierung von Plasmiden zur Erstellung von lentiviralen Partikeln

Die Herstellung der Plasmide für die Generierung der lentiviralen Partikel erfolgte mit Hilfe der Gateway® Technologie von Invitrogen. Zunächst wurden die verschiedenen Konstrukte mittels PCR unter Verwendung der in Tabelle 5 angegebenen Primer generiert. Als *Template* für die PCR diente das Konstrukt pIRES::TGFBR3. Die PCR Fragmente wurden über eine Topoisomerase-Reaktion in den Gateway© Entry Vektor pCR®8/GW/TOPO® kloniert. Die Transformation

der entstandenen Plasmide erfolgte mit One Shot® TOP10 *E. coli*. Die Bakterien wurden auf LB-Agar Platten mit 100 µg / ml Spectinomycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Mini-Plasmidisolierung (siehe Mini- und Midi-Plasmidisolierung aus Bakterien) und die Sequenzierung der Plasmide. Den Herstellerangaben entsprechend wurden die Konstrukte in einer LR-Reaktion (Austausch der Sequenz zwischen der attL- und der attR-Seite) mit dem Vektor pLenti7.3/V5-DEST™ rekombiniert. Die entstandenen Konstrukte wurden in One Shot® Stbl3™ chemisch kompetente *E. coli* transformiert und auf LB-Agar Platten mit 100 µg / ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Midi-Plasmidisolierung (siehe Mini- und Midi-Plasmidisolierung aus Bakterien).

3.2.7 Generierung von lentiviralen Partikeln

Zunächst wurden HEK293T Zellen in 10 cm Petrischalen in 10 ml *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 5 % fetalem Kälberserum (*fetal calf serum* - FCS) ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, so dass sie am nächsten Tag eine Dichte von 90 % aufwiesen. Danach wurde das Medium durch 5 ml serumreduziertes (Opti-MEM) Medium ersetzt, und die Zellen wurden weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Dann wurden 3 µg des gewünschten pLenti7.3/V5-DEST™ Plasmids sowie 9 µg Verpackungsmix zusammen mit 1,5 ml Opti-MEM in einem Reaktionsgefäß für 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 24 µl TurboFect mit 1,5 ml Opti-MEM für 5 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden die beiden Reaktionsgemische zusammengeführt und für weitere 20 Min. bei RT inkubiert, so dass die Liposomen die DNA einschließen konnten. Dieses Gemisch wurde nun zu den Zellen in den 5 ml Opti-MEM hinzugefügt und über Nacht 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Transfektion durch Überprüfung der GFP (grün fluoreszierendes Protein) Expression an einem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Bei erfolgreicher Transfektion wurde das Medium durch 10 ml DMEM mit 5 % FCS ersetzt und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Das Viren enthaltende Zellmedium wurde dann für 5 Min. bei 4000 UpM in einem 15 ml Reaktionsgefäß zentrifugiert, um es von Zellbestandteilen zu befreien. Der Überstand wurde in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren.

3.2.8 *Microarray*-Studien

Für die cDNA *Microarray*-Studien wurden insgesamt viermal HPASM-Zellen mit 200 µM siRNA spezifisch für TGFBR3, bzw. mit 200 µM *scrambled* Kontroll-siRNA für 24 h und 48 h transfiziert. Die RNA wurde aus den Zellen isoliert, und die *Microarray*-Studien wurden von IMG (Martinsried, Deutschland) durchgeführt und analysiert. Es wurden *Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression Microarrays* (8 × 60K) verwendet. Zur Analyse der Daten wurde die GeneSpring GX12 Analysesoftware verwendet.

3.2.9 Kultivierung von humanen Zellen

Die primären HPASM-Zellen (Katalognummer: C-009-5C) und die primären HPAAE-Zellen (C0085C) wurden von Invitrogen bezogen und nach Herstellerangaben in den empfohlenen Medien kultiviert. Die Zellen wurden maximal fünf mal passagiert.

3.2.10 Transfektion von Primärzellen mit siRNA

Für RNA-Interferenz-Experimente wurden die Primärzellen mit einer genspezifischen siRNA unter Verwendung von *X-tremeGENE*© siRNA Transfektionsreagenz transfiziert. Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und für 30 Min. mit 900 µl Basalmedium beschichtet. 100 µl Opti-MEM Medium wurden mit 7,5 µl *X-tremeGENE*© fünf Minuten prä-inkubiert. Danach folgte die Zugabe der siRNA (200 nM). Nach 20 minütiger Inkubation wurde die Transfektionslösung auf die Platten gegeben. Nach sechs Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch Vollmedium (5 % FCS) ersetzt. Als Negativkontrolle wurde eine nicht zielgerichtete (*scrambled*) siRNA benutzt.

Transfektionen in 96-Well-Platten wurden gleichermaßen durchgeführt, allerdings wurde nur 1/10 der Volumina verwendet.

3.2.11 Transduktion von Primärzellen mit lentiviralen Partikeln

Für Überexpressionsexperimente wurden Primärzellen mit lentiviralen Partikeln unter Verwendung von Polybrene© transduziert. Die Zellen wurden auf 6-Well-Platten kultiviert und mit 900 µl Vollmedium (5 % FCS) beschichtet. Danach folg-

te die Zugabe von 100 µl lentivirale Partikel mit 4 µg/ml Polybrene©. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch Vollmedium (5 % FCS) ersetzt.

3.2.12 Genehmigung für gentechnische Arbeiten der Sicherheitsstufe 2

Alle durchgeführten gentechnischen Arbeiten der Sicherheitsstufe 2 wurden zuvor vom Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen IV44-53r30.03.MPP07.13.03 genehmigt.

3.2.13 Proteinisolation

3.2.13.1 Proteinisolation aus Gewebe

Für die Proteinisolation aus gefrorenen Mauslungen wurden diese zunächst in 300 µl Protein-Lysepuffer (mit 1 mM Natriumorthovanadat und Complete™ Protease-Inhibitor-Cocktail) in einem *Precellys* Homogenisator von Peqlab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben homogenisiert. Die Reaktionsgefäße wurden dann bei 13.000 UpM für 15 Min. bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wurde anschließend in 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Protein Lysispuffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,5

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

0,5 % Igepal® CA-630 (NP-40)

1 mM Na₃VO₄ sowie 1 mM Complete™ wurden dem Lysispuffer direkt vor Gebrauch zugesetzt

3.2.13.2 Proteinisolation aus Zellen

Das gesamte Proteinisolierungsverfahren wurde auf Eis durchgeführt, um einen Proteinabbau zu verhindern. Der Protein-Lysepuffer wurde mit 1 mM Natriumorthovanadat und Complete™ Protease-Inhibitor-Cocktail (1 Tablette pro 25 ml Protein Lysepuffer) unmittelbar vor Gebrauch ergänzt. Als nächstes wurden 100 µl Lysepuffer pro *Well*, einer 6-*Well*-Platte, den Zellen hinzugefügt. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäße aufgefangen und für

30 Min. unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Die Eppendorfgefäße wurden dann bei 13.000 UpM für 15 Min. bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wurde anschließend in 0,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

3.2.13.3 Messung der Proteinkonzentration

Um die Proteinkonzentration zu messen, wurden 3 µl der Probe sowie des Protein-Lysepuffers mit 27 µl Wasser verdünnt, um eine 1:10 Verdünnung zu erhalten. Davon wurden zweimal 10 µl in eine 96-Well-Platte übertragen. Parallel dazu wurde eine Proteinstandardreihe von 10 µl Rinderserumalbumin auf derselben Platte dispergiert. Anschließend wurden 200 µl Quick Start™ Bradford Farbstoff zu jeder Probe bzw. zu der Proteinstandardreihe hinzugegeben. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm mit einem VersaMax Micro-Plattenlesegerät gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden für jede Probe mit Hilfe der Proteinstandardreihe berechnet.

3.2.14 Protein-Gelelektrophorese und Western Blot

Die Proteinproben (25 µg) wurden mit 2× Probenpuffer vermischt und für 10 Min. bei 95 °C denaturiert. Im Anschluß wurden die Proben auf ein SDS-PAGE Gel, bestehend aus einem 5 % Sammelgel und einem 10 % Trenngel übertragen und bei 110 mV in Laufpuffer für 60 - 90 Min., je nach Proteingröße, aufgetrennt. Danach wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran bei 110 mV für 1 h in Transfer-Puffer übertragen. Anschließend wurde die Membran einmal mit Waschpuffer gewaschen und für 1 h in Blockierungspuffer bei RT inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde dann mit primärem Antikörper, verdünnt in Blockierungspuffer, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die verwendeten primären Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt. Nachdem die Membran dreimal in Waschpuffer 5 Min. gespült wurde, wurde der jeweilige, mit Meerrettichperoxidase-konjugierte, sekundäre Antikörper in Blockierungspuffer 1:3000 verdünnt zugegeben, und die Membran wurde 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Min. in Waschpuffer gespült und in 1 ml SuperSignal® West Femto Chemilumineszenzsubstrat entwickelt. Die Proteinbanden wurden mit einem LAS-4000 lumineszierenden Bildanalysator visualisiert und archiviert.

Sammelgel:

5 % Acrylamid

125 mM Tris-HCl, pH = 6,8

0,1 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat
(APS)

0,1 % (v/v) TEMED

Trenngel:

10 % Acrylamid

375 mM Tris-HCl, pH = 8,8

0,1 % (w/v) SDS

0,1 % (w/v) APS

0,1 % (v/v) TEMED

2× Ladepuffer:

100 mM Tris-HCl pH 6,8

4 % (v/v) SDS

0,2 % (w/v) Bromophenol Blau

20 % (v/v) Glycerol

20 mM DTT (vor Gebrauch hinzuge-
fügt)SDS Laufpuffer:

25 mM Tris

250 mM Glycin

0,1 % (w/v) SDS

Transfer Puffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % (v/v) Methanol

Blockierungspuffer:

1× PBS

5 % (w/v) fettarmes Trockenmilchpulver

Waschpuffer:

1× PBS

0,1 % (v/v) Tween® 20

3.2.15 RNA-Isolation

3.2.15.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Für die Isolation der totalen mRNA aus gefrorenen Mauslungen wurden diese zunächst in 300 µl Lysepuffer in einem *Precellys* Homogenisator von Peqlab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben homogenisiert. Die anschließende Extraktion der totalen mRNA erfolgte mit Hilfe des *peqGOLD Total RNA Kit* von Peqlab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben.

3.2.15.2 RNA-Isolation aus Zellen

Das Zellmedium wurde nach Beendigung des Versuchs abgesaugt, und die totale mRNA wurde aus den Zellen mit Hilfe des *peqGOLD Total RNA Kit* von Peqlab (Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben extrahiert.

3.2.15.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der isolierten RNA wurde nach der Anleitung von Peqlab (Erlangen, Deutschland) unter Verwendung von 1,5 µl Probe mit einem Nanodrop Spektrophotometer gemessen.

3.2.16 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ist ein enzymatischer Prozess, bei dem das Enzym reverse Transkriptase RNA in komplementäre DNA (cDNA) umschreibt. Eingesetzt wurden 1000 ng totale RNA, welche mit sterilem RNAase freiem Wasser auf 20 µl Volumen aufgefüllt wurde. Das Reaktionsgemisch wurde für 10 Min. auf 70 °C erhitzt, und danach wurden die folgenden Reagenzien hinzugefügt.

Reverse Transkription Reagenzien:

10× PCR Puffer II	4 µl
25 mM MgCl ₂	8 µl
H ₂ O	1 µl
Random hexamers	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
10 nM dNTP Mix	2 µl
MuLV Reverse Transkriptase	2 µl

Danach wurde die Mischung bei 21 °C für 10 Min. inkubiert, gefolgt von dem RNA-Synthese Schritt bei 43 °C für 1 h 15 Min. Ein letzter Inkubationsschritt bei 99 °C für 5 Min. wurde durchgeführt, um die MuLV Reverse Transkriptase zu inaktivieren.

3.2.17 Quantitative real-time RT PCR

Quantitative Veränderungen in der mRNA Expression von Genen wurden mit Hilfe der quantitativen real-time PCR Methode bestimmt. Benutzt wurde ein Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG Kit (Invitrogen) und eine StepOnePlus PCR Maschine (Applied Biosystems, Foster City, CA). Die Primerpaare wurden Intron-übergreifend angelegt (Synthetisiert von Eurofins MWG Operon, Deutschland). Die verwendeten Primer befinden sich in Tabelle 2: Primer für Expressionsanalysen.

Als Referenzgen wurde POL2RA für die Mausgewebe und HPRT für die humanen Zellen eingesetzt.

Temperatur	Dauer	
50 °C	2 Min.	
95 °C	5 Min.	
95 °C	5 Sek.	} 40 Zyklen
59 °C	5 Sek.	
72 °C	30 Sek.	
95 °C	15 Sek.	
60 °C	1 Min.	
95 °C	15 Sek.	
60 °C	15 Sek.	

Das erwartete PCR-Produkt wurde durch Schmelzkurvenanalyse und Gelelektrophorese bestätigt.

3.2.18 Bestimmung der Proliferationsrate von Zellen

Die Proliferationsrate der primären Zellen wurde durch Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU) bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 100 µl Zellmedium pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch 100 µl Zellmedium mit 0,1 µl BrdU Lösung aus dem Roche Zellproliferations-Kit (Katalognummer: 1164722900)

ersetzt und für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde die Proliferationsrate entsprechend der Anweisung von Roche bestimmt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm mit einer Kontrollwellenlänge von 490 nm mit einem Versa-Max Micro-Plattenlesegerät gemessen.

3.2.19 Bestimmung der Migrationsrate von Zellen

Für die Bestimmung der Migrationsrate von primären Zellen wurden 5000 Zellen in 300 µl Medium mit 10 % FCS pro Membraneinsatz ausgesät. Außerhalb der Membraneinsätze wurden pro *Well* 700 µl Medium ohne FCS verwendet, so dass kein Stimulus für eine Migration durch die Membran bestand. Nach 24 h wurden die Zellen wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben transfiziert. Um die Migration 24 h nach der Transfektion der Zellen zu starten, wurde das Medium in den Membraneinsätzen durch Medium mit 5 % FCS und das Medium in den *Wells* durch Medium mit 10 % FCS ersetzt.

Die Membraneinsätze wurden mit einer Pinzette herausgenommen und in einem Becherglas mit 1× PBS ausgewaschen. Mit Hilfe eines mit Papier umwickelten Holzstabs wurden die Membraneinsätze innen ausgestrichen, um nicht migrierte Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 100 % Methanol für 3 Min. fixiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit einer Kristallviolettlösung (1:20) für 10 Min. bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschschrift in 1× PBS sowie ein weiteres Ausstreichen der Innenseite der Membraneinsätze. Die Membranen wurden anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten und auf Objektträger platziert. Das Deckglas wurde an den Rändern mit Nagellack fixiert.

3.2.20 Bestimmung der *in vitro*-Angiogeneserate von Endothelzellen

Zur Bestimmung der *in vitro* Angiogeneserate wurden pro Well 100.000 humane pulmonale arterielle Endothelzellen (HPAEC) auf einer mit Matrigel beschichteten 24-Well Platte (BD BioCoat™ BD Matrigel™) von Becton Dickinson ausgesät. Die Zellen wurden am Vortag mit siRNA entsprechend dem unter Punkt 3.2.10 angeführten Protokoll transfiziert. Die Zellen wurden mit Hilfe eines invertierten Mikroskops fotografiert und die Bilder mit Hilfe der WIMASIS Software WimTube (Wimasis GmbH, München, Deutschland) analysiert.

3.2.21 Lasermikrodissektion

Für die Lasermikrodissektion wurden 10 µm dicke Gefriergewebeschnitte mit einem Kryotom angefertigt. Die Gewebeschnitte wurde auf spezielle, mit einer PEN-(Polyethylenphthalat) Membran beschichtete Objektträger von Leica (Wetzlar, Deutschland) übertragen. Anschließend folgte eine Kernfärbung mit Hämatoxylin. Dazu wurden die gefrorenen Schnitte für 1 Min. in 70 % Ethanol getaucht, dann für 10 Sekunden in RNase freiem Wasser gespült und für weitere 10 Sek. in Hämatoxylin gefärbt. Darauf folgte ein weiterer Waschschriff für 10 Sek. in RNase-freiem Wasser, bevor die Schnitte in *Scott's tap water substitute* für 15 Sek. einer Blaufärbungsreaktion unterzogen wurden. Anschließend wurden die Schnitte je 15 Sek. in Ethanol in aufsteigender Konzentration (je zweimal 70 %, 95 %, 100 %) entwässert.

3.2.21.1 RNA-Isolation nach Lasermikrodissektion

Für die Isolation von RNA aus lasermikrodissektiertem Gewebe wurde dies zunächst in RLT-Puffer (1 ml RLT-Puffer + 10 µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Anschließend wurden die RNA aus dem Gewebe nach dem QIAGEN (Hilden, Deutschland) RNeasy Kit Protokoll isoliert. Es folgte z. T. ein DNase I Verdau nach Anleitung des Herstellers. Nach der Aufreinigung wurde die gesamte RNA in ddH₂O eluiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.21.2 cDNA-Synthese nach Lasermikrodissektion

Die gesamte gewonnene RNA aus der Lasermikrodissektion wurde mit Hilfe des BioRad (Berkeley, USA) iScript™ cDNA Synthesis Kit den Herstellerangaben entsprechend in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend bei -40 °C gelagert.

3.2.22 Tiermodell

3.2.22.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden Mäuse des Stamms C57/Bl6J (*Mus musculus*) eingesetzt. Sie stammten aus der eigenen Tierzuchtanlage des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland. Die Haltung erfolgte in Makrolonkäfigen. Die Tag-Nacht-Phasen betragen je 12 h pro Tag. Die Fütterung der Tie-

re erfolgte *ad libitum*, den Tieren stand jederzeit Trinkwasser aus Nippeltränken zur Verfügung.

3.2.22.2 Tierversuchsgenehmigung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt unter dem Aktenzeichen V54 - 19 c 20/15 - B 2/301 genehmigt.

3.2.22.3 Hyperoxie-Modell

Die neugeborenen Mäuse wurden innerhalb von 12 Stunden nach der Geburt am errechneten Geburtstermin in die Studiengruppen randomisiert und unter kontrollierten Bedingungen einer Hyperoxie von 85 % O₂ bzw. Raumluft von 21 % O₂ ausgesetzt. Um einen Einfluss der Sauerstofftoxizität auszuschließen, wurden die Mütter nach der Entbindung alle 24 Stunden entsprechend den Arbeiten von Warner *et al.* (75) sowohl den normoxisch als auch den hyperoxisch gehaltenen Neugeborenen neu zugeordnet.

3.2.22.4 Lungenentnahme

Für die Entnahme der Lungen wurden die Mäuse zunächst mit Isofluran betäubt und durch eine Injektion mit Pentobarbital (500 mg/kg Körpergewicht) getötet. Anschließend wurde der Thorax durch einen Hautschnitt vom Abdomen ansetzend eröffnet. Das Durchtrennen des Diaphragmas führte zum Kollaps der Lungen. Danach wurde das Sternum medial bis zur Klavikula durchtrennt. Die Rippenbögen wurden auseinandergespreizt und seitlich fixiert. Die Bauchorta wurde durchtrennt und über einen Herzkatheter im rechten Ventrikel wurde die Lunge mit PBS blutfrei gespült (10 cm Wassersäule). Danach wurden die Lungen über die Trachea mit 50 % TissueTek in PBS gebläht (10 cm Wassersäule). Anschließend wurden die Lungen und das Herz aus dem Thorax entnommen und die Lunge nach Abtrennen des Herzens in TissueTek eingebettet und in durch Trockeneis gekühltem Methylbutan eingefroren. Die Lungen wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3 Statistische Auswertung

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

Die *in vitro* Daten sind als Balkendiagramme dargestellt. Die Höhe der Balken zeigt die Mittelwerte an, die Fehlerbalken stellen die SD (*standard deviation* - Standardabweichung) dar. Bei Vergleich mit einer indizierten Gruppe wurde der Student's *t*-Test angewandt. Wurden mehrere Gruppen gegenübergestellt, so wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Turkey's post-hoc Test angefertigt. Ein p -Wert $\leq 0,05$ wurde dabei als statistisch signifikant angesehen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism Version 5.

4 Ergebnisse

4.1 Expressionsanalyse der TGF- β -Rezeptoren im Tiermodell der BPD

Zunächst sollte im Mausmodell der BPD die Genexpression der fünf TGF- β Rezeptoren *Acvr11*, *Tgfbr1*, *Tgfbr2*, *Tgfbr3* und *Eng* in der postnatalen Lungenentwicklung analysiert werden. Dazu wurde RNA aus Lungenhomogenaten zu vier verschiedenen Zeitpunkten (P7, P14, P21 und P28, wobei "P" den postnatalen Tag bezeichnet) isoliert und mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert. Die relative mRNA-Expression der beiden Typ I Rezeptoren *Acvr11* und *Tgfbr1* war am postnatalen Tag 7 (P7) unter hyperoxischen (HYX) Bedingungen im Vergleich zu den normoxischen (NOX) Kontrolltieren nicht verändert (siehe Abb. 5A und 5B). Erst zu dem Zeitpunkt P14 wurden *Acvr11* und *Tgfbr1* unter HYX hochreguliert.

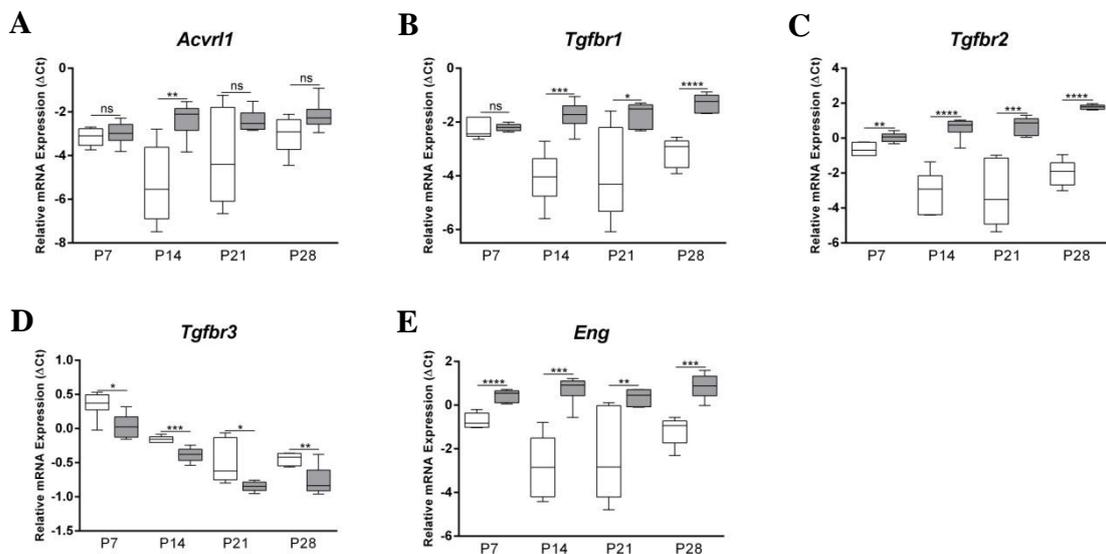


Abbildung 5: Expression der TGF- β Rezeptoren in der Mauslunge zu verschiedenen Zeitpunkten im BPD-Modell.

Neugeborene Mäuse (P1) wurden für die ersten 7 (P7), 14 (P14), 21 (P21) oder 28 (P28) Tage ihres Lebens, entweder 21 % O₂ (NOX, weiße Boxen) oder 85 % O₂ (HYX, graue Boxen) ausgesetzt. Die Lungen wurden isoliert und die mRNA Expression von *Acvr11* (A), *Tgfbr1* (B), *Tgfbr2* (C), *Tgfbr3* (D) und *Eng* (E) wurde mittels real-time RT-PCR analysiert. *Polr2a* diente als Referenzgen. Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden sechs Tiere analysiert. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001, ns = nicht signifikant.

Des Weiteren blieb die Expression von *Tgfb1* auch zu den Zeitpunkten P21 und P28 signifikant hochreguliert, für *Acvrl1* ergab sich lediglich ein nicht signifikanter Trend. Die Expression des Typ II Rezeptors *Tgfb2* war zu allen vier Zeitpunkten bei den hyperoxisch exponierten Mäusen durchschnittlich um das Sechs- bis Achtefache erhöht (siehe Abb. 5C). Für die beiden Typ-III-Rezeptoren *Tgfb3* und *Eng* ergab sich eine gegensätzliche Regulierung unter HYX. *Eng* war zu allen vier Zeitpunkten hochreguliert (siehe Abb. 5E), während *Tgfb3* zu allen Zeitpunkten in der Expression signifikant herunterreguliert war (siehe Abb. 5D).

4.2 Überexpression der TGF- β -Rezeptoren in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen

Da alle fünf TGF- β Rezeptoren in dem Mausmodell der BPD dereguliert waren, sollte mit Hilfe von Überexpressionsexperimenten festgestellt werden, welchen Einfluss die einzelnen Rezeptoren auf die Zelleigenschaften von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskel- (HPASM, *human pulmonary artery smooth muscle*) Zellen haben. Alle fünf TGF- β Rezeptoren (ACVRL1, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3 und ENG) wurden in den bicistronischen Vektor pIRES kloniert, der bei gleichzeitiger Expression des grünfluoreszierenden Proteins (GFP) eine Selektion transfizierter Zellen mittels Durchflusszytometrie erlaubt. Des Weiteren wurden für die beiden TGF- β -Rezeptoren ACVRL1 und TGFBR1, die eine Kinasedomäne besitzen, mit Hilfe von *side-directed-mutagenesis* (SDM) jeweils eine konstitutiv aktive (ca) und eine dominant negative (dn) Version des Rezeptors generiert.

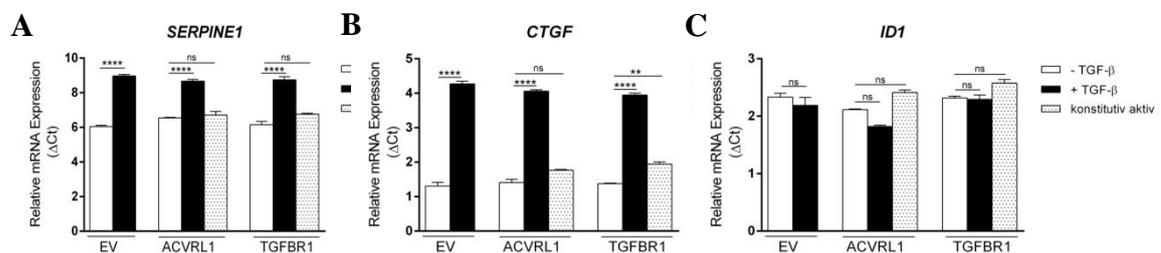


Abbildung 6: Aktivierung des TGF- β Signalweges durch konstitutiv aktive ACVRL1 und TGFBR1 Rezeptorkonstrukte.

Humane A549 Zellen wurden mit 4 μ g DNA (weiße und schwarze Balken beziehen sich auf die unveränderten Konstrukte, die gepunkteten Balken weisen auf die konstitutiv aktiven Konstrukte hin) für 24 h transfiziert. Die mRNA Expression von *SERPINE1* (A), *CTGF* (B) und *ID1* (C) wurde mittels real-time RT-PCR analysiert. TGF- β Stimulation (2 ng / ml) erfolgte für 12 h. *HPRT* diente als Referenzgen. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Zunächst wurden die konstitutiv aktiven Konstrukte von ACVRL1 und TGFBR1 in leicht transfizierbaren humanen A549-Zellen getestet. Die Genexpression von SERPINE1 und CTGF wird durch eine Aktivierung des TGFBR1 Signalweges erhöht. In Abbildung 6A und 6B ist zu erkennen, dass die TGF- β Stimulation zu einer Erhöhung der SERPINE1 bzw. der CTGF Genexpression führte. Das konstitutiv aktive Konstrukt von TGFBR1 zeigte einen Anstieg CTGF der Genexpression (Abb.: 6B) gegenüber den nicht stimulierten TGFBR1 transfizierten Zellen, eine Erhöhung der SERPINE1 Genexpression konnte jedoch nicht festgestellt werden (Abb.: 6A). Das Gen ID1 zeigt eine erhöhte Expression, wenn der ACVRL1-abhängige TGF- β -Signalweg aktiviert wird. In Abbildung 6C ist zu erkennen, dass die im Vergleich zu wildtypischem ACVRL1, die konstitutiv aktive Form des ACVRL1-Rezeptors auch ohne Stimulation mit TGF- β zu einem Anstieg der ID1 Genexpressionführt. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant.

Als nächstes wurden mittels Durchflusszytometrie die Transfektionsrate von primären HPASM-Zellen bestimmt.

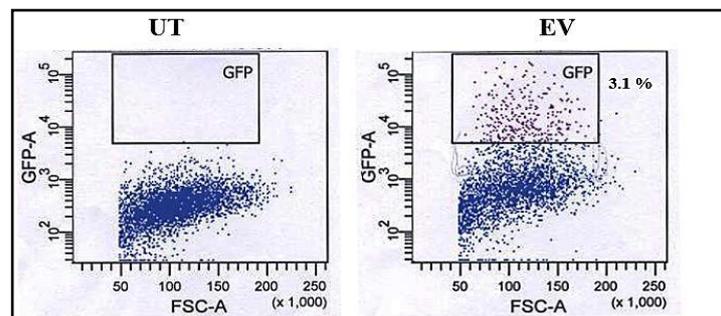


Abbildung 7: Durchflusszytometrie von HPASM-Zellen nach Plasmidtransfektion.

Dotplot von unbehandelten (UT) bzw. mit 4 μ g pIRES::GFP Plasmid (EV) transfizierten HPASM-Zellen, die mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. *Forward scatter* auf der X-Achse und GFP-A auf der Y-Achse.

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass nur 3,1 % aller HPASM-Zellen transfiziert wurden. Da eine derart niedrige Transfektionsrate keine aussagekräftigen Ergebnisse liefern kann, wurde dazu übergegangen, mittels siRNA *Knockdown*-Experimente der TGF- β Rezeptoren durchzuführen.

4.3 *Knockdown* der TGF- β -Rezeptoren in HPASM-Zellen

Aufgrund der niedrigen Transfektionsrate von HPASM Zellen mit Plasmiden wurden die Zellen mit siRNA transfiziert, um die Rolle der TGF- β -Rezeptoren in HPASM Zellen durch *Knockdown*-Experimente zu evaluieren.

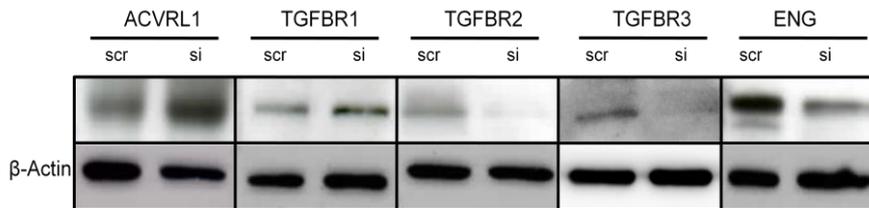


Abbildung 8: SiRNA vermittelter Knockdown der TGF- β Rezeptoren in HPASM-Zellen.

Die HPASM-Zellen wurden mit 200 nM siRNA (si) spezifisch für ACVRL1, TGFBR2, TGFBR3, ENG bzw. mit scrambled (scr) siRNA Kontrolle für 72 h transfiziert. Die Proteinexpression von ACVRL1, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3 und ENG wurde mittels Immunoblot bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Actin eingesetzt.

Zunächst wurde analysiert, in wie weit es möglich ist, siRNA in HPASM-Zellen zu bringen und einen *Knockdown* der TGF- β Rezeptoren zu erreichen. In Abbildung 8 ist erkennbar, dass für TGFBR2, TGFBR3 und ENG ein *Knockdown* durch Transfektion von siRNA in HPASM-Zellen möglich war. Für ACVRL1 und TGFBR1 konnte kein *Knockdown* erreicht werden. Daher wurden die nachfolgenden *Knockdown*-Experimente nur mit TGFBR2, TGFBR3 und ENG durchgeführt.

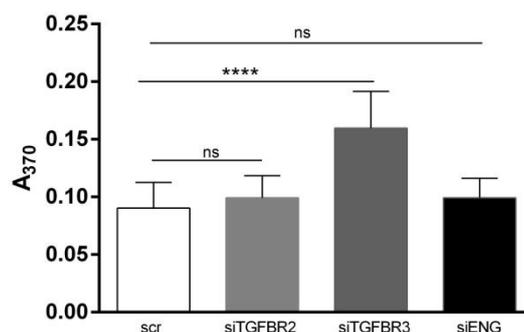


Abbildung 9: Proliferation von glatten Muskelzellen der humanen Pulmonalarterie (HPASMC) nach *Knockdown* von TGFBR2, TGFBR3 und ENG.

Bestimmung der Proliferationsrate durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU). Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR2, TGFBR3, ENG bzw. mit scrambled (scr) siRNA Kontrolle für 72 h transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde BrdU nach Herstellerangaben dem Zellmedium hinzugefügt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm mit einer Kontrollwellenlänge von 490 nm gemessen. Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: **** $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant.

Ein wichtiger Parameter in der Angiogenese ist die Proliferation von glatten Muskelzellen. Die Proliferationsfähigkeit von HPASM-Zellen wurde durch den *Knockdown* von TGFBR3 stark erhöht (Abb.: 9). Ein *Knockdown* von TGFBR2 oder ENG hingegen hatte keine Veränderung der Proliferation von HPASM-Zellen zur Folge.

4.4 *Tgfbr3*-Expression im Mausmodell der BPD

Nachdem gezeigt wurde, dass die mRNA-Expression von *Tgfbr3* (Abb.: 5D) in Lungenhomogenaten herunterreguliert ist, und dass eine solche erniedrigte Expression von TGFBR3 sich auf die Zellproliferation von HPASM-Zellen auswirken kann (Abb.: 9), sollte zunächst die erniedrigte Expression von *Tgfbr3* in den Lungenhomogenaten auf Proteinebene verifiziert werden und gegebenenfalls eine erhöhte Proliferation anhand des Proliferationsmarkers PCNA festgestellt werden.

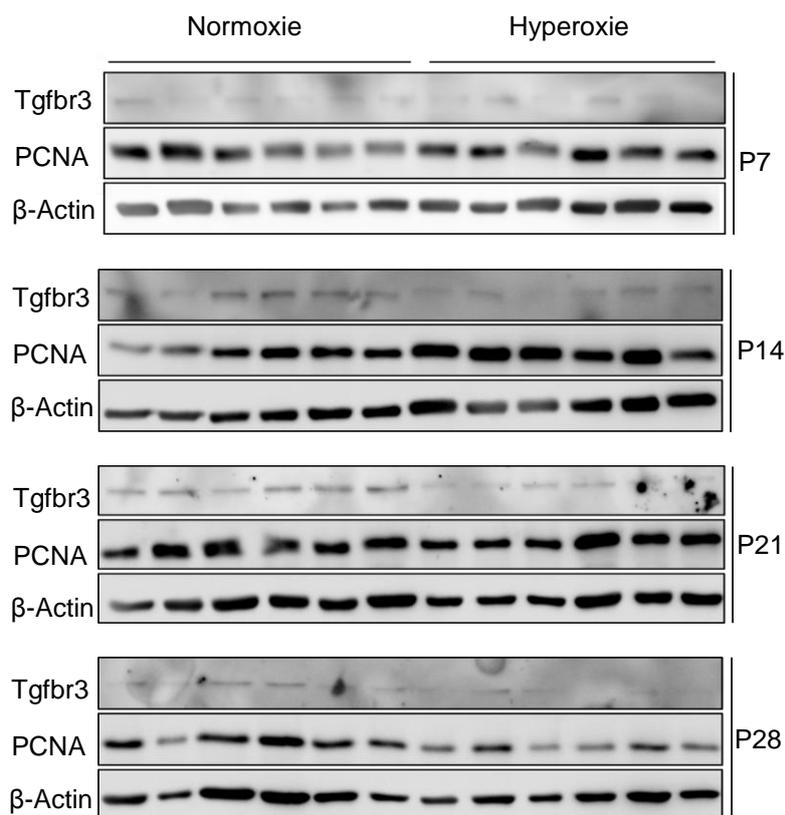


Abbildung 10: Proteinexpression von *Tgfbr3* in der Mauslunge zu verschiedenen Zeitpunkten der postnatalen Lungenentwicklung (P7, P14, P21 und P28) im BPD-Modell.

Neugeborene Mäuse (P1) wurden für die ersten 7 (P7), 14 (P14), 21 (P21) oder 28 (P28) Tage ihres Lebens entweder 21 % O₂ (NOX) oder 85 % O₂ (HYX) ausgesetzt. Die Lungen wurden isoliert, und die Proteinexpression von *Tgfbr3* und PCNA wurde mittels Immunoblot analysiert. β -Actin diente als Ladekontrolle. Pro Zeitpunkt und Gruppe wurden sechs Tiere analysiert.

In Abbildung 10 ist zu erkennen, dass zu den Zeitpunkten P14, P21 und P28 die Proteinexpression von TGFBR3 in den hyperoxisch exponierten Mäusen reduziert ist. Die schwache Bandenintensität zum Zeitpunkt P7 lässt keine Aussage über Proteinexpressionsunterschiede zu. Der Proliferationsmarker PCNA (*proliferating cellular nuclear antigen*) zeigt eine erhöhte Proteinexpression zu den Zeitpunkten P14 und P21 sowie eine gleichbleibende zum Zeitpunkt P7 bzw. eine erniedrigte Proteinexpression zum Zeitpunkt P28.

4.5 *Tgfb3*-Expression in den pulmonalen Gefäßen der Maus im Tiermodell der BPD

Um festzustellen, ob eine wie in den Lungenhomogenaten (Abb.: 5D und 10) verringerte Expression von *Tgfb3* in den pulmonalen Gefäßen bei den hyperoxisch exponierten Mäusen vorlag, wurden mittels Lasermikrodissektion pulmonale Gefäße aus der Mauslunge zur RNA-Isolation gewonnen (Abb.: 11A).

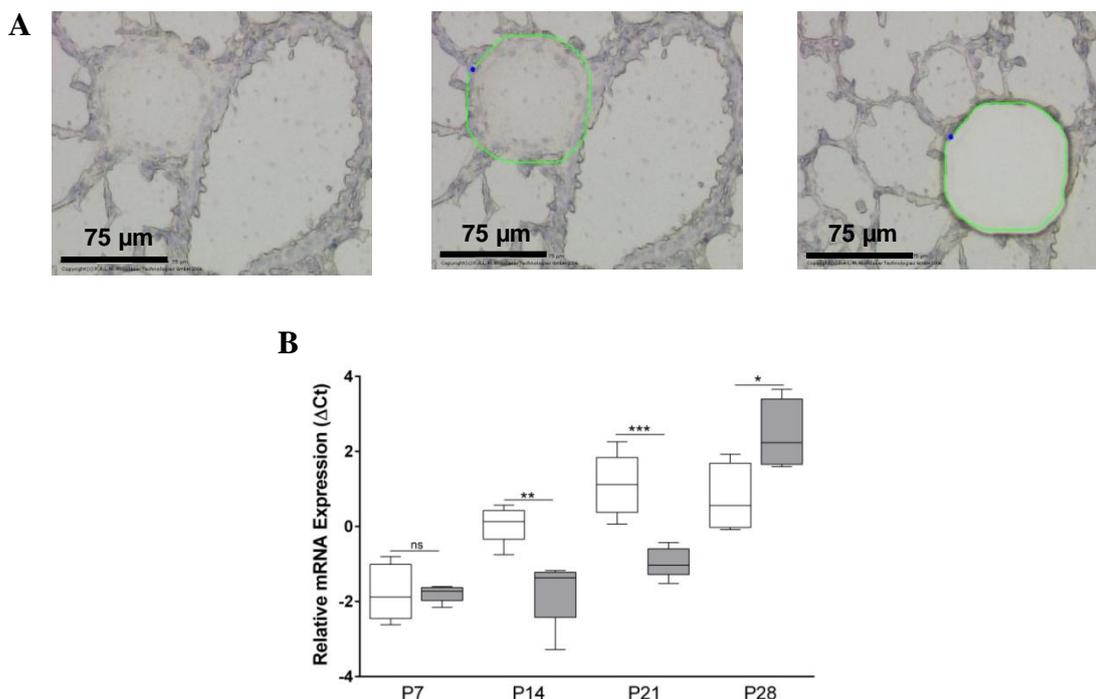


Abbildung 11: Genexpression von *Tgfb3* in den pulmonalen Gefäßen der Maus.

Blutgefäße wurden mittels Lasermikrodissektion aus murinen Lungengewebschnitten isoliert, und mit Hilfe von real-time RT-PCR wurde die Expression von *Tgfb3* bestimmt. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen eines Blutgefäßes vor und nach der Mikrodissektion (**A**). Ergebnis der real-time RT-PCR Analyse für *Tgfb3* (**B**). Neugeborene Mäuse (P1) wurden für die ersten 7 (P7), 14 (P14), 21 (P21) oder 28 (P28) Tage ihres Lebens entweder 21 % O₂ (weiße Boxen) oder 85 % O₂ (graue Boxen) ausgesetzt. Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant.

Die Analyse der mRNA Expression mittels quantitativer real-time RT-PCR ergab, dass *Tgfb β 3* in den pulmonalen Gefäßen der Maus unter hyperoxischen Bedingungen zwischen den Zeitpunkten P14 und P21 signifikant reduziert war. Im adulten Stadium (P28) ergab sich jedoch eine erhöhte Expression von *Tgfb β 3* (siehe Abb. 11B).

4.6 Veränderte Zelleigenschaften von HPASM-Zellen nach *Knockdown* von TGFBR3

Da nur ein TGFBR3- und nicht TGFBR2- oder ENG-*Knockdown* zu Veränderungen in der Proliferationsfähigkeit von HPASM-Zellen führte (Abb.: 9), sollte nun durch detaillierte *in vitro* Experimente der Einfluss von TGFBR3 auf die Gefäßentwicklung genauer untersucht werden.

4.6.1 Erhöhte Proliferation von HPASM-Zellen

Der siRNA vermittelte *Knockdown* von TGFBR3 wurde auf mRNA Ebene mittels quantitativer real-time RT-PCR (Abb.: 12A) und auf Proteinebene mittels Western Blot bestätigt (Abb.: 12B). Der *Knockdown* führte in den HPASM Zellen zu einer Akkumulierung des Proliferationsmarkers PCNA (Abb.: 12B).

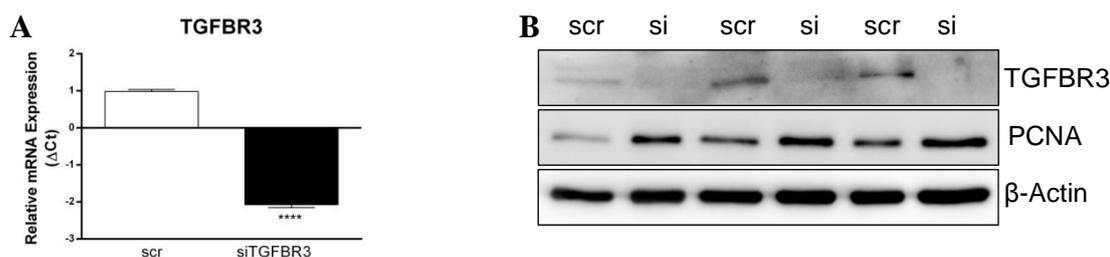


Abbildung 12: SiRNA vermittelter *Knockdown* von TGFBR3 in HPASM Zellen.

Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA (si) spezifisch für TGFBR3 für 72 h transfiziert. Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer real-time RT-PCR analysiert (**A**). Als negativ Kontrolle wurde scrambled siRNA (scr) eingesetzt, und als Referenzgen diente HPRT. Die Proteinexpression von TGFBR3 und PCNA wurde mittels Immunoblot bestimmt (**B**). Die Zahl der biologischen Replikate beträgt 3. Als Ladekontrolle wurde β -Actin eingesetzt. Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: **** $p < 0,0001$.

Eine detailliertere Analyse der Proliferationserhöhung von HPASM-Zellen durch den TGFBR3-*Knockdown* wurde dann durch den Einbau von Bromdesoxyuridin

durchgeführt. In Abb. 9 ist zu erkennen, dass sich die Proliferationsrate der Zellen durch den siRNA vermittelten *Knockdown* von TGFBR3 in ansonsten unbehandelten Zellen (UT) mehr als verdoppelte. Eine Stimulation der Zellen mit PDGF, TGF- β oder mit beidem führte weiterhin zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation von Zellen, die mit siRNA gegen TGFBR3 transfiziert wurden, gegenüber den Zellen, die mit der negativen siRNA-Kontrolle (scrambled) transfiziert wurden. Lediglich die Stimulation mit PDGF führte zu einer Reduzierung des Proliferationsanstiegs in Zellen mit TGFBR3 *Knockdown* im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Auch eine zusätzliche Stimulation mit TGF- β konnte diese Reduzierung des Proliferationsanstiegs durch PDGF nicht signifikant verändern.

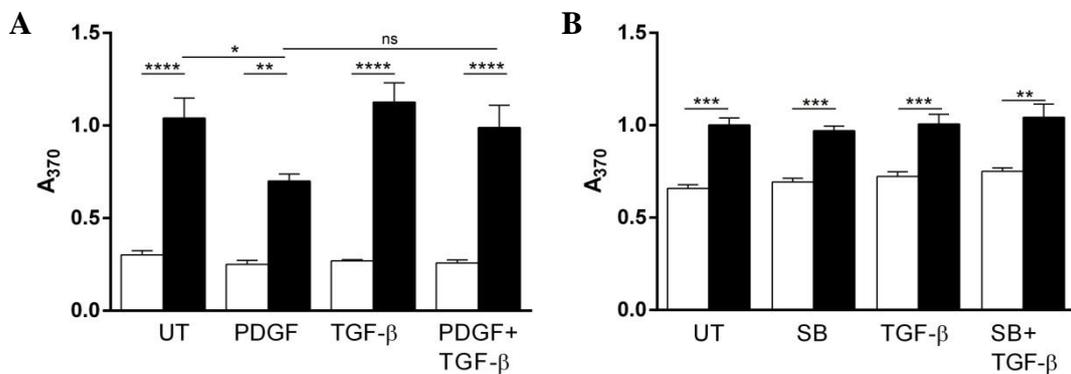


Abbildung 13: Proliferation von glatten Muskelzellen der humanen Pulmonalarterie (HPASM) nach *Knockdown* von TGFBR3.

Bestimmung der Proliferationsrate durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU). Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR3 (schwarze Balken) bzw. mit scrambled siRNA Kontrolle (weiße Balken) für 72 h transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit PDGF (20 ng/ μ l), TGF- β (2 ng/ml), PDGF + TGF- β (A) bzw. mit SB431542 (SB; 10 μ M), TGF- β (2 ng/ml) SB431542 + TGF- β (B) stimuliert. Ebenfalls nach 48 h wurde BrdU nach Herstellerangaben dem Zellmedium hinzugefügt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm mit einer Kontrollwellenlänge von 490 nm gemessen. Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, ns = nicht signifikant.

Um zu analysieren, ob die Proliferationserhöhung von HPASM-Zellen nach TGFBR3-*Knockdown* durch eine Veränderung des TGF- β -Signalwegs hervorgerufen wurde, wurde der TGFBR2 spezifische Inhibitor SB431542 eingesetzt. Abbildung 13B ist zu entnehmen, dass eine Blockierung des TGFBR2-vermittelten Signalwegs über SMAD2/3 zu keiner Veränderung des Proliferationsanstiegs durch TGFBR3-*Knockdown* führte. Auch eine Stimulation der HPASM-Zellen mit TGF- β bei gleichzeitiger Gabe des TGFBR2-spezifischen Inhibitors hatte keine Veränderung zur Folge (Abb.: 13B).

4.6.2 Erhöhte Migration von HPASM-Zellen

Die Migration von HPASM Zellen ist neben der Proliferation eine weitere wichtige funktionelle Zelleigenschaft, die z.B. bei der Angiogenese eine wichtige Rolle spielt. Um zu analysieren, ob ein TGFBR3 *Knockdown* ebenfalls ein Effekt auf diesen zellulären Prozess hat, wurde ein Migrationsexperiment mit Hilfe der *Boyden*-Kammer durchgeführt, bei dem die Zellen durch eine Membran nach einem chemotaxischen Reiz wandern.

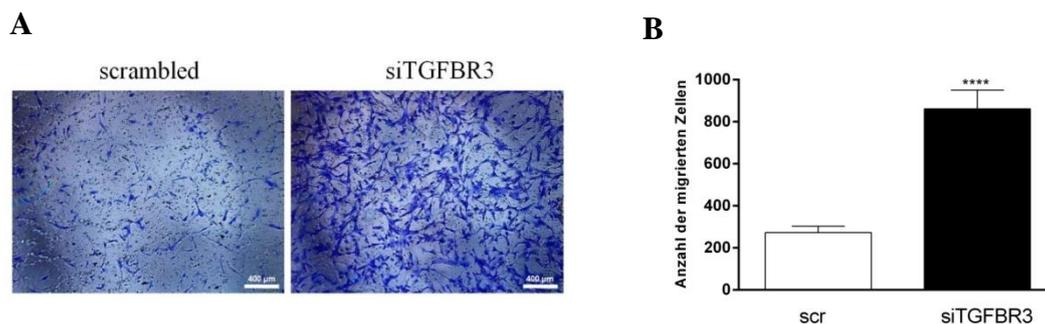


Abbildung 14: Migration von HPASM Zellen nach Knockdown von TGFBR3.

Transwell Migration nach Boyden von HPASM Zellen nach Knockdown von TGFBR3. Mikroskopische Aufnahme der Membran mit den gewanderten Zellen (A). Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR3 (schwarze Balken) bzw. mit scrambled (scr) siRNA Kontrolle (weiße Balken) für 24 h transfiziert (B). Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: **** p<0,0001.

Abbildung 14A ist zu entnehmen, dass ein TGFBR3-*Knockdown* zu einem drastischen Anstieg der Migrationsfähigkeit von HPASM-Zellen führt, erkennbar an den Kristallviolett gefärbten Zellen auf der Membranunterseite der *Boyden*-Kammer, die die migrierten Zellen enthält. Die Auszählung ergab einen signifikanten Anstieg der Migration um mehr als das Vierfache (Abb.: 14B) .

4.7 Einfluss von Hyperoxie auf die Zelleigenschaften von HPASM-Zellen.

Die Auswirkungen von Hyperoxie auf die Genexpression und auf Zelleigenschaften wie Proliferation und Apoptose von HPASM-Zellen wurde analysiert, indem die HPASM-Zellen für 24 h, 48 h bzw. 72 h 85 % Sauerstoff ausgesetzt wurden. Die Genexpression von TGFBR3 wird durch 24 h, 48 h und 72 h Hyperoxie um durchschnittlich 0,5 bis 1,5 Δ Ct signifikant erhöht (Abb.: 15A). Im Gegenzug wird die

Genexpression des Proliferationsmarkers KI67 in den gleichen Zeiträumen um -1 bis -3 Δ Ct signifikant erniedrigt (Abb.: 15B).

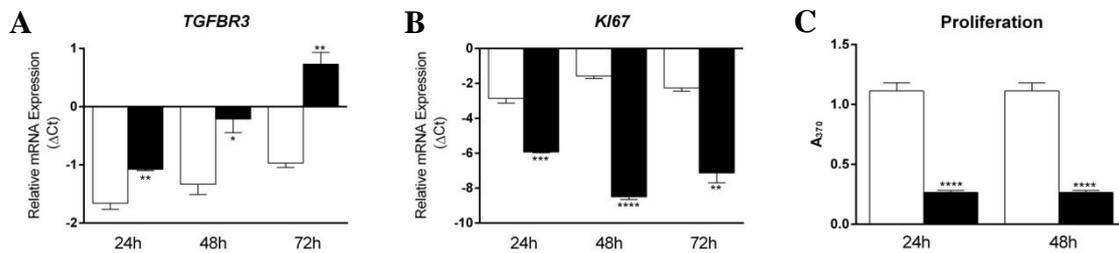


Abbildung 15: Einfluss von Hyperoxie auf die Zelleigenschaften von HPASM-Zellen.

Die HPASM-Zellen wurden für 24 h, 48 h bzw. 72 h entweder 21 % O₂ (weiße Balken), oder 85 % O₂ (schwarze Balken) ausgesetzt. Quantitative real-time RT-PCR für TGFBR3 (A) bzw. KI67 (B). Bestimmung der Proliferationsrate durch Einbau von BrdU (C). Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001.

In Abbildung 15C ist zu erkennen, dass die durch den Einbau von BrdU gemessene Proliferation der HPASM-Zellen unter Hyperoxie um mehr als 50 % reduziert ist.

4.8 ERK1/2 Phosphorylierung nach TGFBR3 Knockdown

Da der durch den *Knockdown* von TGFBR3 hervorgerufene Effekt des Anstieges der Proliferation von HPASM-Zellen nicht TGF- β -vermittelt war (Abb.: 13B), wurden Smad-Protein-unabhängige Signalwege analysiert, von denen bekannt ist, dass sie durch TGF- β Rezeptor Signale aktiviert werden können.

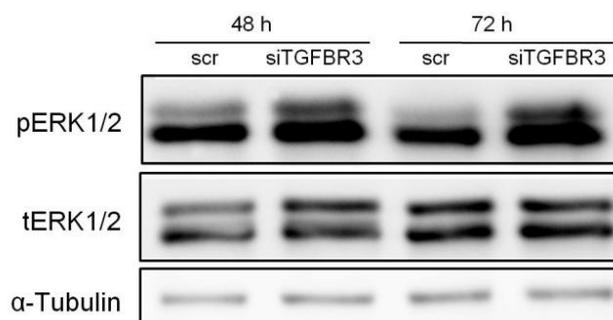


Abbildung 16: Phosphorylierung von ERK1/2 nach Knockdown von TGFBR3.

Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR3 für 48 h und 72 h transfiziert. Als negativ Kontrolle wurde scrambled siRNA (scr) eingesetzt. Die Proteinexpression von TGFBR3, phospho-ERK1/2 (pERK1/2) und total-ERK1/2 (tERK1/2) wurde mittels Immunoblot bestimmt. Als Ladekontrolle wurde α -Tubulin eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von TGFBR3 in HPASM-Zellen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von ERK1/2 führte (Abb.:16). Des Weiteren

konnte durch Einsatz des MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) Inhibitors UO126 die Phosphorylierung von ERK1/2 in den HPASM-Zellen, bei denen ein *Knockdown* von TGFBR3 durchgeführt wurde, wie auch in den Kontrollzellen, unterbunden werden (Abb.: 16).

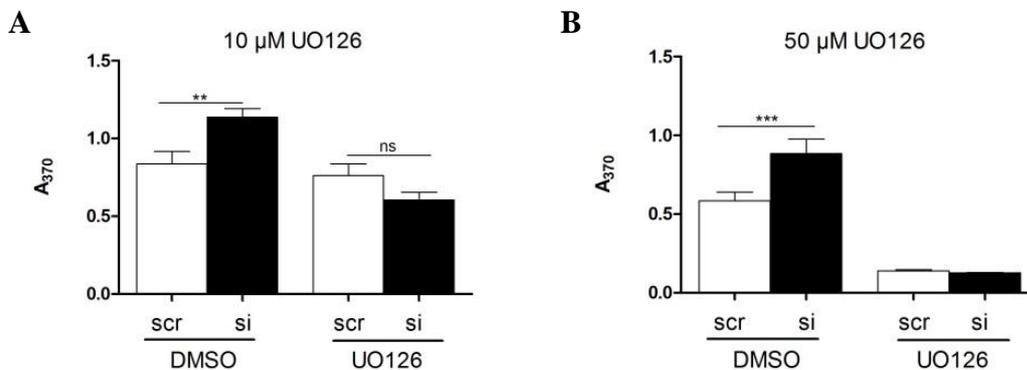


Abbildung 17: Proliferation von HPASM-Zellen nach siRNA vermitteltem *Knockdown* von TGFBR3 und Inhibierung der Phosphorylierung von ERK1/2.

Bestimmung der Proliferationsrate durch Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU). Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR3 (schwarze Balken) bzw. mit scrambled siRNA Kontrolle (weiße Balken) für 24 h, in der Gegenwart von 10 µM DMSO oder UO126 (A) oder von 50 µM DMSO oder UO126 (B), transfiziert. Nach 24 h wurde BrdU nach Herstellerangaben für weitere 24 h dem Zellmedium hinzugefügt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm mit einer Kontrollwellenlänge von 490 nm gemessen. Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ns = nicht signifikant.

Der Anstieg der Proliferationsrate von HPASM-Zellen nach einem *Knockdown* von TGFBR3 konnte durch die Gabe von 10 µM des MAPK-Inhibitors UO126 unterbunden werden (Abb.: 17A). Die Verwendung von 50 µM UO126 führte zu einem vollständigen Proliferationsstopp, sowohl der *scrambled* als auch der siRNA transfizierten HPASM-Zellen (Abb.: 17B)

4.9 Identifikation von ADAMTS5 und ADAMTS9 als mögliche Kandidatengene durch eine *Microarray*-Analyse

Im Folgenden wurde weiter untersucht welche Gene in ihrer Expression durch den *Knockdown* von TGFBR3 in HPASM-Zellen beeinflusst wurden. Dazu wurde ein *Knockdown* von TGFBR3 in HPASM-Zellen für 24 h und 48 h durchgeführt. Anschließend erfolgte eine cDNA-*Microarray*-Analyse. Die Ergebnisse dieser Analyse befinden sich in den Tabellen 7 und 8 im Anhang. Da von ADAMTS9 bekannt

ist, dass es als anti-angiogenetische Metalloproteinase von mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird (76), sollte mittels quantitativer *real-time* PCR Analyse überprüft werden, ob die verminderte Expression von ADAMTS5 und ADAMTS9 nach *Knockdown* von TGFBR3 in HPASM-Zellen, wirklich vorlag.

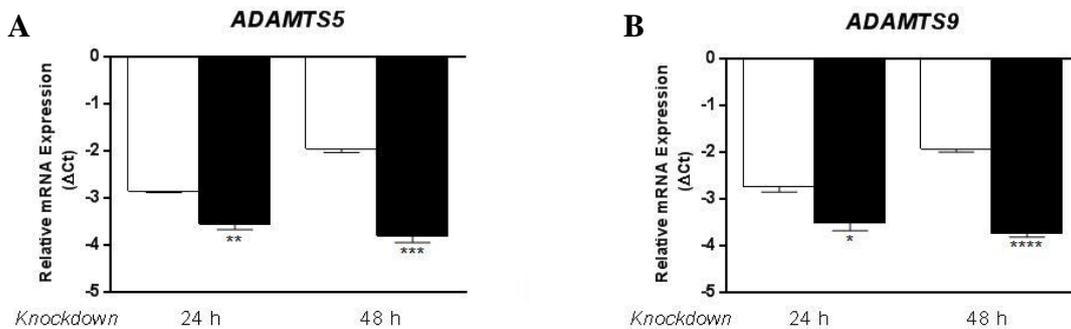


Abbildung 18: Genexpression von ADAMTS5 und ADAMTS9 nach *Knockdown* von TGFBR3.

HPASM-Zellen wurden mit 200 nM siRNA, spezifisch für TGFBR3 (schwarze Balken) bzw. mit Kontroll-siRNA (weiße Balken) für 24 h und 48 h transfiziert. Die Genexpression von ADAMTS5 (A) und ADAMTS9 (B) wurde mittels real-time RT-PCR analysiert. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die Überprüfung der Microarray-Analyse erbrachte, dass die Genexpression ADAMTS5 und ADAMTS9 nach *Knockdown*, sowohl für 24 h als auch für 48 h, von TGFBR3 in HPASM-Zellen erniedrigt war (Abb.: 18A und B).

4.10 Überexpression von TGFBR3 sowie einzelner Domänen

Die antiproliferative Wirkung von TGFBR3 auf HPASM-Zellen sollte durch Überexpression des Volllängen-Rezeptors sowie durch Trunkierungen detaillierter studiert werden. Da vorherige Versuche gezeigt hatten, dass eine Plasmidtransfektion von HPASM-Zellen praktisch nicht möglich war (siehe Abb. 7) wurden nun lentivirale Partikel generiert, um eine hohe Transduktionsrate der Zellen zu erreichen. In Abbildung 19 sind die verschiedenen lentiviralen Überexpressionskonstrukte dargestellt. Die Konstrukte wurden in den lentiviralen Expressionsvektor pLENTI7.3/V5-DEST kloniert (Vektorkarte im Anhang). Dieser Vektor führt zur gleich-

zeitigen Expression des GFP-Proteins unter dem SV40-Promotor, was eine Überprüfung der viralen Transduktion erlaubte.

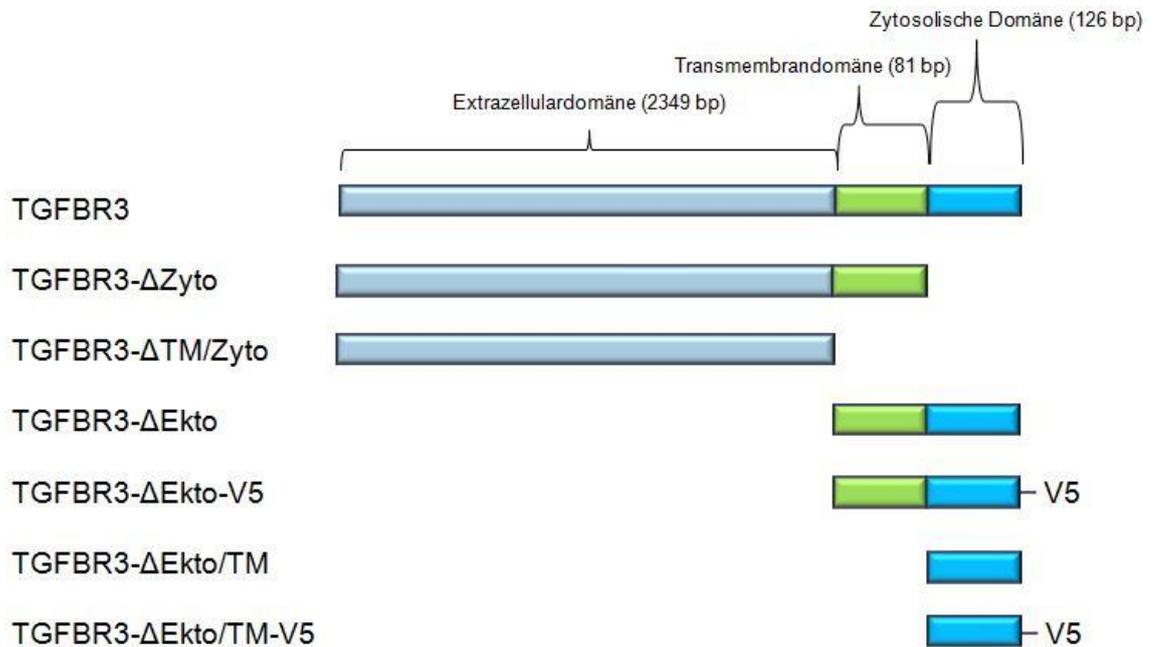


Abbildung 19: Schematische Abbildung der generierten lentiviralen TGFBR3 Konstrukte.

Alle Konstrukte wurden in den lentiviralen Expressionsvektor pLENTI7.3/V5-DEST kloniert. Deletionen sind mit Δ gekennzeichnet. TM = Transmembrandomäne, Zyto = zytoplasmatische Domäne, Ekto = Extrazellulär Domäne, V5 = Epitop-Tag.

Die Überexpression des Vollängen-Rezeptors TGFBR3 führte zu einem starken Anstieg der Apoptose der HPASM-Zellen. Dies ist in Abbildung 19 (Reihe A und B) an der geringeren Zellzahl im Vergleich zu den Zellen die mit dem leeren Vektor (EV) transduziert wurden, zu erkennen. Auch die Überexpression der Trunktionen TGFBR3-ΔTM/Zyto bzw. TGFBR3-ΔZyto führte zu einer Verringerung der Zellzahl (Abb.: 19 Reihe A und B)

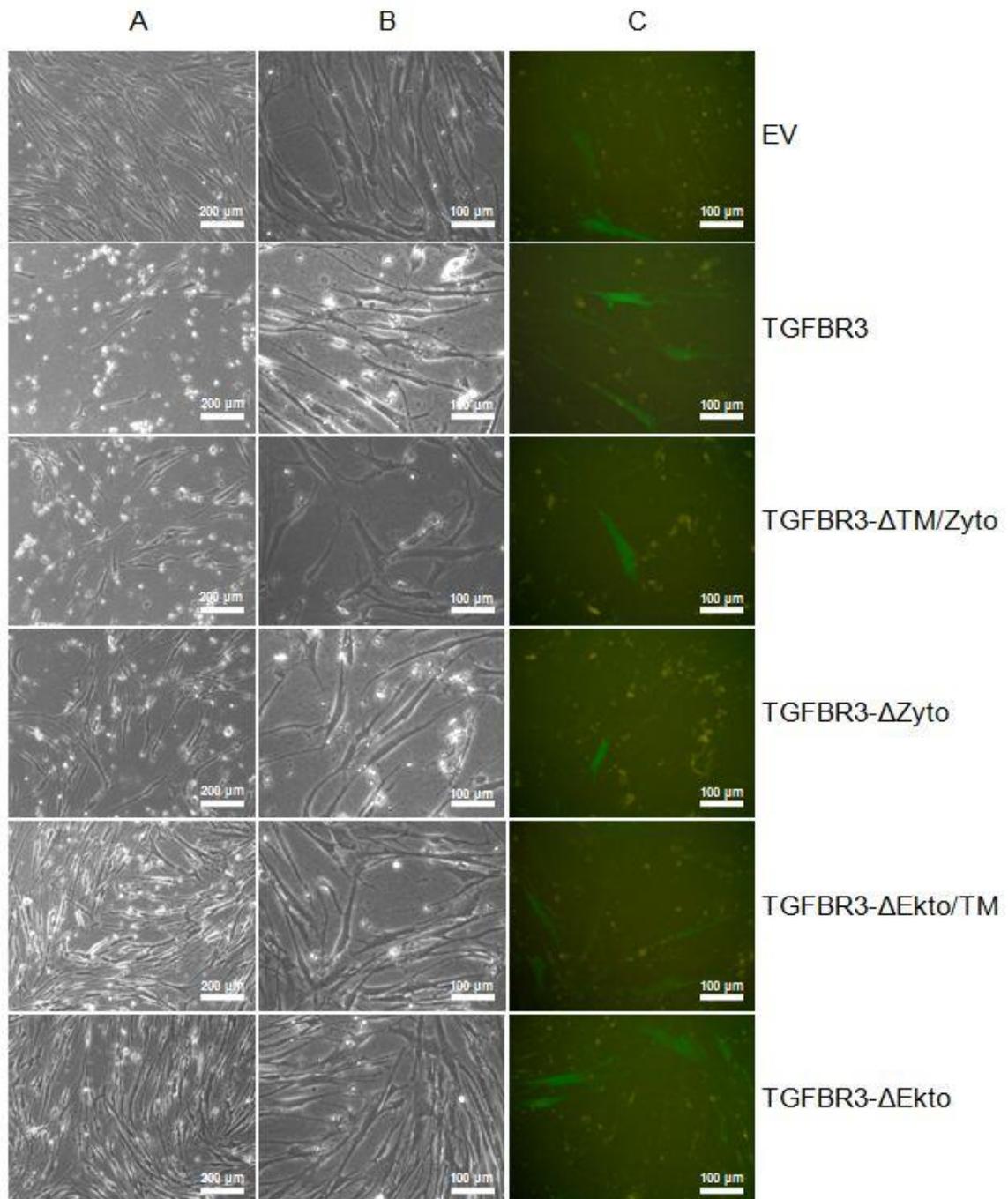


Abbildung 20: Überexpression von TGFBR3 und Trunktionen in HPASM-Zellen.

Mikroskopische Durchlichtaufnahme (A und B) sowie Fluoreszenzaufnahmen (C) von transduzierten HPASM-Zellen.

Die Überexpression der Konstrukte TGFBR3- Δ Ekto/TM bzw. TGFBR3- Δ Ekto führte hingegen zu keinem Anstieg der Apoptose im Vergleich zu den Kontrollzellen (EV). Dass alle Konstrukte in die HPASM-Zellen transduziert wurden, war an der GFP-Expression (Abb.: 20 Reihe C) zu erkennen, auch wenn diese nur schwach ausgeprägt war.

Die Überexpression der Konstrukte konnte bis auf TGFBR3- Δ Ekto/TM im Immunoblot bestätigt werden (Abb.: 20).

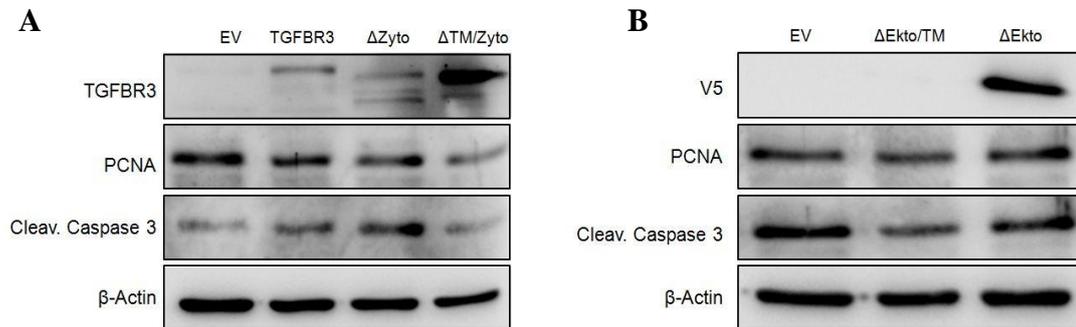


Abbildung 21: Proliferation und Apoptose von HPASM-Zellen nach Überexpression von TGFBR3 und Trunktionen.

Die Zellen wurden für 96 h mit Viren für eine Überexpression von TGFBR3 bzw. Trunktionen, in der Gegenwart von 8 μ g/ml Polybrene transduziert. Als negativ Kontrolle wurde ein "leerer" Vektor (EV) eingesetzt. Die Proteinexpression von TGFBR3, PCNA, Cleaved Caspase 3 (Cleav. Caspase 3) und V5 wurde mittels Immunoblot bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β -Actin eingesetzt.

Der Proliferationsmarker PCNA war im Vergleich zu den mit Kontrollvektor transduzierten Zellen in den Zellen, die mit dem Volllängen-Rezeptor (TGFBR3) bzw. denen, die mit den Trunktionen TGFBR3- Δ Zyto und TGFBR3- Δ TM/Zyto transduziert wurden, erniedrigt (Abb.: 21A). Die Überexpression von TGFBR3- Δ Ekto/TM bzw. TGFBR3- Δ Ekto führte zu keiner reduzierten Expression von PCNA (Abb.: 21B). Die Induktion der Apoptose durch Überexpression der verschiedenen Konstrukte wurde anhand der Teilung des Proteins Caspase 3 (*cleaved caspase 3*) analysiert. Vor allem die Überexpression von TGFBR3 wie auch die Überexpression von TGFBR3- Δ Zyto führte zu einem Anstieg von Caspase 3 (Abb.: 21A). Durch die Überexpression von TGFBR3- Δ TM/Zyto, TGFBR3- Δ Ekto/TM bzw. TGFBR3- Δ Ekto konnte kein Anstieg von Caspase 3 verzeichnet werden (Abb.: 21A und B).

4.11 Veränderte Zelleigenschaften von humanen pulmonalarteriellen Endothel-(HPAE) Zellen

Um den Einfluss von TGFBR3 auf die Gefäßentwicklung noch detaillierter zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente mit humanen pulmonalarteriellen Endothel-(HPAE) Zellen durchgeführt. Dabei wurden zunächst die Auswirkungen eines siRNA-vermittelten *Knockdowns* von TGFBR3 auf Zelleigenschaften wie Proliferation, Migration und "Tube"-Formierung analysiert.

4.11.1 Knockdown von TGFBR3 in HPAE-Zellen

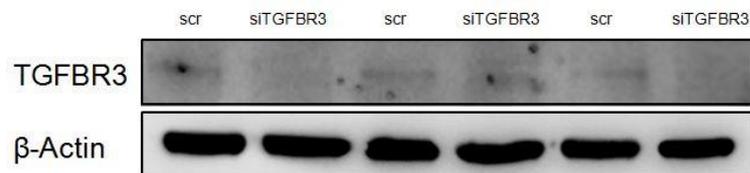


Abbildung 22: SiRNA vermittelter *Knockdown* von TGFBR3 in HPAE Zellen.

Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR3 für 24 h transfiziert. Als negativ Kontrolle wurde scrambled siRNA (scr) eingesetzt. Die Proteinexpression von TGFBR3 wurde mittels Immunoblot bestimmt. Als Ladekontrolle wurde β-Actin eingesetzt.

In Abbildung 22 ist zu erkennen kann, dass TGFBR3 in HPAE-Zellen nur sehr schwach exprimiert ist. Dennoch war es möglich, die Expression von TGFBR3 durch einen siRNA vermittelten *Knockdown* zu reduzieren.

4.11.2 Erhöhte Proliferation von HPAE-Zellen

Zunächst sollte analysiert werden, ob ein *Knockdown* von TGFBR3 auf HPAE-Zellen ebenfalls zu einem Proliferationsanstieg führte, so wie dies bei HPASM-Zellen zu beobachten war.

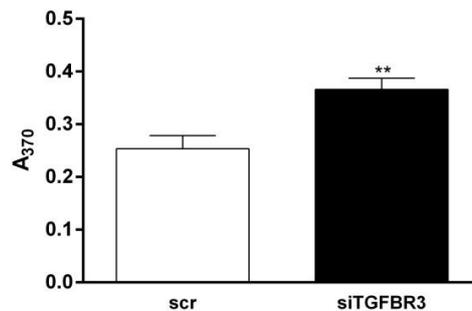


Abbildung 23: Proliferation von HPAE Zellen nach *Knockdown* von TGFBR3.

Bestimmung der Proliferationsrate durch Einbau von Bromdesoxyuridin. Die Zellen wurden mit 200 nM siRNA spezifisch für TGFBR3 (schwarze Balken) bzw. mit scrambled siRNA Kontrolle (weiße Balken) für 24 h transfiziert. Dann wurde für weitere 24 h BrdU nach Herstellerangaben dem Zellmedium hinzugefügt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 370 nm mit einer Kontrollwellenlänge von 490 nm gemessen. Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert: ** $p < 0,01$.

In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass auch in HPAE-Zellen, der *Knockdown* von TGFBR3 zu einem Anstieg der Proliferation dieser Zellen führte.

4.11.3 Reduzierte *in vitro* "Tube" Formierung von HPAE-Zellen

Einer der am weitesten verbreiteten *in-vitro* Tests zur Nachahmung der Angiogenese ist der "Tube"-Formierungstest. Der Test misst die Fähigkeit von Endothelzellen, hier HPAE Zellen, mit Hilfe eines extrazellulären Matrix-Trägermaterials (Matrigel), kapillarähnliche Strukturen (*Tubes*) mit Lumen zu bilden. Der Test kann verwendet werden, um Inhibitoren oder Stimulatoren der Angiogenese sowie Gene und Signalwege zu identifizieren, die an der Angiogenese beteiligt sind.

Um zu testen, ob TGFBR3 essentiell ist für die Fähigkeit von HPAE-Zellen "Tubes" auszubilden, wurde ein TGFBR3-*Knockdown* in diesen Zellen durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass die HPAE-Zellen mit TGFBR3-*Knockdown* (Abb. 24B) nicht mehr in der Lage sind, so viele kapillarähnliche Strukturen zu bilden, wie die HPAE-Zellen, die mit Kontroll-siRNA behandelt wurden (Abb. 24A).

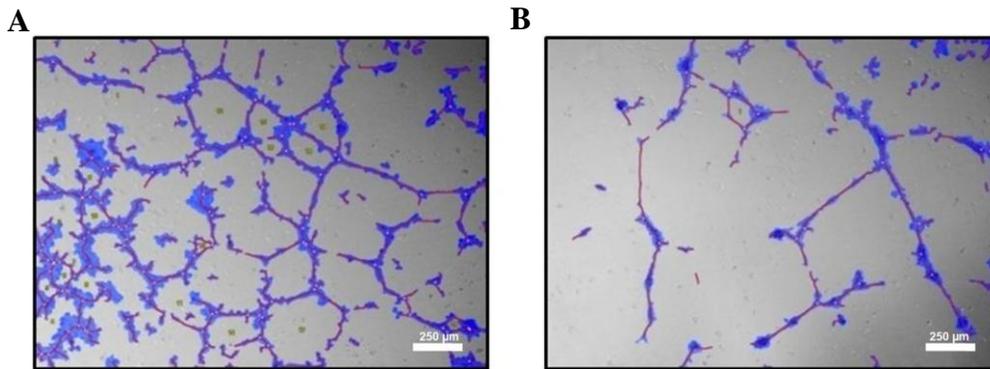


Abbildung 24: Tube-Formierung von HPAE-Zellen nach *Knockdown* von TGFBR3.

In-vitro Tubeformierung auf Matrigel-Platten von HPAE Zellen, transfiziert mit *scrambled* siRNA Kontrolle (A) bzw. TGFBR3 siRNA (B). Die blauen und roten Linien wurden zur Auswertung von der WIMASIS Software über die entstandenen Kapillarstrukturen gelegt.

Die statistische Auswertung ergab, dass 48 h nach dem *Knockdown* von TGFBR3, HPAE-Zellen nur vermindert in der Lage sind, kapillarähnliche Strukturen auszubilden.

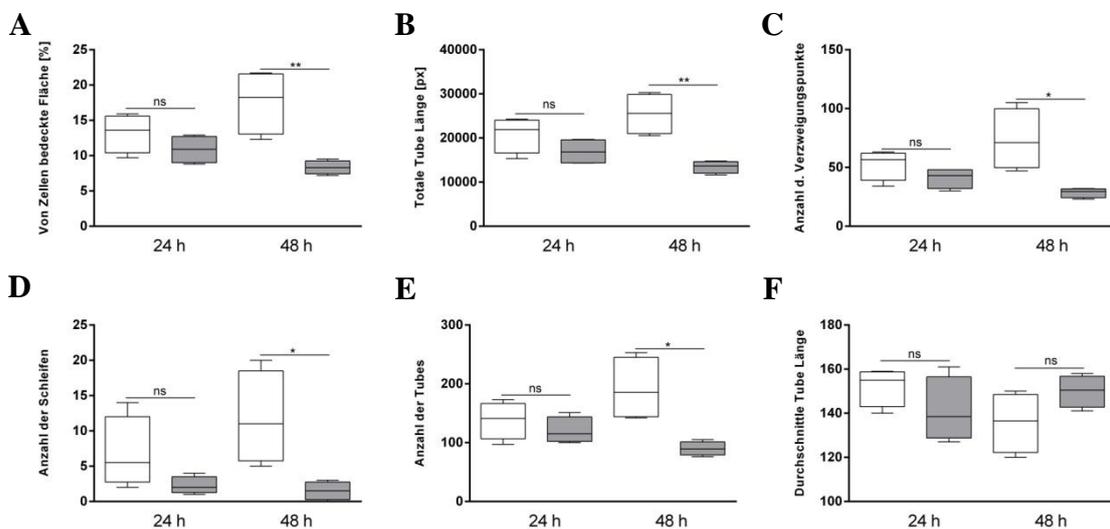


Abbildung 25: Tubeformierung von HPAE-Zellen nach siRNA vermitteltem *Knockdown* von TGFBR3

HPAE-Zellen wurden mit 200 nM scrambled siRNA Kontrolle (weiße Boxen) bzw. mit TGFBR3 spezifischer siRNA (graue Boxen) für 24 h transfiziert und anschließend für 24 h auf einer Matrigel beschichteten Platte ausgesät. Mit Hilfe der WIMASIS Software wurden folgende Parameter analysiert: Die von Zellen bedeckte Fläche (A), die Länge der Tubes (B), die Anzahl der Verzweigungspunkte (C), die Anzahl der Schleifen (D), die Anzahl der Tubes (E) sowie die durchschnittliche Länge der Tubes (F). Daten werden präsentiert, als Mittelwert mit Standardabweichung: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns = nicht signifikant.

In Abbildung 25 ist zu erkennen, dass sowohl die von "Zellen bedeckte Fläche" (A), die "Totale *Tube* Länge" (B), die "Anzahl der Verzweigungen" (C), die Anzahl der ausgebildeten "Schleifen" (D) und die "Anzahl der *Tubes*" (E) nach 48 h signifikant erniedrigt ist. Lediglich die "durchschnittliche *Tube* Länge" blieb über den gesamten Zeitraum unverändert (F).

5 Diskussion

BPD ist eine multifaktorielle Erkrankung, die auf Verletzungen (z.B. Sauerstofftoxizität, Barotrauma, Volutrauma und Infektionen) der unreifen Lunge beruht. Besonders anfällig für die Entwicklung einer BPD sind Kleinkinder, die in einem frühen Stadium der Entwicklung der Lunge, also in der späten kanalikulären oder in der frühen sakkulären Phase, geboren werden. Zu diesem Zeitpunkt hat die Lunge erst damit begonnen, die distalen Lufträume und die Mikrozirkulation auszubilden, die es postnatal ermöglichen, den Gasaustausch effektiv durchzuführen. Durch eine Frühgeburt wird die normale Abfolge der Lungengefäßentwicklung gestört, wahrscheinlich als Folge von Veränderungen komplexer Signalkaskaden zwischen dem alveolären Epithel, dem benachbarten Mesenchym und den pulmonalen Kapillaren. Hyperoxische Verletzungen des Epithels können somit kritische Signalwege stören und eine korrekte Angiogenese verhindern. Darüber hinaus kann auch eine direkte Schädigung des Gefäßsystems auftreten und die Angiogenese negativ beeinflussen, so dass nachfolgend auch die Alveolarisierung beeinträchtigt wird. Das Definieren von kritischen Faktoren in der Lunge, die an der Angiogenese und Alveolarisierung beteiligt sind, ist somit von entscheidender Bedeutung bei der Entwicklung von therapeutischen Interventionen.

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle der TGF- β Rezeptoren in der pulmonalen Gefäßentwicklung im Kontext der sauerstoffgeschädigten Lunge analysiert.

5.1 Dysregulation der TGF- β -Rezeptoren im Mausmodell der BPD

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass alle fünf TGF- β Rezeptoren (*Acvrl1*, *Tgfb1*, *Tgfb2*, *Tgfb3* und *Eng*) unter hyperoxischen Bedingungen (85 % O₂) im Mausmodell der BPD dysreguliert sind (Abb.: 5).

Das hyperoxische Mausmodell der BPD ist dahingehend ein gutes Tiermodell für die Pathologie der humanen BPD, da die murine Alveolarisierung erst am postnatalen Tag 3 (P3) beginnt und die sakkuläre Unterteilung erst am postnatalen Tag 14 (P14) abgeschlossen ist (77). Diese Sequenz und die relative zeitliche Abfolge rekapituliert die humane Lungenentwicklung sehr gut. Des Weiteren konnte in ande-

ren Studien gezeigt werden, dass es bei längerer Exposition von neugeborenen Mäusen mit Hyperoxie zu einem dysplastischen Lungenwachstum mit verminderter Alveolarisierung, erhöhter Kollagenablagerung und vermehrter interstitieller Verdickung führt (75). Darüberhinaus haben die sauerstoffexponierten Tiere ein verringertes Lungenvolumen, eine verringerte pulmonale *Compliance* sowie verringerte inspiratorische und expiratorische Flussraten (75). Die anatomischen und funktionellen Veränderungen bei neugeborenen Mäusen unter einer chronischen Hyperoxie sind somit denen bei Säuglingen mit BPD sehr ähnlich.

Die in der vorliegenden Studie gezeigte Dysregulation der TGF- β -Rezeptoren im Mausmodell der BPD, stellt daher einen wichtigen Zusammenhang zwischen der TGF- β Signalkaskade und der postnatalen Lungenentwicklung her. Dass TGF- β von enormer Wichtigkeit für die postnatale Lungenentwicklung ist, ist bereits seit längerem bekannt. So führt zuviel TGF- β (z.B. durch Überexpression des *Tgfb1* Gens) in der postnatalen Lungenentwicklung der Maus zwischen P7 und P14 zu einem Arrest der Lungenentwicklung durch eine gestörte Alveolarisierung (40). Daher geht man davon aus, dass TGF- β ein negativer Regulator der postnatalen Lungenentwicklung ist. Jedoch gibt es auch Daten, die darauf hindeuten, dass TGF- β notwendig für eine normale postnatale Lungenentwicklung ist. So führt ein *Smad3-Knockout* in der Maus zwischen P7 und P28 zu einem ähnlichen Phänotyp wie dem der Überexpression von *Tgfb1* (78). Dies zeigt, dass TGF- β auch ein positiver Regulator der Alveolarisierung ist. Dies deutet darauf hin, dass die TGF- β Signalkaskade in einem Gleichgewicht während der postnatalen Lungenentwicklung gehalten werden muss, da weder zu wenig noch zu viel TGF- β -Signalisierung zu einer normalen Lungenentwicklung führt. Nicht nur die Expression der TGF- β Liganden, sondern auch die Expression der TGF- β Rezeptoren kann die Stärke der TGF- β Signalisierung beeinflussen.

Da es in der vorliegenden Studie hauptsächlich um die Gefäßentwicklung geht, gilt es hier anzumerken, dass es bereits bekannt ist, dass die TGF- β -Rezeptoren ACVRL1 und ENG wichtig für eine normale Blutgefäßentwicklung sind, da Mutationen in diesen Rezeptoren beim Menschen zu einer Krankheit führen, die unter dem Namen hereditäre hämorrhagische Teleangiektasie (HHT) bekannt ist (34, 35). HHT ist eine autosomal dominant vererbte Krankheit, bei der es zu einer krankhaften Weitung der Blutgefäße kommt.

Des Weiteren ist in Bezug auf die Blutgefäßentwicklung bekannt, dass die TGF- β Rezeptoren *Acvr11*, *Tgfb1*, *Tgfb2* und *Eng* wichtig für die Vaskulogenese und Angiogenese sind. So konnte durch *Knockout*-Studien gezeigt werden, dass *Tgfb2-Knockout*-Mäuse nicht in der Lage sind, den primären vaskulären Plexus in ein vaskuläres Netzwerk umzubauen (79). Die genetische Ablation von *Tgfb1* führt zu einem Versterben der Embryonen zwischen den Tagen E10,5 und E11,5. Die *Tgfb1-Knockout*-Mäuse zeigen eine Missbildung des Gefäßnetzwerks im Dottersack (80). Auch die *Acvr11*- und *Eng-Knockout*-Mäuse sterben schon während der Embryonalentwicklung am Tag E11,5. Sie zeigen Defekte in der Angiogenese durch eine verschlechterte Entwicklung der vaskulären glatten Muskelzellen und einem Arrest des endothelialen Umbaus (*endothelial remodelling*) (34, 69). Der *Knockout* des akzessorischen TGF- β -Rezeptors *Tgfb3* führt erst einige Tage später (E14,5) zum Versterben der Embryonen, wenn es darauf ankommt, dass funktionelle Koronargefäße für die Lebensfähigkeit des Embryos erforderlich werden. Diese sind in der *Knockout*-Maus nur unzureichend ausgebildet (81).

Jedoch beschäftigen sich diese Studien alle mit der allgemeinen embryonalen Gefäßentwicklung. Hingegen ist über die Rolle der TGF- β -Rezeptoren bei der Blutgefäßentwicklung während der postnatalen Lungenentwicklung wenig bekannt.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *Tgfb3* nicht nur in den Lungenhomogenaten unter hyperoxischen Bedingungen herunterreguliert ist, sondern, dass dies auch auf die pulmonalen Gefäße zutrifft. Durch Lasermikrodissektion konnte gezeigt werden, dass zwischen den postnatalen Tagen 14 und 21 die Expression von *Tgfb3* unter hyperoxischen Bedingungen erniedrigt und am Tag 28 erhöht ist (Abb.: 11). Das durch die Lasermikrodissektion gewonnene Material umfasste hauptsächlich Endothel- und glatte Muskelzellen sowie Perizyten. Die erniedrigte Expression von *Tgfb3* zwischen P14 und P21 tritt in der Phase der mikrovaskulären Reifung auf, also die Umwandlung des Doppelkapillarnetzwerks zu einem einlagigen Kapillarnetzwerk in den Alveolarsepten. Während dieser Phase werden von röhrenähnlichen Strukturen mit Lumen, die von Endothelzellen ausgebildet werden, unterstützende Zellen, hauptsächlich Perizyten und glatte Muskelzellen, rekrutiert (82). Eine erniedrigte Expression von *Tgfb3* zu diesem Zeitpunkt kann somit einen wichtigen Einfluss auf die Gefäßbildung haben, indem es zu einer Veränderung der Zelleigenschaften von glatten Muskelzellen und/oder Endothelzellen führt.

5.2 Veränderung der Zelleigenschaften humaner pulmonalen Blutgefäßzellen

Die Auswirkungen einer Dysregulation in der Expression der TGF- β -Rezeptoren wurde in der vorliegenden Studie anhand von Überexpressions- und *Knockdown*-Studien in humanen glatten pulmonalarteriellen Muskelzellen sowie in humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen analysiert.

Die Überexpression der fünf TGF- β Rezeptoren führte aufgrund einer zu geringen Transfektionsrate der primären HPASM-Zellen zu keinem aussagekräftigem Ergebnis (Abb.: 7). Es ist bekannt, dass die beiden Typ-I-TGF- β -Rezeptoren ACVRL1 und TGFBR1 eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielen (83-85) und diese beiden Rezeptoren eine Art Balancekontrolle zwischen Proliferation und Migration von Endothelzellen, also der "aktivierten" Phase und der "Resolutions-" Phase, bei der vermehrt Extrazellulärkomponenten produziert werden, bilden (84, 86). Daher wurden für die vorliegende Studie jeweils konstitutiv-aktive Rezeptorvarianten von ACVRL1 (Q201D) und TGFBR1 (T204D) bzw. die dominant-negative Rezeptorvarianten von ACVRL1 (K229R) und TGFBR1 (K232R) generiert. Obwohl diese Rezeptorvarianten bereits früher verwendet wurden (87-89), konnte deren Funktionalität im Rahmen dieser Studie nicht vollständig validiert werden (Abb.: 6). Lediglich die konstitutiv aktive Form von TGFBR1 führte zu einem leichten Anstieg der *CTGF*-Expression (Abb.: 6B). Die konstitutiv aktive Form von ACVRL1 führte jedoch zu keinem Anstieg der *IDI*-Expression, was daran liegen kann, dass die Rezeptorvariante in die leicht zu handhabenden humane A549 epitheliale Zelllinie transfiziert wurde, die *ACVRL1*-Expression jedoch hauptsächlich auf das Endothel beschränkt ist (90).

Die *Knockdown*-Studien hingegen zeigten auf, dass der akzessorische Typ III TGF- β Rezeptor TGFBR3 eine wichtige Rolle bei den Zellfunktionen Proliferation und Migration von HPASM-Zellen, sowie bei der *Tube*-Formierung von HPAE-Zellen, einnimmt. So konnte gezeigt werden, dass nach einem *Knockdown* von TGFBR3 die Proliferationsrate der transfizierten HPASM-Zellen stark anstieg (Abb.: 9). Dieser Effekt konnte auch nicht durch die Präsenz des TGF- β Liganden TGF- β 1 oder durch die Wirkung des TGFBR2 Inhibitors SB431542 aufgehoben werden (Abb.: 13A und B), was darauf schließen lässt, dass es sich um einen TGF- β -unabhängigen Signalweg handelt, der aktiviert wird, wenn die Rezeptor-

dichte von TGFBR3 in HPASM-Zellen abnimmt. Darüberhinaus wurde auch die Migration der HPASM-Zellen durch den Rezeptor-*Knockdown* drastisch erhöht. Es lässt sich also sagen, dass glatten pulmonalarterielle Muskelzellen in einen "aktivierten" Zustand versetzt werden, wenn die Rezeptordichte von TGFBR3 herabgesetzt wird.

Ebenso wirkte sich der *Knockdown* von TGFBR3 auf die Proliferationsrate transfizierter HPAE-Zellen aus. Auch die Endothelzellen reagierten mit einer erhöhten Proliferation auf einem TGFBR3-*Knockdown* (Abb.: 23). Dies zeigte, dass TGFBR3 eine eindeutig antiproliferative Wirkung in den pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen sowie in den Endothelzellen besaß. Des Weiteren führte der *Knockdown* von TGFBR3 zu einer verringerten Fähigkeit der Endothelzellen zur "Tube"-Formierung (Abb.: 24 und 25).

Die Angiogenese, also die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden, stellt einen mehrstufigen Prozess dar, der grob in zwei Phasen aufgeteilt werden kann. In der "Aktivierungsphase" kommt es zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und zu einem Abbau der Basalmembran, die es ermöglicht, dass Endothelzellen proliferieren und in den extrazellulären Raum migrieren, um neue kapillare Sprossen auszubilden. In der "Resolutionsphase" wird die Proliferation und Migration der Endothelzellen reduziert, die Basalmembran rekonstruiert und die Gefäßreifung gefördert. Es kommt zur Rekrutierung von Perizyten und glatten Muskelzellen, die das neu gebildete Gefäß stabilisieren (91).

Der in dieser Arbeit durch einen *Knockdown* von TGFBR3 beschriebene Anstieg der Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen sowie der Anstieg der Proliferation und die verminderte Fähigkeit von Endothelzellen, kapillarähnliche Strukturen auszubilden, deuteten darauf hin, dass TGFBR3 entscheidend an dem Übergang von der "Aktivierungsphase" in die "Resolutionsphase" während der pulmonalen Angiogenese beteiligt ist. Durch die verminderte Rezeptordichte von TGFBR3 können die Endothelzellen zwar proliferieren, es gelingt ihnen jedoch nicht, kapillarähnliche Strukturen auszubilden. Die Rekrutierung der glatten Muskelzellen kann zwar *in vitro* nicht nachgeahmt werden, jedoch zeigt sich durch den Anstieg der Proliferation und Migration der glatten Muskelzellen nach dem *Knockdown* von TGFBR3, dass auch bei diesem Zelltyp der Prozess der "Aktivierung"

gefördert wird und damit einhergehend die "Resolutionsphase" mit hoher Wahrscheinlichkeit gestört ist.

5.3 Signaltransduktion von TGFBR3

Die TGF- β -Signalkaskade beginnt mit der Bindung der TGF- β Liganden an die Zelloberflächenrezeptoren. Drei Rezeptortypen sind bisher bekannt: Typ-I (53 kDa), Typ-II (70-80 kDa) und Typ-III (300 kDa) (92). Die Typ-III-Rezeptoren sind wahrscheinlich nicht direkt an der Signaltransduktion beteiligt, da TGF- β das Zellwachstum von Zellen verhindert, die keine Typ-III-Rezeptoren exprimieren (93, 94). Daher lässt sich sagen, dass die Funktion der Typ-III-Rezeptoren nicht vollständig geklärt ist. TGFBR3 ist ein Proteoglykan, an das Glykosaminglykanketten (GAG) gebunden sind (95, 96), weshalb dieser Rezeptor auch oftmals als Beaglykan bezeichnet wird (97). Durch Proteolyse der membrangebundenen Form von TGFBR3 kann auch eine "lösliche" Form von TGFBR3 entstehen, die im Serum und in der Extrazellulärmatrix vorkommt (97).

In der vorliegenden Studie konnte beobachtet werden, dass TGFBR3 einen antiproliferativen Effekt auf HPASM-Zellen hat. Da wie bereits erwähnt wenig über die Funktionsweise der Typ-III-Rezeptoren bekannt ist, wurde in dieser Studie analysiert, welche Domäne von TGFBR3 für die beschriebenen Effekte verantwortlich war. Es konnte durch Überexpression von TGFBR3 bzw. von Trunktionen des TGFBR3 Rezeptors gezeigt werden, dass die Extrazellulärdomäne entscheidend an der Apoptose von HPASM-Zellen beteiligt ist, da in den Zellen, die mit der Extrazellulärdomäne von TGFBR3 (TGFBR3, TGFBR3- Δ Zyto oder TGFBR3- Δ TM/Zyto) transduziert wurden, eine erhöhte Apoptose auftrat (Abb.: 20 und 21). Aus der Literatur ist bekannt, dass bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkrebs oftmals ein Verlust der TGFBR3 Expression festzustellen ist und dies mit einer gesteigerten Tumorförderung und Invasivität korreliert (98). Die transiente Überexpression von TGFBR3 in CNE-2Z-Zellen aus dem Nasopharynxkarzinom führt ebenfalls zu einer erhöhten Apoptose in diesen Zellen (99). Transduktion von Überexpressionskonstrukten, bei denen die Extrazellulärdomäne entfernt wurde (TGFBR3- Δ Ekto-V5, TGFBR3- Δ Ekto/TM-V5) führten zu keinem Anstieg der Apoptose von HPASM-Zellen (Abb.: 19 und 20). Die Überexpression der zytosmatischen Domäne von TGFBR3 (TGFBR3- Δ Ekto/TM-V5) konnte jedoch auf

Proteinebene nicht gezeigt werden (Abb.: 21B), was wahrscheinlich damit zusammenhing, dass das Fragment nur 42 Aminosäuren groß war und aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne nur im Zytoplasma vorlag und deshalb sofort degradiert wurde. Die GFP-Expression der Konstrukte (Abb.: 20, Reihe C) verifizierte die Funktionalität aller übertragenen Plasmide.

Der antiproliferative Effekt von TGFBR3, der in dieser Studie anhand von *Knockdown*-Experimenten belegt werden konnte, wurde ebenfalls durch die Extrazellulardomäne von TGFBR3 hervorgerufen. Es konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von TGFBR3 zu einem starken Anstieg der Proliferation von HPASM-Zellen (Abb.: 9 und 13), sowie von HPAAE-Zellen (Abb.: 23) führte. Auch die Überexpression der Konstrukte, die die Extrazellulardomäne von TGFBR3 enthielten, kam es zu einer Verringerung der Proliferation, sichtbar anhand der reduzierten PCNA-Expression (Abb.: 21). Aus der Krebsforschung ist ebenfalls bekannt, dass eine reduzierte Expression von TGFBR3 in der Myeloma Zelllinie U266, zu einer um 75 % gesteigerten Proliferation dieser Zellen führt (100). Aufgrund dieser Daten lässt sich sagen, dass sowohl "zu viel" als auch "zu wenig" Expression von TGFBR3 die Zellhomöostase sowohl von glatten pulmonalarteriellen Muskelzellen, als auch von pulmonalarterielle Endothelzellen entscheidend verändern kann.

Weder die zellulären Mechanismen noch die damit einhergehenden molekularen Signalkaskaden, durch die TGFBR3 diese Zellprozesse vermittelt, sind bisher bekannt. Es wird angenommen, dass TGFBR3 als Ligandenpräsentierer für TGFBR2 dient. Diese Annahme beruht auf (i) einer gleichhohen Affinität von TGFBR3 zu TGF- β 1 und TGF- β 2 (50), (ii) dem Fehlen einer offensichtlichen Signaldomäne (58) und (iii) der Fähigkeit von Zellen, auf TGF- β zu reagieren, auch wenn diese kein TGFBR3 exprimieren (94, 101). Der apoptotische Effekt bei der Überexpression der TGFBR3 Konstrukte beruht wahrscheinlich auf der Ligandenpräsentation durch TGFBR3 an TGFBR2, da bereits bekannt ist, dass TGF- β auf HPASM-Zellen apoptotisch wirken kann (102). So könnte eine Überexpression von TGFBR3 bzw. von Konstrukten, die die Extrazellulardomäne überexprimieren, zu einer erhöhten Ligandenpräsentation an TGFBR2 führen, was wiederum in einer Verstärkung der TGF- β Signalkaskade resultiert.

Auch die Exposition von HPASM-Zellen mit Hyperoxie führte zu einem Anstieg der Apoptose dieser Zellen (Abb. 13B). Zudem konnte gezeigt werden, dass

Hyperoxie in HPASM-Zellen zu einer erhöhten Expression von TGFBR3 führte (Abb.: 15A). Diese erhöhte Expression von TGFBR3 könnte ebenfalls eine Erklärung für den Anstieg der Apoptose der HPASM-Zellen sein, ob dies jedoch der einzige Grund dafür ist, wurde bisher nicht geklärt.

Der antiproliferative Effekt von TGFBR3, der durch die *Knockdown* Experimente demonstriert wurde, kann jedoch nicht über die Rolle der Ligandenpräsentation erklärt werden, da in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass es sich um einen TGF- β -unabhängigen Effekt handelt (Abb.: 13B). Aus diesem Grund wurde eine *Microarray*-Studie durchgeführt, um mögliche Kandidatengene zu erhalten, die diesen Effekt vermitteln. Daraufhin wurde der MAPK-Signalweg genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der *Knockdown* von TGFBR3 zu einer erhöhten Phosphorylierung von ERK1 (p44) und ERK2 (p42) führte (Abb.: 16). Eine ERK1/2 Phosphorylierung führt zu einer erhöhten Proliferation von HPASM-Zellen in der pulmonalen Hypertonie (103). Daher ist es wahrscheinlich, dass der antiproliferative Effekt, der von TGFBR3 in HPASM-Zellen ausgeht, an einer Verhinderung erhöhter Phosphorylierung von ERK1/2 liegt. Kommt es durch einen *Knockdown* von TGFBR3 zu einer verminderten Präsenz von TGFBR3, so kann diese Reprimierung nicht mehr aufrecht erhalten werden, und es kommt zu einer Phosphorylierung von ERK1/2 und damit zu einer erhöhten Proliferation von HPASM-Zellen. Der Mechanismus, über den dies geschieht, ist jedoch weiterhin unbekannt.

Des Weiteren zeigte die *Microarray* Studie eine verminderte Expression der Metalloproteinasen ADAMTS (*A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs*) 5 und 9 nach *Knockdown* von TGFBR3. Diese Daten konnte in der vorliegenden Studie anhand von quantitativen *real-time* PCR Experimenten validiert werden (Abb.: 18). Die humane ADAMTS-Familie besteht aus 19 strukturell komplexen Metalloproteinasen, die eine variable Anzahl von Typ-1-Thrombospondin (TSP-1)-Domänen im Bereich ihrer Carboxytermini besitzen (104-106). Funktionelle Studien haben gezeigt, dass diese Enzyme an einer Vielzahl von Prozessen, wie Kollagenreifung, Organogenese, Proteoglykanabbau, Hemmung der Angiogenese, Reproduktion und Entzündung beteiligt sind. Von ADAMTS9 ist bekannt, dass es als anti-angiogenetische Metalloproteinase von mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert wird (76). Eine Herunterregulierung von ADAMTS9 führt zu einer Neovaskularisierung in der Retina von Mäusen (76). Kommt es durch eine

verminderte Expression von TGFBR3 zu einer Veränderung der ADAMTS9 Expression, so könnte dies die Gefäßentwicklung in der Lunge wahrscheinlich ebenfalls beeinflussen. So könnte der in der vorliegenden Studie beobachtete Effekt des Anstieges der HPASM-Zellproliferation ADAMTS9 vermittelt sein. Von ADAMTS5 ist bekannt, dass es den MAPK-Signalweg aktivieren, also die Phosphorylierung von ERK1/2 beeinflussen, kann (107).

5.4 Die Rolle von TGFBR3 in der pulmonalen Gefäßentwicklung

Neue Blutgefäße bilden sich durch eine Kombination aus Vaskulogenese und Angiogenese (108). Diese beiden Prozesse werden während der Embryogenese durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Die Unerlässlichkeit der TGF- β Signalisierung bei diesen Prozessen wurde vor allem durch genetische Mutation der TGF- β Liganden und Rezeptorengene festgestellt. So führt in der Maus die heterozygote Deletion von *Acvrl1* zu vaskulären Lesionen, die vollständige Deletion zu einer embryonalen Letalität mit reduzierter Differenzierung der vaskulären glatten Muskelzellen (35, 109-111). Auch bei der genetischen Deletion von *Tgfr1* und *Tgfr2* kommt es zu vaskulären und angiogenetischen Defekten (80, 109, 112). Diese Defekte treten jedoch alle bereits in der frühen embryonalen Phase auf, so dass sie wenig über die postnatale Blutgefäßentwicklung insbesondere im Bezug auf die der Lunge verraten. Dass hier jedoch TGF- β ebenfalls eine wichtige Rolle einnimmt, konnte durch Experimente mit TGF- β -neutralisierenden Antikörpern gezeigt werden. So führt der Einsatz dieser Antikörper zu einer verbesserten pulmonalen Vaskulogenese und Alveologenese (113). Dass wiederum die Gefäßentwicklung entscheidend für eine korrekte Alveolarisierung der Lunge ist, konnte 2005 eindrucksvoll von Thébaud und Kollegen gezeigt werden. Durch eine intratracheal durchgeführte adenovirale VEGF-Gentherapie konnten sie zeigen, dass die Aufrechterhaltung der VEGF-Expression in der Hyperoxie geschädigte Rattenlunge zu einer Förderung der Lungenkapillarbildung und nachfolgender Alveolarisierung führte (114).

Die Vielzahl an biologischen Prozessen, an denen TGF- β beteiligt ist, kann nur durch die verschiedenartige Rezeptoraktivierung in unterschiedlichen Zelltypen koordiniert werden. Gerade den akzessorischen TGF- β -Rezeptoren, die wahr-

scheinlich nicht direkt an der Signalfortleitung beteiligt sind, kommt hier vermutlich eine wichtige regulatorische Funktion zu. So führt eine einzelne Mutation in dem akzessorischen TGF- β -Rezeptor Endoglin zu der Gefäßkrankheit HHT (34). Über den zweiten akzessorischen Typ-III-TGF- β -Rezeptor TGFBR3 ist jedoch im Zusammenhang mit der pulmonalen Gefäßentwicklung bzw. Homöostase wenig bekannt. Die genetische Deletion von TGFBR3 führt in der Maus zum Versterben der Embryonen am Tag E14,5. Die Analyse früherer Stadien erbrachte, dass die koronare Gefäßentwicklung gestört ist (81). Dies zeigt, dass dieser Rezeptor ebenfalls wichtige Aufgaben im Bezug auf die Gefäßentwicklung übernimmt. Eine regulierende Rolle während der postnatalen Lungenentwicklung in Bezug auf die Angiogenese ist daher wahrscheinlich.

Zudem konnte eine *Microarray*-Studie von Geraci *et al.* aufzeigen, dass die TGFBR3 Expression in Patienten mit primärer pulmonalen Hypertonie (PPH) reduziert ist (115). Die pulmonale arterielle Hypertonie ist durch eine Hypertrophie und Hyperplasie der medialen glatten Muskelzellschicht sowie einer Verdickung der Intima der präkapillaren Arteriolen gekennzeichnet (116). Auch in der bronchopulmonalen Dysplasie tritt häufig eine pulmonale Hypertonie auf (117). In der vorliegenden Studie konnte ein ausgeprägter Effekt von TGFBR3 auf die Zelleigenschaften von HPASM-Zellen beobachtet werden. Insbesondere der Anstieg der Proliferation von HPASM-Zellen nach einem *Knockdown* von TGFBR3 (Abb.: 9 und 13), kann in Verbindung mit der Hyperplasie dieser Zellen, die im Rahmen der pulmonalen Hypertonie während einer BPD auftritt, gebracht werden.

5.5 Ausblick

Um die in dieser Studie erlangten Daten besser in einen pathophysiologischen Kontext zu bringen, sollen gewebespezifische, induzierbare *Knockout*-Mäuse generiert werden. Dabei soll *Tgfbr3* in postnatalen Mäusen entweder in glatten Muskelzellen oder in Endothelzellen deletiert werden. Ergibt die Analyse der Lungenstruktur eine Rekapitulation des Phänotyps einer Hyperoxie-geschädigten Mauslunge, so würde dies einen kausalen Zusammenhang zwischen einer verminderten TGFBR3-Expression und einer gestörten postnatalen Lungenentwicklung herstellen. Zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit wurde bereits mit der Generierung der *Knockout*-Mäuse begonnen, jedoch standen noch keine Daten zur Verfügung.

Des Weiteren wäre es sinnvoll, die stromabwärts liegenden Signalkaskaden, die durch einen TGFBR3-*Knockdown* in HPASM-Zellen verändert werden, detaillierter zu analysieren. Die *Microarray*-Analyse, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, bildet dafür eine wichtige Grundlage. Weitere Experimente, z.B. Doppel-*Knockdown*-Versuche eines im *Microarray* identifizierten Kandidatengens zusammen mit einem TGFBR3-*Knockdown* und anschließender Analyse des Proliferationsverhalten der Zellen könnten dabei helfen die Signalkaskade aufzuklären. Eine Identifizierung der molekularen Mechanismen ist für die Entwicklung neuer Therapieansätze unabdingbar.

6 Zusammenfassung

Die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) ist eine schwere Lungenkrankheit die Frühgeborene betrifft, die eine Sauerstofftherapie benötigen. Diese Sauerstofftherapie rettet zwar einerseits das Leben der Neugeborenen, andererseits kann durch sie aber auch eine Lungenschädigung der Patienten und damit eine BPD bedingt werden. Diese Krankheit gefährdet nicht nur das Leben der Neugeborenen, sie kann sich auch zu einem lebenslangen Problem für die Betroffenen entwickeln. Die Lungenschädigung der Patienten ist durch das histologische Bild einer "alveolären Vereinfachung" (weniger und größere Alveolen mit weniger Septen) charakterisiert, die mit einem Verlust der kleinen Lungenarterien und einer verminderten Kapillardichte einhergeht. Die Erforschung des Beitrags der Angiogenese (Bildung von Blutgefäßen) in der Entwicklung der Alveolen ist daher von zentraler Rolle.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der akzessorische Typ III TGF (*transforming growth factor*) - β Rezeptor Tgfbr3 in der Hyperoxiegeschädigten Mauslunge, einem Modell der humanen Lungenkrankheit BPD, zu verschiedenen Zeitpunkten während der postnatalen Lungenentwicklung vermindert exprimiert ist. Durch Lasermikrodissektion der pulmonalen Gefäße der hyperoxisch exponierten Mäuse konnte gezeigt werden, dass diese verminderte Expression auch in den Gefäßen vorlag. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass eine verminderte TGFBR3-Expression in humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen zu einer erhöhten Proliferation und Migration dieser Zellen führte, und dass dieser Effekt durch einen TGF- β -unabhängigen Signalweg vermittelt wurde. In humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen führte eine verminderte Expression von TGFBR3 einerseits zu einer erhöhten Proliferation dieser Zellen, andererseits wurde die Fähigkeit der Zellen zum Ausbilden von kapillarähnlichen Strukturen jedoch eingeschränkt.

Schließlich konnte ein möglicher Signalweg aufgezeigt werden. Die Aktivierung des MAPK- (*mitogen activated protein kinase*) Signalwegs über den die TGF- β -unabhängige Steigerung der Proliferation von humanen pulmonalarteriellen glatten Muskel- (HPASM) Zellen erklärt werden könnte.

Zusammengefasst wurde in dieser Studie über *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass TGFBR3 Einfluss auf die Eigenschaften von HPASM-Zellen und hu-

manen pulmonalarteriellen Endothel- (HPAE) Zellen nimmt und so zu der Pathogenese der BPD beitragen kann.

7 Summary

Bronchopulmonary Dysplasia (BPD) is a serious lung condition that affects premature infants who need oxygen therapy. Unfortunately, the same treatment that keeps the premature babies alive, the oxygen therapy, also damages the lungs, resulting in BPD. This disease not only endangers the lives of newborns, but can become a chronic problem. The lung damage results in a histological pattern of “alveolar simplification” (fewer but larger alveoli with less septa), loss of small pulmonary arteries, and decreased capillary density. For this reason it is important to explore the role played by angiogenesis, the formation of blood vessels, in alveolar development.

This study demonstrates that the expression of the accessory type III TGF (transforming growth factor) β receptor *Tgfr3* is dysregulated at different times during postnatal lung development in hyperoxia-injured mouse lungs, a model of the human lung disease BPD. Laser microdissection of the pulmonary vessels (from the hyperoxia-exposed mice) revealed reduced expression in the vasculature. Furthermore, it was demonstrated that decreased TGFBR3 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells led to increased proliferation and migration of these cells and that this effect was mediated by a TGF- β -independent pathway. In human pulmonary artery endothelial cells, knockdown of TGFBR3 led to an increased proliferation but the ability of these cells to form capillary-like structures was reduced.

Finally, the involvement of MAPK (mitogen activated protein kinase) signaling pathway could be demonstrated, through which the TGF- β independent increase of smooth muscle cell proliferation could be explained.

Taken together, the data from the *in vivo* and *in vitro* studies performed in the present study suggest a role for TGFBR3 in vascular smooth muscle cell and vascular endothelial cell functions which could lead to a dysregulation of signaling pathways in the pulmonary vasculature which in turn could contribute to the impaired pulmonary vascular growth and development associated with the lung hypoplasia observed in patients with BPD.

8 Literaturverzeichnis

1. Cardoso, W.V. 2001. Molecular regulation of lung development. *Annu Rev Physiol* 63:471-494.
2. Warburton, D., Schwarz, M., Tefft, D., Flores-Delgado, G., Anderson, K.D., and Cardoso, W.V. 2000. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev* 92:55-81.
3. Demayo, F., Minoo, P., Plopper, C.G., Schuger, L., Shannon, J., and Torday, J.S. 2002. Mesenchymal-epithelial interactions in lung development and repair: are modeling and remodeling the same process? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L510-517.
4. van Tuyl, M., and Post, M. 2000. From fruitflies to mammals: mechanisms of signalling via the Sonic hedgehog pathway in lung development. *Respir Res* 1:30-35.
5. Proadhan, P., and Kinane, T.B. 2002. Developmental paradigms in terminal lung development. *Bioessays* 24:1052-1059.
6. Perl, A.K., and Whitsett, J.A. 1999. Molecular mechanisms controlling lung morphogenesis. *Clin Genet* 56:14-27.
7. <http://www.embryology.ch/allemand/rrespiratory/phasen03.html>.
8. Baldwin, H.S. 1996. Early embryonic vascular development. *Cardiovasc Res* 31 Spec No:E34-45.
9. Poole, T.J., and Coffin, J.D. 1989. Vasculogenesis and angiogenesis: two distinct morphogenetic mechanisms establish embryonic vascular pattern. *J Exp Zool* 251:224-231.
10. Pardanaud, L., Yassine, F., and Dieterlen-Lievre, F. 1989. Relationship between vasculogenesis, angiogenesis and haemopoiesis during avian ontogeny. *Development* 105:473-485.
11. Noden, D.M. 1989. Embryonic origins and assembly of blood vessels. *Am Rev Respir Dis* 140:1097-1103.
12. Northway, W.H., Jr., Rosan, R.C., and Porter, D.Y. 1967. Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 276:357-368.
13. Northway, W.H., Jr., Moss, R.B., Carlisle, K.B., Parker, B.R., Popp, R.L., Pitlick, P.T., Eichler, I., Lamm, R.L., and Brown, B.W., Jr. 1990. Late pulmonary sequelae of bronchopulmonary dysplasia. *N Engl J Med* 323:1793-1799.
14. Bancalari, E., Abdenour, G.E., Feller, R., and Gannon, J. 1979. Bronchopulmonary dysplasia: clinical presentation. *J Pediatr* 95:819-823.
15. Shennan, A.T., Dunn, M.S., Ohlsson, A., Lennox, K., and Hoskins, E.M. 1988. Abnormal pulmonary outcomes in premature infants: prediction from oxygen requirement in the neonatal period. *Pediatrics* 82:527-532.
16. Walsh, M.C., Yao, Q., Gettner, P., Hale, E., Collins, M., Hensman, A., Everette, R., Peters, N., Miller, N., Muran, G., et al. 2004. Impact of a

- physiologic definition on bronchopulmonary dysplasia rates. *Pediatrics* 114:1305-1311.
17. Jobe, A.H., and Bancalari, E. 2001. Bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1723-1729.
 18. Kramer, B.W. 2008. Antenatal inflammation and lung injury: prenatal origin of neonatal disease. *J Perinatol* 28 Suppl 1:S21-27.
 19. Goodman, G., Perkin, R.M., Anas, N.G., Sperling, D.R., Hicks, D.A., and Rowen, M. 1988. Pulmonary hypertension in infants with bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 112:67-72.
 20. Jobe, A.J. 1999. The new BPD: an arrest of lung development. *Pediatr Res* 46:641-643.
 21. Husain, A.N., Siddiqui, N.H., and Stocker, J.T. 1998. Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. *Hum Pathol* 29:710-717.
 22. http://www.gnpi.de/leitlinien/aktuell/024-014_S2_Praevention_und_Therapie_der_bronchopulmonalen_Dysplasie_Fruehgeborener_06-2009_06-2014.pdf.
 23. Hislop, A.A., and Haworth, S.G. 1990. Pulmonary vascular damage and the development of cor pulmonale following hyaline membrane disease. *Pediatr Pulmonol* 9:152-161.
 24. Abman, S.H. 2001. Bronchopulmonary dysplasia: "a vascular hypothesis". *Am J Respir Crit Care Med* 164:1755-1756.
 25. Jakkula, M., Le Cras, T.D., Gebb, S., Hirth, K.P., Tuder, R.M., Voelkel, N.F., and Abman, S.H. 2000. Inhibition of angiogenesis decreases alveolarization in the developing rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279:L600-607.
 26. Le Cras, T.D., Markham, N.E., Tuder, R.M., Voelkel, N.F., and Abman, S.H. 2002. Treatment of newborn rats with a VEGF receptor inhibitor causes pulmonary hypertension and abnormal lung structure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L555-562.
 27. Fracica, P.J., Knapp, M.J., Piantadosi, C.A., Takeda, K., Fulkerson, W.J., Coleman, R.E., Wolfe, W.G., and Crapo, J.D. 1991. Responses of baboons to prolonged hyperoxia: physiology and qualitative pathology. *J Appl Physiol* 71:2352-2362.
 28. Roberts, R.J., Weesner, K.M., and Bucher, J.R. 1983. Oxygen-induced alterations in lung vascular development in the newborn rat. *Pediatr Res* 17:368-375.
 29. Jones, R., Zapol, W.M., and Reid, L. 1984. Pulmonary artery remodeling and pulmonary hypertension after exposure to hyperoxia for 7 days. A morphometric and hemodynamic study. *Am J Pathol* 117:273-285.
 30. Jones, R., Jacobson, M., and Steudel, W. 1999. alpha-smooth-muscle actin and microvascular precursor smooth-muscle cells in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:582-594.
 31. Halliday, H.L., Dumpit, F.M., and Brady, J.P. 1980. Effects of inspired oxygen on echocardiographic assessment of pulmonary vascular resistance

- and myocardial contractility in bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 65:536-540.
32. Abman, S.H., Wolfe, R.R., Accurso, F.J., Koops, B.L., Bowman, C.M., and Wiggins, J.W., Jr. 1985. Pulmonary vascular response to oxygen in infants with severe bronchopulmonary dysplasia. *Pediatrics* 75:80-84.
 33. Fouron, J.C., Le Guennec, J.C., Villemant, D., Perreault, G., and Davignon, A. 1980. Value of echocardiography in assessing the outcome of bronchopulmonary dysplasia of the newborn. *Pediatrics* 65:529-535.
 34. McAllister, K.A., Grogg, K.M., Johnson, D.W., Gallione, C.J., Baldwin, M.A., Jackson, C.E., Helmbold, E.A., Markel, D.S., McKinnon, W.C., Murrell, J., et al. 1994. Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8:345-351.
 35. Johnson, D.W., Berg, J.N., Baldwin, M.A., Gallione, C.J., Marondel, I., Yoon, S.J., Stenzel, T.T., Speer, M., Pericak-Vance, M.A., Diamond, A., et al. 1996. Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet* 13:189-195.
 36. Sakurai, H., and Nigam, S.K. 1997. Transforming growth factor-beta selectively inhibits branching morphogenesis but not tubulogenesis. *Am J Physiol* 272:F139-146.
 37. Zhao, J., Bu, D., Lee, M., Slavkin, H.C., Hall, F.L., and Warburton, D. 1996. Abrogation of transforming growth factor-beta type II receptor stimulates embryonic mouse lung branching morphogenesis in culture. *Dev Biol* 180:242-257.
 38. Zhao, J., Lee, M., Smith, S., and Warburton, D. 1998. Abrogation of Smad3 and Smad2 or of Smad4 gene expression positively regulates murine embryonic lung branching morphogenesis in culture. *Dev Biol* 194:182-195.
 39. Gauldie, J., Galt, T., Bonniaud, P., Robbins, C., Kelly, M., and Warburton, D. 2003. Transfer of the active form of transforming growth factor-beta 1 gene to newborn rat lung induces changes consistent with bronchopulmonary dysplasia. *Am J Pathol* 163:2575-2584.
 40. Vicencio, A.G., Lee, C.G., Cho, S.J., Eickelberg, O., Chuu, Y., Haddad, G.G., and Elias, J.A. 2004. Conditional overexpression of bioactive transforming growth factor-beta1 in neonatal mouse lung: a new model for bronchopulmonary dysplasia? *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:650-656.
 41. Zhao, Y., Gilmore, B.J., and Young, S.L. 1997. Expression of transforming growth factor-beta receptors during hyperoxia-induced lung injury and repair. *Am J Physiol* 273:L355-362.
 42. Alejandre-Alcazar, M.A., Kwapiszewska, G., Reiss, I., Amarie, O.V., Marsh, L.M., Sevilla-Perez, J., Wygrecka, M., Eul, B., Kobrich, S., Hesse, M., et al. 2007. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L537-549.
 43. Thebaud, B., and Abman, S.H. 2007. Bronchopulmonary dysplasia: where have all the vessels gone? Roles of angiogenic growth factors in chronic lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 175:978-985.

44. Asikainen, T.M., Waleh, N.S., Schneider, B.K., Clyman, R.I., and White, C.W. 2006. Enhancement of angiogenic effectors through hypoxia-inducible factor in preterm primate lung in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L588-595.
45. Tang, J.R., Markham, N.E., Lin, Y.J., McMurtry, I.F., Maxey, A., Kinsella, J.P., and Abman, S.H. 2004. Inhaled nitric oxide attenuates pulmonary hypertension and improves lung growth in infant rats after neonatal treatment with a VEGF receptor inhibitor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:L344-351.
46. Kunig, A.M., Balasubramaniam, V., Markham, N.E., Morgan, D., Montgomery, G., Grover, T.R., and Abman, S.H. 2005. Recombinant human VEGF treatment enhances alveolarization after hyperoxic lung injury in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289:L529-535.
47. Kunig, A.M., Balasubramaniam, V., Markham, N.E., Seedorf, G., Gien, J., and Abman, S.H. 2006. Recombinant human VEGF treatment transiently increases lung edema but enhances lung structure after neonatal hyperoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291:L1068-1078.
48. Thickett, D.R., Armstrong, L., Christie, S.J., and Millar, A.B. 2001. Vascular endothelial growth factor may contribute to increased vascular permeability in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 164:1601-1605.
49. Bonikos, D.S., Bensch, K.G., Ludwin, S.K., and Northway, W.H., Jr. 1975. Oxygen toxicity in the newborn. The effect of prolonged 100 per cent O₂ exposure on the lungs of newborn mice. *Lab Invest* 32:619-635.
50. Cheifetz, S., Weatherbee, J.A., Tsang, M.L., Anderson, J.K., Mole, J.E., Lucas, R., and Massague, J. 1987. The transforming growth factor-beta system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors. *Cell* 48:409-415.
51. Sporn, M.B., Roberts, A.B., Shull, J.H., Smith, J.M., Ward, J.M., and Sodek, J. 1983. Polypeptide transforming growth factors isolated from bovine sources and used for wound healing in vivo. *Science* 219:1329-1331.
52. Vehvilainen, P., Hyytiainen, M., and Keski-Oja, J. 2009. Matrix association of latent TGF-beta binding protein-2 (LTBP-2) is dependent on fibrillin-1. *J Cell Physiol* 221:586-593.
53. Miyazono, K., Olofsson, A., Colosetti, P., and Heldin, C.H. 1991. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* 10:1091-1101.
54. Kusakabe, M., Cheong, P.L., Nikfar, R., McLennan, I.S., and Koishi, K. 2008. The structure of the TGF-beta latency associated peptide region determines the ability of the proprotein convertase furin to cleave TGF-betas. *J Cell Biochem* 103:311-320.
55. Ebner, R., Chen, R.H., Shum, L., Lawler, S., Zioncheck, T.F., Lee, A., Lopez, A.R., and Derynck, R. 1993. Cloning of a type I TGF-beta receptor and its effect on TGF-beta binding to the type II receptor. *Science* 260:1344-1348.

56. Yamashita, H., ten Dijke, P., Franzen, P., Miyazono, K., and Heldin, C.H. 1994. Formation of hetero-oligomeric complexes of type I and type II receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 269:20172-20178.
57. Lopez-Casillas, F., Wrana, J.L., and Massague, J. 1993. Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444.
58. Lopez-Casillas, F., Payne, H.M., Andres, J.L., and Massague, J. 1994. Betaglycan can act as a dual modulator of TGF-beta access to signaling receptors: mapping of ligand binding and GAG attachment sites. *J Cell Biol* 124:557-568.
59. Chen, W., Kirkbride, K.C., How, T., Nelson, C.D., Mo, J., Frederick, J.P., Wang, X.F., Lefkowitz, R.J., and Blobel, G.C. 2003. Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF-beta receptor and down-regulation of its signaling. *Science* 301:1394-1397.
60. Esparza-Lopez, J., Montiel, J.L., Vilchis-Landeros, M.M., Okadome, T., Miyazono, K., and Lopez-Casillas, F. 2001. Ligand binding and functional properties of betaglycan, a co-receptor of the transforming growth factor-beta superfamily. Specialized binding regions for transforming growth factor-beta and inhibin A. *J Biol Chem* 276:14588-14596.
61. Pepin, M.C., Beauchemin, M., Plamondon, J., and O'Connor-McCourt, M.D. 1994. Mapping of the ligand binding domain of the transforming growth factor beta receptor type III by deletion mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6997-7001.
62. Eickelberg, O., Centrella, M., Reiss, M., Kashgarian, M., and Wells, R.G. 2002. Betaglycan inhibits TGF-beta signaling by preventing type I-type II receptor complex formation. Glycosaminoglycan modifications alter betaglycan function. *J Biol Chem* 277:823-829.
63. Brown, C.B., Boyer, A.S., Runyan, R.B., and Barnett, J.V. 1999. Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283:2080-2082.
64. Stenvers, K.L., Tursky, M.L., Harder, K.W., Kountouri, N., Amatayakul-Chantler, S., Grail, D., Small, C., Weinberg, R.A., Sizeland, A.M., and Zhu, H.J. 2003. Heart and liver defects and reduced transforming growth factor beta2 sensitivity in transforming growth factor beta type III receptor-deficient embryos. *Mol Cell Biol* 23:4371-4385.
65. Gougos, A., and Letarte, M. 1988. Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol* 141:1925-1933.
66. Cheifetz, S., Bellon, T., Cales, C., Vera, S., Bernabeu, C., Massague, J., and Letarte, M. 1992. Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267:19027-19030.
67. Guerrero-Esteo, M., Sanchez-Elsner, T., Letamendia, A., and Bernabeu, C. 2002. Extracellular and cytoplasmic domains of endoglin interact with the transforming growth factor-beta receptors I and II. *J Biol Chem* 277:29197-29209.

68. Velasco, S., Alvarez-Munoz, P., Pericacho, M., Dijke, P.T., Bernabeu, C., Lopez-Novoa, J.M., and Rodriguez-Barbero, A. 2008. L- and S-endoglin differentially modulate TGFbeta1 signaling mediated by ALK1 and ALK5 in L6E9 myoblasts. *J Cell Sci* 121:913-919.
69. Li, D.Y., Sorensen, L.K., Brooke, B.S., Urness, L.D., Davis, E.C., Taylor, D.G., Boak, B.B., and Wendel, D.P. 1999. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science* 284:1534-1537.
70. Raftery, L.A., Twombly, V., Wharton, K., and Gelbart, W.M. 1995. Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*. *Genetics* 139:241-254.
71. Sekelsky, J.J., Newfeld, S.J., Raftery, L.A., Chartoff, E.H., and Gelbart, W.M. 1995. Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 139:1347-1358.
72. Savage, C., Das, P., Finelli, A.L., Townsend, S.R., Sun, C.Y., Baird, S.E., and Padgett, R.W. 1996. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor beta pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:790-794.
73. Attisano, L., Wrana, J.L., Lopez-Casillas, F., and Massague, J. 1994. TGF-beta receptors and actions. *Biochim Biophys Acta* 1222:71-80.
74. Massague, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791.
75. Warner, B.B., Stuart, L.A., Papes, R.A., and Wispe, J.R. 1998. Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275:L110-117.
76. Koo, B.H., Coe, D.M., Dixon, L.J., Somerville, R.P., Nelson, C.M., Wang, L.W., Young, M.E., Lindner, D.J., and Apte, S.S. 2010. ADAMTS9 is a cell-autonomously acting, anti-angiogenic metalloprotease expressed by microvascular endothelial cells. *Am J Pathol* 176:1494-1504.
77. Amy, R.W., Bowes, D., Burri, P.H., Haines, J., and Thurlbeck, W.M. 1977. Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124:131-151.
78. Chen, H., Sun, J., Buckley, S., Chen, C., Warburton, D., Wang, X.F., and Shi, W. 2005. Abnormal mouse lung alveolarization caused by Smad3 deficiency is a developmental antecedent of centrilobular emphysema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L683-691.
79. Oshima, M., Oshima, H., and Taketo, M.M. 1996. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev Biol* 179:297-302.
80. Larsson, J., Goumans, M.J., Sjostrand, L.J., van Rooijen, M.A., Ward, D., Leveen, P., Xu, X., ten Dijke, P., Mummery, C.L., and Karlsson, S. 2001. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF-beta type I receptor-deficient mice. *EMBO J* 20:1663-1673.
81. Compton, L.A., Potash, D.A., Brown, C.B., and Barnett, J.V. 2007. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ Res* 101:784-791.

82. Jain, R.K. 2003. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9:685-693.
83. Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J.J., and Bailly, S. 2002. Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood* 100:4495-4501.
84. Seki, T., Hong, K.H., and Oh, S.P. 2006. Nonoverlapping expression patterns of ALK1 and ALK5 reveal distinct roles of each receptor in vascular development. *Lab Invest* 86:116-129.
85. Shao, E.S., Lin, L., Yao, Y., and Bostrom, K.I. 2009. Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood* 114:2197-2206.
86. Fernandez, L.A., Sanz-Rodriguez, F., Blanco, F.J., Bernabeu, C., and Botella, L.M. 2006. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* 4:66-78.
87. Koleva, R.I., Conley, B.A., Romero, D., Riley, K.S., Marto, J.A., Lux, A., and Vary, C.P. 2006. Endoglin structure and function: Determinants of endoglin phosphorylation by transforming growth factor-beta receptors. *J Biol Chem* 281:25110-25123.
88. Fernandez, L.A., Sanz-Rodriguez, F., Zarrabeitia, R., Perez-Molino, A., Hebbel, R.P., Nguyen, J., Bernabeu, C., and Botella, L.M. 2005. Blood outgrowth endothelial cells from Hereditary Haemorrhagic Telangiectasia patients reveal abnormalities compatible with vascular lesions. *Cardiovasc Res* 68:235-248.
89. Tang, Y., Yang, X., Friesel, R.E., Vary, C.P., and Liaw, L. 2011. Mechanisms of TGF-beta-induced differentiation in human vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res* 48:485-494.
90. ten Dijke, P., Ichijo, H., Franzen, P., Schulz, P., Saras, J., Toyoshima, H., Heldin, C.H., and Miyazono, K. 1993. Activin receptor-like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879-2887.
91. Folkman, J., and D'Amore, P.A. 1996. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87:1153-1155.
92. Massague, J., Cheifetz, S., Laiho, M., Ralph, D.A., Weis, F.M., and Zentella, A. 1992. Transforming growth factor-beta. *Cancer Surv* 12:81-103.
93. Segarini, P.R., Rosen, D.M., and Seyedin, S.M. 1989. Binding of transforming growth factor-beta to cell surface proteins varies with cell type. *Mol Endocrinol* 3:261-272.
94. Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Bassols, A., and Massague, J. 1987. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* 329:539-541.
95. Segarini, P.R., and Seyedin, S.M. 1988. The high molecular weight receptor to transforming growth factor-beta contains glycosaminoglycan chains. *J Biol Chem* 263:8366-8370.

96. Cheifetz, S., Andres, J.L., and Massague, J. 1988. The transforming growth factor-beta receptor type III is a membrane proteoglycan. Domain structure of the receptor. *J Biol Chem* 263:16984-16991.
97. Andres, J.L., Stanley, K., Cheifetz, S., and Massague, J. 1989. Membrane-anchored and soluble forms of betaglycan, a polymorphic proteoglycan that binds transforming growth factor-beta. *J Cell Biol* 109:3137-3145.
98. Finger, E.C., Turley, R.S., Dong, M., How, T., Fields, T.A., and Blobel, G.C. 2008. TbetaRIII suppresses non-small cell lung cancer invasiveness and tumorigenicity. *Carcinogenesis* 29:528-535.
99. Zheng, F., He, K., Li, X., Zhao, D., Sun, F., Zhang, Y., Nie, D., Li, X., Chu, W., Sun, Y., et al. 2013. Transient over-expression of TGFBR3 induces apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma CNE-2Z cells. *Biosci Rep.* in press
100. Lambert, K.E., Huang, H., Myhre, K., and Blobel, G.C. 2011. The type III transforming growth factor-beta receptor inhibits proliferation, migration, and adhesion in human myeloma cells. *Mol Biol Cell* 22:1463-1472.
101. Massague, J., Cheifetz, S., Endo, T., and Nadal-Ginard, B. 1986. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:8206-8210.
102. Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D.D., Yi, E.S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P.A., Kriett, J.M., Yung, G., Rubin, L.J., and Yuan, J.X. 2003. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L740-754.
103. Kwapiszewska, G., Chwalek, K., Marsh, L.M., Wygrecka, M., Wilhelm, J., Best, J., Egemnazarov, B., Weisel, F.C., Osswald, S.L., Schermuly, R.T., et al. 2012. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 181:2018-2029.
104. Cal, S., Obaya, A.J., Llamazares, M., Garabaya, C., Quesada, V., and Lopez-Otin, C. 2002. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene* 283:49-62.
105. Llamazares, M., Cal, S., Quesada, V., and Lopez-Otin, C. 2003. Identification and characterization of ADAMTS-20 defines a novel subfamily of metalloproteinases-disintegrins with multiple thrombospondin-1 repeats and a unique GON domain. *J Biol Chem* 278:13382-13389.
106. Porter, S., Clark, I.M., Kevorkian, L., and Edwards, D.R. 2005. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J* 386:15-27.
107. Prasad, I., Crawford, R., and Xiao, Y. 2012. Aggravation of ADAMTS and matrix metalloproteinase production and role of ERK1/2 pathway in the interaction of osteoarthritic subchondral bone osteoblasts and articular cartilage chondrocytes -- possible pathogenic role in osteoarthritis. *J Rheumatol* 39:621-634.
108. Adams, R.H., and Alitalo, K. 2007. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:464-478.

109. Goumans, M.J., and Mummery, C. 2000. Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol* 44:253-265.
110. Urness, L.D., Sorensen, L.K., and Li, D.Y. 2000. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet* 26:328-331.
111. Srinivasan, S., Hanes, M.A., Dickens, T., Porteous, M.E., Oh, S.P., Hale, L.P., and Marchuk, D.A. 2003. A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Hum Mol Genet* 12:473-482.
112. Loeys, B.L., Schwarze, U., Holm, T., Callewaert, B.L., Thomas, G.H., Pannu, H., De Backer, J.F., Oswald, G.L., Symoens, S., Manouvrier, S., et al. 2006. Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med* 355:788-798.
113. Nakanishi, H., Sugiura, T., Streisand, J.B., Lonning, S.M., and Roberts, J.D., Jr. 2007. TGF-beta-neutralizing antibodies improve pulmonary alveologenesis and vasculogenesis in the injured newborn lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L151-161.
114. Thebaud, B., Ladha, F., Michelakis, E.D., Sawicka, M., Thurston, G., Eaton, F., Hashimoto, K., Harry, G., Haromy, A., Korbitt, G., et al. 2005. Vascular endothelial growth factor gene therapy increases survival, promotes lung angiogenesis, and prevents alveolar damage in hyperoxia-induced lung injury: evidence that angiogenesis participates in alveolarization. *Circulation* 112:2477-2486.
115. Geraci, M.W., Moore, M., Gesell, T., Yeager, M.E., Alger, L., Golpon, H., Gao, B., Loyd, J.E., Tudor, R.M., and Voelkel, N.F. 2001. Gene expression patterns in the lungs of patients with primary pulmonary hypertension: a gene microarray analysis. *Circ Res* 88:555-562.
116. Jeffery, T.K., and Wanstall, J.C. 2001. Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther* 92:1-20.
117. An, H.S., Bae, E.J., Kim, G.B., Kwon, B.S., Beak, J.S., Kim, E.K., Kim, H.S., Choi, J.H., Noh, C.I., and Yun, Y.S. 2010. Pulmonary hypertension in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia. *Korean Circ J* 40:131-136.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all jenen bedanken, die durch ihre wissenschaftlichen Ratschläge, moralische Unterstützung oder durch andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Werner Seeger danke ich für seine wissenschaftliche Unterstützung und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Prof. Lakes-Harlan danke ich für die sehr kurzfristig Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Rory E. Morty danke ich für die Übernahme meiner Betreuung als mein Doktorvater und seine wissenschaftliche Unterstützung, für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung meines Projektes, für die Möglichkeit viele internationale Kongresse besuchen zu können sowie für die Korrektur meiner Arbeit.

Bei allen Kolleginnen und Kollegen der AG Morty sowie der Abteilung Seeger möchte ich mich für die angenehme und lustige Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders hervorheben möchte Simone Becker für die ständige Offenheit gegenüber Fragen, für die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Versuche sowie für den allmorgendlichen "Fahrservice". Ich hatte stets Freude bei der Arbeit im Labor, woran Sie maßgeblichen Anteil hatte.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Tierpflegern des Max-Planck-Instituts für Herz- und Lungenforschung für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten.

Alexandra Steffens und Pete Hughes danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.

Mein größter Dank jedoch geht an Vanessa, ihre Familie und an meinen Vater, ohne deren moralischen Unterstützung das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitliche Abfolge der humanen und murinen Lungenentwicklung. Modifiziert nach (7).....	12
Abbildung 2: Definition der bronchopulmonalen Dysplasie nach dem NIH Konsens. Modifiziert nach (17).	15
Abbildung 3: Histologie einer acht Tage alten Rattenlunge nach Überexpression von aktivem TGF- β 1. Modifiziert nach (39).	19
Abbildung 5: Expression der TGF- β Rezeptoren in der Mauslunge zu verschiedenen Zeitpunkten im BPD-Modell.....	46
Abbildung 6: Aktivierung des TGF- β Signalweges durch konstitutiv aktive ACVRL1 und TGFBR1 Rezeptorkonstrukte.	47
Abbildung 7: Durchflusszytometrie von HPASM-Zellen nach Plasmidtransfektion.	48
Abbildung 8: SiRNA vermittelter Knockdown der TGF- β Rezeptoren in HPASM-Zellen.	49
Abbildung 9: Proliferation von glatten Muskelzellen der humanen Pulmonalarterie (HPASMC) nach <i>Knockdown</i> von TGFBR2, TGFBR3 und ENG.....	49
Abbildung 10: Proteinexpression von <i>Tgfr3</i> in der Mauslunge zu verschiedenen Zeitpunkten der postnatalen Lungenentwicklung (P7, P14, P21 und P28) im BPD-Modell.....	50
Abbildung 11: Genexpression von <i>Tgfr3</i> in den pulmonalen Gefäßen der Maus.	51
Abbildung 12: SiRNA vermittelter <i>Knockdown</i> von TGFBR3 in HPASM Zellen.....	52
Abbildung 13: Proliferation von glatten Muskelzellen der humanen Pulmonalarterie (HPASMC) nach <i>Knockdown</i> von TGFBR3.	53
Abbildung 14: Migration von HPASM Zellen nach Knockdown von TGFBR3.	54
Abbildung 15: Einfluss von Hyperoxie auf die Zelleigenschaften von HPASM-Zellen.	55
Abbildung 16: Phosphorylierung von ERK1/2 nach <i>Knockdown</i> von TGFBR3.	55
Abbildung 17: Proliferation von HPASM-Zellen nach siRNA vermitteltem <i>Knockdown</i> von TGFBR3 und Inhibierung der Phosphorylierung von ERK1/2.....	56
Abbildung 18: Genexpression von ADAMTS5 und ADAMTS9 nach <i>Knockdown</i> von TGFBR3.	57
Abbildung 19: Schematische Abbildung der generierten lentiviralen TGFBR3 Konstrukte.	58
Abbildung 20: Überexpression von TGFBR3 und Trunktionen in HPASM-Zellen.....	59
Abbildung 21: Proliferation und Apoptose von HPASM-Zellen nach Überexpression von TGFBR3 und Trunktionen.....	60
Abbildung 22: SiRNA vermittelter <i>Knockdown</i> von TGFBR3 in HPAE Zellen.	61
Abbildung 23: Proliferation von HPAE Zellen nach <i>Knockdown</i> von TGFBR3.....	62
Abbildung 24: <i>Tube</i> -Formierung von HPAE-Zellen nach <i>Knockdown</i> von TGFBR3.	63
Abbildung 25: Tubeformierung von HPAE-Zellen nach siRNA vermitteltem <i>Knockdown</i> von TGFBR3.....	63

Abbildung 26: Vektorkarte der pIRES-hrGFPII Konstrukte92

Abbildung 27: Vektorkarten der generierten lentiviralen Expressionsvektoren.93

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich zwischen der "alten" und "neuen" Form der BPD. Modifiziert nach (18).....	16
Tabelle 2: Primer für Expressionsanalysen.....	30
Tabelle 3: Primer für die Klonierung der TGF- β Rezeptoren.....	30
Tabelle 4: Primer für die <i>side-directed-mutagenesis</i> (SDM).....	30
Tabelle 5: Primer zur Plasmidklonierung für die Herstellung von lentiviralen Partikel.....	31
Tabelle 6: Liste der verwendeten Antikörper.....	31
Tabelle 7: Im <i>Microarray</i> regulierte Gene nach 24 h <i>Knockdown</i> von TGFBR3 in HPASM-Zellen.....	94
Tabelle 8: Im <i>Microarray</i> regulierte Gene nach 48 h <i>Knockdown</i> von TGFBR3 in HPASM-Zellen.....	96

12 Anhang

12.1 Vektorkarten der pIRES:GFP Konstrukte

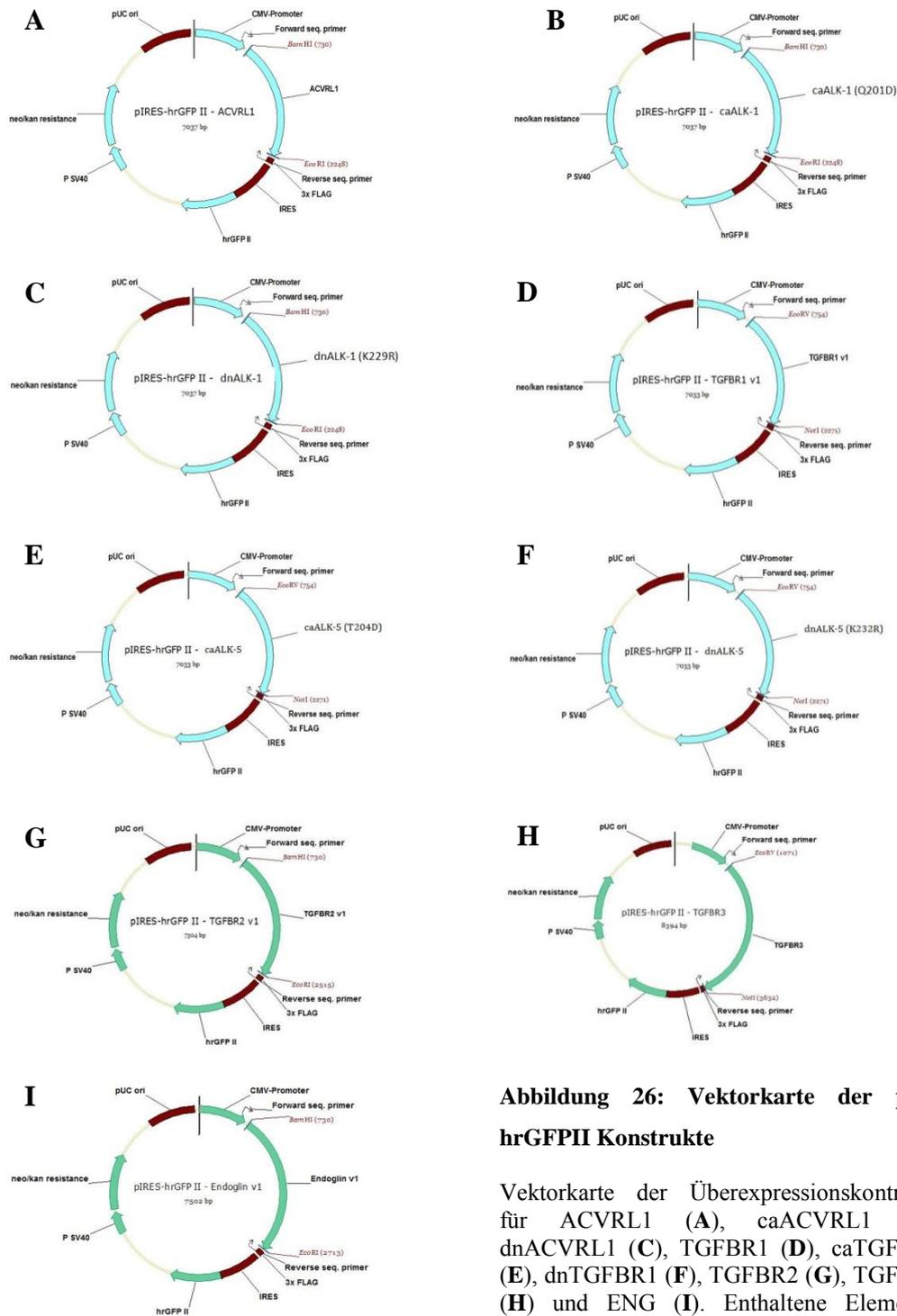


Abbildung 26: Vektorkarte der pIRES-hrGFP II Konstrukte

Vektorkarte der Überexpressionskonstrukte für ACVRL1 (A), caACVRL1 (B), dnACVRL1 (C), TGFBR1 (D), caTGFBR1 (E), dnTGFBR1 (F), TGFBR2 (G), TGFBR3 (H) und ENG (I). Enthaltene Elemente: internal ribosome entry site (IRES),

DYKDDDDK-Tag (FLAG), humanized recombinant GFP II (hrGFP II) SV40 early promoter (P SV40), Cytomegalovirus-Promotor (CMV), Neomycin/Kanamycin Resistenz (neo/kan).

12.2 Vektorkarten der pLENTI7.3/V5-DEST Konstrukte



Abbildung 27: Vektorkarten der generierten lentiviralen Expressionsvektoren.

Vektorkarte der Konstrukte TGFBR3-Volllänge (A), TGFBR3-ΔZyto (B), TGFBR3-ΔTM/Zyto (C), TGFBR3-ΔEcto (D) TGFBR3-ΔEcto-V5 (E), TGFBR3-ΔEcto/TM (F) und TGFBR3-ΔEcto/TM-V5 (G) in pLENTI7.3/v5-DEST. Enthaltene Elemente: Rous Sarcoma Virus (RSV) enhancer/promoter, HIV-1 truncated 5' LTR, 5' splice donor and 3' acceptors, HIV-1 psi (ψ) packaging signal, bla promoter, HIV-1 Rev response element (RRE), Polypurine Tract from

HIV (cPPT), CMV promoter, Chloramphenicol resistance gene (CmR), Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element (WPRE), SV40 early promoter and origin, Emerald Green Fluorescent Protein (EmGFP), SV40 polyadenylation signal, pUC origin, Ampicillin resistance gene (β -lactamase),

12.3 Signifikant regulierte Gene im cDNA-Microarray

Tabelle 7: Im Microarray regulierte Gene nach 24 h Knockdown von TGFBR3 in HPASM-Zellen

Gen Symbol	Fold Change	Reg.	p (Corr)	Gen Name
ROD1	2,686706	up	0,000597534	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)
STEAP3	2,651758	up	0,001254431	STEAP family member 3
STEAP3	2,618647	up	0,016158637	STEAP family member 3
DSP	2,5991764	up	0,007129234	desmoplakin
CCDC64	2,59359	up	0,042706862	coiled-coil domain containing 64
TOP1MT	2,4726286	up	0,002331852	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial
SLC41A1	2,4416995	up	0,009130021	solute carrier family 41, member 1
YWHAH	2,401386	up	0,001865924	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
IL6ST	2,3732073	up	0,011430921	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
TMEM108	2,3709927	up	0,048132777	transmembrane protein 108
RAB14	2,3395524	up	0,000869498	RAB14, member RAS oncogene family
NUDT15	2,3112779	up	0,02640335	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
IQSEC1	2,3111112	up	0,000597534	IQ motif and Sec7 domain 1
IL10RB	2,30391	up	0,002129016	interleukin 10 receptor, beta
GPR133	2,2881753	up	0,048227403	G protein-coupled receptor 133
SCAMP1	2,2495594	up	0,035314787	secretory carrier membrane protein 1
OXTR	2,2465012	up	0,010173655	oxytocin receptor
ANKRD46	2,2003224	up	0,000736579	ankyrin repeat domain 46
EIF2C4	2,1984425	up	0,030140253	eukaryotic translation initiation factor 2C, 4
IL6ST	2,1857827	up	0,011891421	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
SAR1B	2,1812346	up	0,005760106	SAR1 homolog B (S. cerevisiae)
IL6ST	2,1804287	up	0,04387782	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
TACC2	2,1785314	up	0,001865924	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
SEMA4F	2,169928	up	0,012518136	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F
LSM14A	2,1584475	up	0,007607261	LSM14A, SCD6 homolog A (S. cerevisiae)
DSP	2,1380215	up	0,030140253	desmoplakin
SCAMP1	2,136442	up	0,007607261	secretory carrier membrane protein 1
FOXO3	2,1296244	up	0,001254431	forkhead box O3
NID1	2,1125774	up	0,018596249	nidogen 1
ILF3	2,1121795	up	0,002595698	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
DNMT1	2,108735	up	0,007607261	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
GOLGA4	2,0988917	up	0,04073742	golgin A4
HS6ST1	2,059031	up	0,008948349	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
SLC7A2	2,0259874	up	0,012518136	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 2
TMEM50B	2,022836	up	0,019251632	transmembrane protein 50B
CDK14	2,018691	up	0,02917155	cyclin-dependent kinase 14
TGFBR3	-11,841216	down	0,025238123	transforming growth factor, beta receptor III
B4GALT6	-4,3108463	down	0,03395728	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 6
HOGA1	-3,875817	down	0,02640335	4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase 1
EXOC3L4	-3,615583	down	0,031153305	exocyst complex component 3-like 4
EXTL2	-3,3069289	down	0,013122677	exostoses (multiple)-like 2
RNF144B	-3,169726	down	0,04015184	ring finger protein 144B
PI15	-3,035015	down	0,040006727	peptidase inhibitor 15
TTC33	-2,9954946	down	0,034640737	tetratricopeptide repeat domain 33
CTR9	-2,9921105	down	0,001179464	Ctr9, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (S. cerevisiae)

CCDC68	-2,9865298	down	0,04250995	coiled-coil domain containing 68
FKSG2	-2,9509737	down	0,040206756	tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene
ZNF248	-2,8985822	down	0,017414303	zinc finger protein 248
NHLRC3	-2,7944207	down	0,012518136	NHL repeat containing 3
C20orf177	-2,6914256	down	0,037160154	chromosome 20 open reading frame 177
MYO5B	-2,407881	down	0,034640737	myosin VB
CYP4A11	-2,399783	down	0,042747416	cytochrome P450, family 4, subfamily A, polypeptide 11
THBS2	-2,3843079	down	0,018424148	thrombospondin 2
MICB	-2,3776832	down	0,005889838	MHC class I polypeptide-related sequence B
IGF1	-2,3525028	down	0,023130728	insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
KPNA5	-2,3174837	down	0,03395728	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)
ST6GALNAC5	-2,2855012	down	0,045517296	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5
DCUN1D4	-2,2732017	down	0,04316899	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 4 (<i>S. cerevisiae</i>)
PDK4	-2,2519667	down	0,045035325	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
CDK6	-2,2466764	down	0,008576186	cyclin-dependent kinase 6
TNPO1	-2,24556	down	0,010173655	transportin 1
CCDC51	-2,2347276	down	0,000887163	coiled-coil domain containing 51
EI24	-2,214395	down	0,000597534	etoposide induced 2.4 mRNA
CYP1B1	-2,2059402	down	0,015144532	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
GRHL1	-2,187307	down	0,02640335	grainyhead-like 1 (<i>Drosophila</i>)
KCNA3	-2,1735091	down	0,04316899	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 3
KCTD12	-2,1685686	down	0,007607261	potassium channel tetramerisation domain containing 12
PPP6C	-2,1480439	down	0,000370048	protein phosphatase 6, catalytic subunit
KCTD12	-2,1078696	down	0,030692149	potassium channel tetramerisation domain containing 12
ITGA2	-2,0908234	down	0,006566463	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
SESTD1	-2,0809748	down	0,028519684	SEC14 and spectrin domains 1
PDE4B	-2,076958	down	0,02821085	phosphodiesterase 4B, cAMP-specific
HDAC3	-2,061744	down	0,005889838	histone deacetylase 3
TNFRSF11B	-2,0601363	down	0,017129375	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
CYP1B1	-2,04886	down	0,0317587	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
KLHL28	-2,0397494	down	0,015301162	kelch-like 28 (<i>Drosophila</i>)
GXYLT1	-2,0349717	down	0,014373868	glucoside xylosyltransferase 1
LANCL3	-2,0335495	down	0,014648223	LanC lantibiotic synthetase component C-like 3 (bacterial)

Tabelle 8: Im *Microarray* regulierte Gene nach 48 h *Knockdown* von TGFBR3 in HPASM-Zellen

Gen Symbol	Fold Change	Reg.	p (Corr)	Gen Name
DSP	5,4404197	up	0,000897739	desmoplakin
DSP	5,1979666	up	0,002097794	desmoplakin
C1orf110	5,1907473	up	0,003605427	chromosome 1 open reading frame 110
NLRP10	5,182069	up	0,00625165	NLR family, pyrin domain containing 10
OXTR	4,611547	up	0,001709877	oxytocin receptor
ALCAM	4,001158	up	0,01108513	activated leukocyte cell adhesion molecule
LBH	3,7563941	up	0,003236958	limb bud and heart development homolog (mouse)
ADRA1D	3,5949996	up	0,03991403	adrenergic, alpha-1D-, receptor
FABP4	3,5707443	up	0,021677623	fatty acid binding protein 4, adipocyte
DISC1	3,5690246	up	0,000812828	disrupted in schizophrenia 1
YWHAH	3,4790828	up	0,000401762	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide
ATP10A	3,4265025	up	0,005490457	ATPase, class V, type 10A
DOK5	3,4119816	up	0,001161055	docking protein 5
CHPF	3,3762631	up	0,005029651	chondroitin polymerizing factor
LMO7	3,2694314	up	0,000908197	LIM domain 7
NUDT15	3,2416732	up	0,000818551	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 15
HTR2A	3,1904151	up	0,001203156	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
SEMA4F	3,1583972	up	0,000897739	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F
LMO7	3,1233208	up	0,005327811	LIM domain 7
NEFM	3,116317	up	0,002282026	neurofilament, medium polypeptide
STEAP3	3,1108248	up	0,000956996	STEAP family member 3
KRTAP1-5	3,0724206	up	0,004962965	keratin associated protein 1-5
TOP1MT	3,071664	up	0,001161055	topoisomerase (DNA) I, mitochondrial
ITGB1BP2	3,0467885	up	0,006435124	integrin beta 1 binding protein (melusin) 2
ARSI	3,0336852	up	0,04114865	arylsulfatase family, member I
FMN2	3,0310562	up	0,005333588	formin 2
ARPP21	3,0090156	up	0,008879793	cAMP-regulated phosphoprotein, 21kDa
THG1L	3,0047472	up	0,005474829	tRNA-histidine guanylyltransferase 1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
EMP2	2,9882717	up	0,000578322	epithelial membrane protein 2
SORCS3	2,9611907	up	0,035999347	sortilin-related VPS10 domain containing receptor 3
SYNPO2L	2,9492605	up	0,023771912	synaptopodin 2-like
MRVI1	2,947188	up	0,011232825	murine retrovirus integration site 1 homolog
CLIC4	2,935094	up	0,003467707	chloride intracellular channel 4
CEND1	2,9036155	up	0,001672595	cell cycle exit and neuronal differentiation 1
STEAP3	2,8901055	up	0,00975818	STEAP family member 3
ZDHHC19	2,8853977	up	0,039956797	zinc finger, DHHC-type containing 19
RGS7BP	2,8838117	up	0,00212618	regulator of G-protein signaling 7 binding protein
MRPS17	2,8676815	up	0,023173902	mitochondrial ribosomal protein S17
TLN1	2,8589942	up	0,000897739	talin 1
CACNG5	2,854833	up	0,017843464	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 5
POLR3E	2,8409593	up	0,001211017	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)
LMO7	2,8105924	up	0,007966061	LIM domain 7
PKP1	2,7681715	up	0,018770872	plakophilin 1 (ectodermal dysplasia/skin fragility syndrome)
POLR3E	2,7674959	up	0,001211017	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide E (80kD)
HRCT1	2,7422724	up	0,002244216	histidine rich carboxyl terminus 1
EMP2	2,7154112	up	0,002351529	epithelial membrane protein 2
SAR1B	2,7093115	up	0,000697183	SAR1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
SULT1E1	2,7057536	up	0,004929718	sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1
ANKRD34A	2,7046895	up	0,015197493	ankyrin repeat domain 34A
VAV3	2,7008343	up	0,023936199	vav 3 guanine nucleotide exchange factor

TIMP3	2,6999521	up	0,001159558	TIMP metallopeptidase inhibitor 3
GPR133	2,6979544	up	0,021854416	G protein-coupled receptor 133
FRY	2,6839485	up	0,001800876	furry homolog (Drosophila)
HES3	2,6480198	up	0,033759113	hairy and enhancer of split 3 (Drosophila)
IL6ST	2,6446507	up	0,000697183	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
GOLGA4	2,6341038	up	0,001485047	golgin A4
FRY	2,6050215	up	0,048553366	furry homolog (Drosophila)
FGF5	2,5887837	up	0,000950188	fibroblast growth factor 5
CELF5	2,582826	up	0,023972848	CUGBP, Elav-like family member 5
ELN	2,5821455	up	0,017376566	elastin
DNAJB8	2,5820372	up	0,04181308	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 8
PADI1	2,5676403	up	0,003018772	peptidyl arginine deiminase, type I
DNMT1	2,5665	up	0,005490148	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
KLF5	2,5650973	up	0,002268767	Kruppel-like factor 5 (intestinal)
KRTAP1-5	2,5625873	up	0,018019674	keratin associated protein 1-5
CORO2A	2,5491025	up	0,047590215	coronin, actin binding protein, 2A
STXBP6	2,5393715	up	0,0311614	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
LAMP2	2,5349615	up	0,001109072	lysosomal-associated membrane protein 2
ECEL1	2,531505	up	0,036769755	endothelin converting enzyme-like 1
IQSEC1	2,5290883	up	0,005474829	IQ motif and Sec7 domain 1
NEDD9	2,5255697	up	0,01249921	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
NACAD	2,5160923	up	0,004564228	NAC alpha domain containing
SHISA3	2,515423	up	0,001203156	shisa homolog 3 (Xenopus laevis)
TRIM46	2,5145576	up	0,005478669	tripartite motif containing 46
FGD4	2,5026157	up	0,00775204	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
LOC401093	2,498931	up	0,018801864	hypothetical LOC401093
HSD3B7	2,484315	up	0,002821257	hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7
ROD1	2,4684625	up	0,000845092	ROD1 regulator of differentiation 1 (S. pombe)
NPPB	2,4665492	up	0,003091603	natriuretic peptide B
FGD4	2,4514775	up	0,000897739	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
ZC3HAV1	2,4506416	up	0,010860343	zinc finger CCCH-type, antiviral 1
HAS2	2,4479604	up	0,000956996	hyaluronan synthase 2
NEDD9	2,429677	up	0,005539647	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 9
ILF3	2,4295983	up	0,000300635	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
C11orf87	2,4261222	up	0,004337028	chromosome 11 open reading frame 87
CNN1	2,415209	up	0,024885371	calponin 1, basic, smooth muscle
TMEM50B	2,4041355	up	0,000401762	transmembrane protein 50B
FAM180A	2,4009957	up	0,00217934	family with sequence similarity 180, member A
LIMS2	2,3881347	up	0,000897739	LIM and senescent cell antigen-like domains 2
LIMS2	2,3862236	up	0,002733656	LIM and senescent cell antigen-like domains 2
FGD4	2,382877	up	0,04351794	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4
NPPB	2,3709188	up	0,00436432	natriuretic peptide B
IL6ST	2,362366	up	0,006127187	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
AP1S3	2,3582127	up	0,00710083	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit
PRICKLE1	2,3176792	up	0,016007442	prickle homolog 1 (Drosophila)
SLC14A1	2,3029964	up	0,004414263	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)
IL6ST	2,2945113	up	0,001741738	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
IL6ST	2,292009	up	0,000906104	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
MALL	2,2888818	up	0,00212618	mal, T-cell differentiation protein-like
MRGPRF	2,2883902	up	0,001792524	MAS-related GPR, member F
SLC41A1	2,2870412	up	0,001291257	solute carrier family 41, member 1
AP1S3	2,285696	up	0,002878851	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit
ACTG2	2,2843578	up	0,02278607	actin, gamma 2, smooth muscle, enteric
IL10RB	2,2759864	up	0,000705734	interleukin 10 receptor, beta
CREM	2,272362	up	0,015679048	cAMP responsive element modulator

MAOB	2,2716928	up	0,002900852	monoamine oxidase B
PLAT	2,2650285	up	0,004949485	plasminogen activator, tissue
FABP5	2,2618132	up	0,001171791	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
RUNX1T1	2,258127	up	0,001672595	runt-related transcription factor 1; translocated to, 1 (cyclin D-related)
IL6ST	2,250657	up	0,001630408	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor)
SCAMP1	2,2504444	up	0,004440303	secretory carrier membrane protein 1
ARHGAP44	2,2438624	up	0,008065642	Rho GTPase activating protein 44
SGCD	2,241186	up	0,005719346	sarcoglycan, delta (35kDa dystrophin-associated glycoprotein)
HS6ST1	2,235759	up	0,007951238	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1
TACC2	2,2357087	up	0,000578322	transforming, acidic coiled-coil containing protein 2
NEURL1B	2,2121317	up	0,003122692	neuralized homolog 1B (Drosophila)
FABP5	2,211497	up	0,00146656	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
LOC158376	2,2103586	up	0,013195324	hypothetical LOC158376
AP1S3	2,2010024	up	0,000697183	adaptor-related protein complex 1, sigma 3 subunit
LSM14A	2,1863637	up	0,004949485	LSM14A, SCD6 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
TFAP2D	2,1827037	up	0,028765121	transcription factor AP-2 delta (activating enhancer binding protein 2 delta)
SEC24A	2,1714792	up	0,003055045	SEC24 family, member A (<i>S. cerevisiae</i>)
FOXS1	2,1709826	up	0,012638926	forkhead box S1
SIX3	2,166047	up	0,012362498	SIX homeobox 3
FABP5	2,1660213	up	0,005608373	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)
LOC100505880	2,1635885	up	0,00146656	hypothetical LOC100505880
C4orf49	2,1556227	up	0,00250642	chromosome 4 open reading frame 49
C1orf21	2,1501067	up	0,002004223	chromosome 1 open reading frame 21
TRIB2	2,1495724	up	0,014442846	tribbles homolog 2 (Drosophila)
LCE2A	2,1457717	up	0,010179182	late cornified envelope 2A
NID1	2,1455066	up	0,012775908	nidogen 1
NTM	2,1443474	up	0,004337028	neurotrimin
NEK7	2,143403	up	0,015424439	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7
EDIL3	2,1372457	up	0,023558741	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3
GNB1	2,1305678	up	0,016068105	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1
CNTN1	2,1297245	up	0,008085949	contactin 1
CDK14	2,1235502	up	0,004564215	cyclin-dependent kinase 14
SULT1B1	2,1210082	up	0,012961809	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1
MFSD6	2,117468	up	0,006146618	major facilitator superfamily domain containing 6
PAWR	2,1172595	up	0,001830553	PRKC, apoptosis, WT1, regulator
CCDC85C	2,116995	up	0,001480907	coiled-coil domain containing 85C
MCCD1	2,115506	up	0,007151484	mitochondrial coiled-coil domain 1
ACPL2	2,1143105	up	0,001826357	acid phosphatase-like 2
FMN2	2,1136873	up	0,007360595	formin 2
HAS3	2,1056468	up	0,004269993	hyaluronan synthase 3
TMEM191A	2,1038368	up	0,002415521	transmembrane protein 191A
KLF2	2,0958734	up	0,000705734	Kruppel-like factor 2 (lung)
LIMCH1	2,0923283	up	0,00146656	LIM and calponin homology domains 1
FSTL3	2,0885544	up	0,004434731	follistatin-like 3 (secreted glycoprotein)
CLIC3	2,0859137	up	0,027700001	chloride intracellular channel 3
SLC14A1	2,0827653	up	0,010446974	solute carrier family 14 (urea transporter), member 1 (Kidd blood group)
MAMDC2	2,0825443	up	0,049543887	MAM domain containing 2
C3orf57	2,0762591	up	0,03991403	chromosome 3 open reading frame 57
MAP6D1	2,07544	up	0,000949677	MAP6 domain containing 1
PF4V1	2,0646887	up	0,007461132	platelet factor 4 variant 1
STXBP6	2,0638726	up	0,015474404	syntaxin binding protein 6 (amisyn)
LUZP6	2,0594013	up	0,008416493	leucine zipper protein 6
ARHGEF4	2,0573745	up	0,008216706	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4
POLR3G	2,0572731	up	0,003122692	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide G (32kD)
FAM184A	2,044972	up	0,03331794	family with sequence similarity 184, member A
TMEM171	2,0330415	up	0,002246101	transmembrane protein 171

PLXNA4	2,032527	up	0,007851721	plexin A4
AK5	2,0214746	up	0,001538638	adenylate kinase 5
EFHD1	2,0203438	up	0,044273764	EF-hand domain family, member D1
RAP2B	2,0200613	up	0,001485047	RAP2B, member of RAS oncogene family
DPEP1	2,0140555	up	0,02605077	dipeptidase 1 (renal)
REEP2	2,0107415	up	0,00315608	receptor accessory protein 2
TAGLN3	2,0089014	up	0,02422624	transgelin 3
RAB14	2,0045233	up	0,002155878	RAB14, member RAS oncogene family
C6orf126	2,0036876	up	0,040495705	chromosome 6 open reading frame 126
TGFBR3	-12,882399	down	0,009407193	transforming growth factor, beta receptor III
BIK	-6,2069125	down	0,02303809	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
OLAH	-5,635162	down	0,018872172	oleoyl-ACP hydrolase
PI15	-5,335474	down	0,005799365	peptidase inhibitor 15
MGAT4C	-4,8839364	down	0,003493249	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative)
SLC7A14	-4,882574	down	0,04725388	solute carrier family 7 (orphan transporter), member 14
RCSD1	-4,8479595	down	0,03370897	RCSD domain containing 1
TNIP3	-4,7111077	down	0,003091702	TNFAIP3 interacting protein 3
LIPH	-4,650981	down	0,004028883	lipase, member H
CTSS	-4,3876286	down	0,011711858	cathepsin S
ACVR2B	-4,372847	down	0,025434557	activin A receptor, type IIB
RNF144B	-4,238587	down	0,005838513	ring finger protein 144B
VNN1	-4,206788	down	0,008879793	vanin 1
C6orf58	-4,061268	down	0,008088573	chromosome 6 open reading frame 58
TACSTD2	-3,942281	down	0,003686709	tumor-associated calcium signal transducer 2
LOC284751	-3,8455312	down	0,029874237	hypothetical LOC284751
LOC100131053	-3,8264487	down	0,006108452	hypothetical LOC100131053
TYRP1	-3,8074846	down	0,007259957	tyrosinase-related protein 1
CSF3	-3,7803254	down	0,006344665	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
SSTR2	-3,7352748	down	0,015474404	somatostatin receptor 2
CCL20	-3,7095983	down	0,00556655	chemokine (C-C motif) ligand 20
LOC100131089	-3,6716435	down	0,035330925	hypothetical LOC100131089
EHF	-3,6650157	down	0,005588273	ets homologous factor
LOC389300	-3,640144	down	0,006349341	hypothetical protein LOC389300
MGAT4C	-3,6375227	down	0,048382893	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative)
ADAMTS5	-3,6051004	down	0,00212618	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 5
C15orf48	-3,5658658	down	0,004766919	chromosome 15 open reading frame 48
RBM47	-3,5480442	down	0,002991567	RNA binding motif protein 47
IL24	-3,5427089	down	0,036104653	interleukin 24
GPR68	-3,5329218	down	0,002571262	G protein-coupled receptor 68
CSF3	-3,5133936	down	0,000897739	colony stimulating factor 3 (granulocyte)
LOC100128593	-3,4941688	down	0,004564215	hypothetical LOC100128593
APOL6	-3,490482	down	0,022776432	apolipoprotein L, 6
ADAMTS9	-3,3893514	down	0,000697183	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9
EI24	-3,3665552	down	0,000228652	etoposide induced 2.4 mRNA
HEY1	-3,3612962	down	0,002124738	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1
CYP2S1	-3,2892053	down	0,001203156	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1
MYO15A	-3,283032	down	0,029874237	myosin XVA
CASP1	-3,27847	down	0,001480907	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
CYP2S1	-3,1990907	down	0,000697183	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1
KYNU	-3,1829772	down	0,017143195	kynureninase
LONRF3	-3,1583564	down	0,026754802	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3
CYP1B1	-3,1556497	down	0,009467826	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
CYP1B1	-3,112706	down	0,001672595	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
THBS2	-3,0889494	down	0,003340028	thrombospondin 2
CXCL12	-3,0877857	down	0,000908197	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
CA5B	-3,0542455	down	0,017449193	carbonic anhydrase VB, mitochondrial
DCUN1D4	-3,0508232	down	0,006211703	DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain contain-

				ing 4 (<i>S. cerevisiae</i>)
ASTN1	-3,0259624	down	0,028836884	astrotactin 1
IL1RAP	-3,0168836	down	0,007265717	interleukin 1 receptor accessory protein
CSF2	-2,9772892	down	0,010135944	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)
TNPO1	-2,9649708	down	0,001939253	transportin 1
BIRC3	-2,9589443	down	0,007096408	baculoviral IAP repeat containing 3
NMU	-2,956427	down	0,02231173	neuromedin U
CDK6	-2,9254768	down	0,000578322	cyclin-dependent kinase 6
KPNA5	-2,9160624	down	0,011533082	karyopherin alpha 5 (importin alpha 6)
CLCA3P	-2,8954115	down	0,029392498	chloride channel accessory 3, pseudogene
AMPD3	-2,8912044	down	0,001213214	adenosine monophosphate deaminase 3
CYP1A1	-2,8385818	down	0,005505018	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
DOCK8	-2,8293827	down	0,038915835	dedicator of cytokinesis 8
EFNA5	-2,8209713	down	0,049623292	ephrin-A5
INSIG1	-2,799767	down	0,000578322	insulin induced gene 1
ABCA1	-2,7917314	down	0,000697183	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
PDK4	-2,7887268	down	0,004669244	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
LOC253039	-2,7848215	down	0,04405018	hypothetical LOC253039
NPTX1	-2,7816331	down	0,001672595	neuronal pentraxin I
CHD7	-2,7756777	down	0,020097483	chromodomain helicase DNA binding protein 7
CCL8	-2,7489896	down	0,044471327	chemokine (C-C motif) ligand 8
ANKK1	-2,7475061	down	0,03531058	ankyrin repeat and kinase domain containing 1
CCDC102B	-2,736467	down	0,023991928	coiled-coil domain containing 102B
TNFAIP2	-2,7127056	down	0,000897739	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2
IL24	-2,712104	down	0,03778269	interleukin 24
MOV10L1	-2,7051258	down	0,03659591	Mov10L1, Moloney leukemia virus 10-like 1, homolog (mouse)
TCP11L2	-2,6973314	down	0,005161854	t-complex 11 (mouse)-like 2
NUPL1	-2,6889093	down	0,000897739	nucleoporin like 1
GCNT2	-2,683513	down	0,012362498	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme (I blood group)
C4orf7	-2,6639237	down	0,03389971	chromosome 4 open reading frame 7
TRIM50	-2,6631322	down	0,03996143	tripartite motif containing 50
C7orf69	-2,6615484	down	0,017646965	chromosome 7 open reading frame 69
DCP2	-2,6612291	down	0,000956996	DCP2 decapping enzyme homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
CRISPLD1	-2,6606688	down	0,018842895	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 1
FKSG2	-2,650496	down	0,011890016	tumor protein, translationally-controlled 1 pseudogene
ARHGEF7	-2,6489463	down	0,02187961	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7
OSCP1	-2,6477065	down	0,000147769	organic solute carrier partner 1
PTPRN2	-2,6337328	down	0,025960883	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N polypeptide 2
MOV10L1	-2,6096146	down	0,020229723	Mov10L1, Moloney leukemia virus 10-like 1, homolog (mouse)
SLC35F3	-2,6069636	down	0,028250722	solute carrier family 35, member F3
MYLK4	-2,601363	down	0,03132362	myosin light chain kinase family, member 4
CES1	-2,5638022	down	0,010446974	carboxylesterase 1
IL7R	-2,5612156	down	0,004028883	interleukin 7 receptor
TMEM132B	-2,5606325	down	0,03128378	transmembrane protein 132B
TTC29	-2,532599	down	0,006147575	tetratricopeptide repeat domain 29
CCDC102B	-2,525807	down	0,042714182	coiled-coil domain containing 102B
NHLRC3	-2,5249546	down	0,016144285	NHL repeat containing 3
CARD16	-2,5182812	down	0,004394723	caspase recruitment domain family, member 16
RAB27B	-2,5095718	down	0,005211388	RAB27B, member RAS oncogene family
SCML2	-2,509522	down	0,049258552	sex comb on midleg-like 2 (<i>Drosophila</i>)
ESR1	-2,484491	down	0,017099926	estrogen receptor 1
UBE2L6	-2,4831526	down	0,001913001	ubiquitin-conjugating enzyme E2L 6
MICB	-2,4583452	down	0,003399298	MHC class I polypeptide-related sequence B
CARD17	-2,4512417	down	0,004257922	caspase recruitment domain family, member 17
KLHL28	-2,4508724	down	0,00315608	kelch-like 28 (<i>Drosophila</i>)
IL1A	-2,4447293	down	0,004369128	interleukin 1, alpha
PDHX	-2,434946	down	0,001830553	pyruvate dehydrogenase complex, component X

MTMR9	-2,4329348	down	0,00059473	myotubularin related protein 9
TMEM2	-2,4303002	down	0,005830365	transmembrane protein 2
CXCL2	-2,4078572	down	0,005161854	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
NPTX2	-2,3969018	down	0,002064133	neuronal pentraxin II
KCNE4	-2,3939433	down	0,018847276	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4
CTR9	-2,3882246	down	0,001247769	Ctr9, Paf1/RNA polymerase II complex component, homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
OR11H12	-2,3771815	down	0,03653131	olfactory receptor, family 11, subfamily H, member 12
OSCP1	-2,3726041	down	0,003015556	organic solute carrier partner 1
BDNF-AS1	-2,3660567	down	0,030376583	BDNF antisense RNA 1 (non-protein coding)
DKFZP58611420	-2,3633852	down	0,008527562	hypothetical protein DKFZp58611420
MAPK8	-2,3613808	down	0,01570986	mitogen-activated protein kinase 8
CLDN1	-2,359808	down	0,002868075	claudin 1
KLRC4	-2,3572826	down	0,026351282	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4
TFEC	-2,3506448	down	0,002794812	transcription factor EC
RNF113B	-2,3496428	down	0,030039629	ring finger protein 113B
GFPT1	-2,340137	down	0,003927201	glutamine--fructose-6-phosphate transaminase 1
IL6R	-2,335115	down	0,04947946	interleukin 6 receptor
LSM11	-2,3297594	down	0,025647279	LSM11, U7 small nuclear RNA associated
ZMAT4	-2,311299	down	0,010822386	zinc finger, matrin-type 4
IFIT3	-2,3033528	down	0,025394915	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
TMEM2	-2,2916842	down	0,0435523	transmembrane protein 2
FBXL17	-2,283864	down	0,04333702	F-box and leucine-rich repeat protein 17
RAB38	-2,280304	down	0,006037534	RAB38, member RAS oncogene family
APOL6	-2,2674644	down	0,02838132	apolipoprotein L, 6
SECTM1	-2,2581089	down	0,004500918	secreted and transmembrane 1
SMPD3	-2,2546	down	0,02353032	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)
C10orf112	-2,249407	down	0,008482566	chromosome 10 open reading frame 112
ZNRD1-AS1	-2,2488441	down	0,005561341	ZNRD1 antisense RNA 1 (non-protein coding)
HAS1	-2,2388995	down	0,038235247	hyaluronan synthase 1
FAM166B	-2,227004	down	0,0359127	family with sequence similarity 166, member B
FUNDC2	-2,2263107	down	0,01836429	FUN14 domain containing 2
SYTL2	-2,2239933	down	0,009704356	synaptotagmin-like 2
EREG	-2,2178793	down	0,048504446	epiregulin
FLRT3	-2,2059913	down	0,013696129	fibronectin leucine rich transmembrane protein 3
ERP44	-2,1966527	down	0,016068105	endoplasmic reticulum protein 44
HERC5	-2,194803	down	0,027944973	hect domain and RLD 5
TDG	-2,1930828	down	0,000697183	thymine-DNA glycosylase
SLC40A1	-2,1868746	down	0,015025019	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
LOC400891	-2,186504	down	0,026465805	chromosome 14 open reading frame 166B pseudogene
B7H6	-2,1859503	down	0,001658435	B7 homolog 6
ABCA1	-2,1847563	down	0,002193047	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1
IL4I1	-2,1760817	down	0,019465754	interleukin 4 induced 1
GXYLT1	-2,1693687	down	0,005936066	glucoside xylosyltransferase 1
PHF20L1	-2,1566546	down	0,006546442	PHD finger protein 20-like 1
KLHL3	-2,152969	down	0,04682985	kelch-like 3 (<i>Drosophila</i>)
GCH1	-2,1517704	down	0,00315608	GTP cyclohydrolase 1
EVI2B	-2,1488805	down	0,04579928	ecotropic viral integration site 2B
TTC29	-2,1364567	down	0,018206008	tetratricopeptide repeat domain 29
SLCO2B1	-2,1212423	down	0,029303875	solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
ANGPTL1	-2,1176963	down	0,042895697	angiopoietin-like 1
KDR	-2,1104887	down	0,000950188	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
KIAA1217	-2,1101637	down	0,012228697	KIAA1217
CCDC30	-2,1070971	down	0,008204614	coiled-coil domain containing 30
ZC3H6	-2,1018422	down	0,00436432	zinc finger CCCH-type containing 6
NUPL1	-2,0994208	down	0,025517574	nucleoporin like 1
KCNU1	-2,0991554	down	0,0299856	potassium channel, subfamily U, member 1

STATH	-2,0988626	down	0,024249991	statherin
C12orf39	-2,094552	down	0,006041629	chromosome 12 open reading frame 39
MGC50722	-2,0945377	down	0,003171202	hypothetical MGC50722
LOC283050	-2,0899286	down	0,023043413	hypothetical LOC283050
DDIT4	-2,0877566	down	0,018960742	DNA-damage-inducible transcript 4
FAM134B	-2,0872426	down	0,017295629	family with sequence similarity 134, member B
SLC39A8	-2,0864835	down	0,04701968	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8
PATL2	-2,085327	down	0,004679356	protein associated with topoisomerase II homolog 2 (yeast)
KLHL24	-2,0759318	down	0,003733161	kelch-like 24 (Drosophila)
LOC400550	-2,0745423	down	0,014152426	hypothetical LOC400550
TMEM164	-2,0738723	down	0,003930771	transmembrane protein 164
CLDN11	-2,066924	down	0,005532415	claudin 11
F2RL3	-2,053572	down	0,004414263	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 3
MSL3	-2,052506	down	0,035999347	male-specific lethal 3 homolog (Drosophila)
SLC2A14	-2,0478163	down	0,006108452	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14
TNFRSF11B	-2,047536	down	0,001942864	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
TMEM133	-2,043899	down	0,030250527	transmembrane protein 133
C5orf41	-2,041789	down	0,000845092	chromosome 5 open reading frame 41
HMGA2	-2,0402415	down	0,000906104	high mobility group AT-hook 2
E2F7	-2,0373034	down	0,003272547	E2F transcription factor 7
CD164	-2,029337	down	0,001526313	CD164 molecule, sialomucin
COLEC10	-2,0258944	down	0,045174256	collectin sub-family member 10 (C-type lectin)
ENAH	-2,0255623	down	0,038391124	enabled homolog (Drosophila)
CYP2B6	-2,0235722	down	0,04522413	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6
CD82	-2,0228133	down	0,002332729	CD82 molecule
IRF1	-2,020699	down	0,001203156	interferon regulatory factor 1
AOX1	-2,0180745	down	0,006650364	aldehyde oxidase 1
DTNA	-2,0153065	down	0,019475387	dystrobrevin, alpha
LOC201651	-2,0140824	down	0,030959351	arylacetamide deacetylase (esterase) pseudogene
PANK1	-2,012341	down	0,01686698	pantothenate kinase 1
TDG	-2,007256	down	0,041969046	thymine-DNA glycosylase
PLD1	-2,0022912	down	0,002320272	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
ADAMTS14	-2,0005534	down	0,04832067	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 14

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

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

Publikationen:

Thilo J. Witsch, **Gero Niess**, Elpidoforos Sakkas, Tatyana Likhoshvay, Simone Becker, Susanne Herold, Konstantin Mayer, István Vadász, Werner Seeger and Rory E. Morty

Transglutaminases: new players in clinical and experimental bronchopulmonary dysplasia? *European Respiratory Journal*, 2013 **in Revision**

Thilo J. Witsch, Paweł Turowski, Elpidoforos Sakkas, **Gero Niess**, Simone Becker, Susanne Herold, Konstantin Mayer, István Vadász, Werner Seeger, and Rory E. Morty

Deregulation of the lysyl hydroxylase matrix cross-linking system in experimental and clinical bronchopulmonary dysplasia. *American J. AJP Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2013 **in Revision**

Julian T. Schwartze, Simone Becker, Elpidoforos Sakkas, Łukasz A. Wujak, **Gero Niess**, Jakob Usemann, Susanne Herold, István Vadász, Konstantin Mayer, Werner Seeger and Rory E. Morty.

Glucocorticoids recruit Tgfb β 3 and Smad1 to shift transforming growth factor- β signaling from the Tgfb β 1/Smad3 axis to the Acvr11/Smad1 axis in lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 2013 **in Revision**

Alexander H. Nave, **Gero Niess**, Frank Reichenberger, Maria L. Talavera, Istvan Vadasz, Susanne Herold, Konstantin Mayer, Werner Seeger, Norbert Weissmann, Rory E. Morty

Lysyl oxidases are dysregulated in clinical and experimental pulmonary hypertension and play causal role in pulmonary vascular remodeling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012 **in Revision**

Hecker, M., Z. Zaslona, G. Kwapiszewska, **G. Niess**, A. Zakrzewicz, E. Hergenreider, J. Wilhelm, L. M. Marsh, D. Sedding, W. Klepetko, J. Lohmeyer, S. Dimmeler, W. Seeger, N. Weissmann, R. T. Schermuly, N. Kneidinger, O. Eickelberg, and R. E. Morty.

Dysregulation of the IL-13 receptor system: a novel pathomechanism in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182 (6):805-818 2010.

Präsentationen / Poster-Präsentation / Poster-Diskussionen:

- 2013 Experimental Biology, Boston, USA
Poster-Präsentation zum Thema: Lung Physiology: Vascular Smooth Muscle Biology, Vascular Regulation and Hypoxia
Titel des Posters: The role of the type III transforming growth factor- β receptor Tgfb β 3 in the regulation of pulmonary vascular development
- 2012 UGMLC/DZL Symposium: Remodeling, Repair and Regeneration in Lung Diseases, Marburg, Deutschland
Titel des Posters: The role of the type III transforming growth factor- β receptors in the regulation of pulmonary vascular development
- 2012 American Thoracic Society International Conference (ATS), San Francisco, USA
Poster-Präsentation zum Thema: Pulmonary Vascular Structure, Function, And Signaling
Titel des Posters: The Role Of The Type III Transforming Growth Factor- β Receptors In The Regulation Of Pulmonary Vascular Development (Poster A4846)
- 2011 European Respiratory Society Conference (ERS), Amsterdam, Niederlande
Poster-Diskussion zum Thema: Experimental pulmonary hypertension (Session 369)
Titel der Präsentation: The role of the accessory type III transforming growth factor- β receptors in the regulation of pulmonary vascular development
- 2010 European Respiratory Society Conference (ERS), Barcelona, Spanien
Poster-Diskussion zum Thema: New mechanisms in lung development, acute and chronic lung diseases
Titel der Präsentation: Pulmonary vascular smooth muscle cell function is impaired during perturbed alveolarisation of developing mouse lungs

Auszeichnungen:

- 2011 European Respiratory Society Conference (ERS), Amsterdam, Niederlande
The cell & molecular biology young scientist travel grant 2011
Für den Abstract mit dem Titel: The role of the accessory type III transforming growth factor- β receptors in the regulation of pulmonary vascular development

14 Eidesstattliche Versicherung

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

Ort, Datum

Unterschrift



Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
durch den Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6110-4



9 783835 961104