

Untersuchungen zu neuen, am vaskulären Umbau von idiopathischer und sekundärer pulmonal-arterieller Hypertonie beteiligten Genen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Trösser, Roger

aus Bangkok

Gießen, 2010

Aus dem Institut für Pathologie
der Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Gießen
kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Moll

Gutachter: Prof. Dr. Fink

Gutachter: Prof. Dr. Noll

Tag der Disputation: 22.02.2011

Meiner Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Aqua _{dest.}	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BMP(R)	bone morphogenetic protein (receptor)
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
CT	Threshold Cycle (Maß für die initiale Kopienzahl einer RNA)
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC	Endothelzellen
ECM	Extrazellulärmatrix
<i>et al.</i>	und andere
FEV ₁	forciertes expiratorisches 1-Sekundenvolumen
FHL-1	Four and a half LIM domain 1
FP	Vorwärts-Primer
g	Gramm oder Beschleunigung (1g = 9.81m/s ²)
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
h	Stunde(n) (<i>hour</i>)
H	Hypoxie
HCM	hypertrophische Kardiomyopathie
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
HPRT	hypoxantin-guanin-phosphoribosyltransferase
HPV	hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion
hu	human
HZV	Herzzeitvolumen
IF	Immunfluoreszenz
IPAH	idiopathische pulmonal arterielle Hypertonie
kDa	Kilo Dalton
LIM	Lin11, Isl-1 & Mec-3 (Zinkfingerstruktur)
M	molare Masse
MAPK	mitogen-activated protein kinases

mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mPAP	mittlerer pulmonal-arterieller Druck
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
N	Normoxie
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
PASMC	pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen
PBGD	porphobilinogen desaminase
PCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PH	pulmonale Hypertonie
PNS	peripheres Nervensystem
PO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
RAGE	receptor for advanced glycation
rcf	relative Zentrifugalkraft
RNA	Ribonukleinsäuren
ROS	reactive oxygen species
RP	Rückwärts-Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute
sek	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERT	Serotonintransporter
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SMC	glatte Muskelzelle (smooth muscle cell)
s.o.	siehe oben
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TGF-β	transforming growth factor-beta
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TrkB	Tyrosinrezeptorkinase B
TSP-1	Thrombospondin-1
U	Einheit(en), (unit)
u.a.	unter anderem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSMC	vaskuläre glatte Muskelzellen
WB	Western Blot
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Pulmonale Hypertonie	1
1.1.1 Einteilung und Klassifikation	1
1.1.2 Pathophysiologie	2
1.1.3 Morphologische Veränderungen.....	3
1.1.4 Die IPAH	4
1.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie	6
1.2.1 Sauerstoff.....	6
1.2.2 Die Wirkung von Hypoxie auf den Gesamtorganismus und das Lungengewebe.....	7
1.2.3 Hypoxie-bedingter Gefäßumbau.....	8
1.2.4 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) als Beispiel einer sekundären Hypoxie-induzierten PH	10
1.3 Hypoxie-assoziierte Gen- und Protein-veränderungen	12
1.3.1 Überblick	12
1.3.2 FHL-1	13
1.3.3 S100 A4	14
1.3.4 BDNF	15
1.3.5 TrkB	16
1.3.6 TSP-1	16
1.3.7 CD36.....	17
1.4 Fragestellung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Materialien	20
2.1.1 Instrumente und Geräte.....	20
2.1.2 Chemikalien, Inkubationsmedien, Sera und Enzyme	21
2.1.3 Kommerzielle Assays und Detektionsagenzien	22

2.1.4	Antikörper	22
2.1.5	PCR-Reagenzien	24
2.1.6	Software und Datenbanken	25
2.2	Untersuchungen am Lungengewebe und an der Zellkultur (Primärkultur)	25
2.2.1	Experimentelle Planung	25
2.2.2	Lungenhomogenat	26
2.2.3	Isolation und Kultur der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und Fibroblasten der Adventitia	27
2.2.4	Hypoxiestimulation	28
2.3	Real-time PCR	29
2.3.1	RNA-Isolation aus Lungenhomogenat und Primärkultur	29
2.3.2	RNA-Konzentrationsbestimmung	29
2.3.3	Reverse Transkription der RNA (cDNA Synthese)	29
2.3.4	Quantitative real-time-PCR	30
2.3.5	Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese	33
2.3.6	Primer Sequenzen und Länge des Amplifikates	34
2.4	Indirekte Immunfluoreszenz der Zellkultur	35
2.4.1	Färbetechnik	35
2.4.2	Auswertung am Immunfluoreszenz-Mikroskop	36
2.5	Western Blot Analyse	36
2.5.1	Messung der Proteinkonzentration und Aufbereitung der Proteine	36
2.5.2	SDS-Page Elektrophorese	37
2.5.3	Transfer der Gele auf PVDF-Membranen (Blotting)	37
2.5.4	Immundetektion	37
2.5.5	Membranstripping	38
2.5.6	Bestimmung der Bandenintensitäten mittels Densitometrie	38
2.6	Statistische Auswertung	38
3	Ergebnisse	39
3.1	FHL-1	39
3.1.1	RNA-Expression im Lungenhomogenat	39
3.1.2	Proteinexpression im Lungenhomogenat	39
3.1.3	Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation	40

3.1.4	Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	41
3.1.5	Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	43
3.2	S100 A4.....	46
3.2.1	RNA-Expression im Lungenhomogenat.....	46
3.2.2	Proteinexpression im Lungenhomogenat.....	46
3.2.3	Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	47
3.2.4	Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	48
3.2.5	Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	50
3.3	BDNF.....	51
3.3.1	RNA-Expression im Lungenhomogenat.....	51
3.3.2	Proteinexpression im Lungenhomogenat.....	51
3.3.3	Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	52
3.3.4	Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	53
3.3.5	Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	53
3.4	TrkB.....	55
3.4.1	RNA-Expression im Lungenhomogenat.....	55
3.4.2	Proteinexpression im Lungenhomogenat.....	55
3.4.3	Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	56
3.4.4	Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	57
3.4.5	Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	59
3.5	TSP-1.....	60
3.5.1	RNA-Expression im Lungenhomogenat.....	60
3.5.2	Proteinexpression im Lungenhomogenat.....	61
3.5.3	Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	61
3.5.4	Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	62
3.5.5	Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	64

3.6	CD36	65
3.6.1	RNA-Expression im Lungenhomogenat.....	65
3.6.2	Proteinexpression im Lungenhomogenat.....	65
3.6.3	Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	65
3.6.4	Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	66
3.6.5	Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation.....	67
4	Diskussion	69
4.1	Einführung	69
4.2	Technische Aspekte	72
4.2.1	Lungenhomogenat und Zellkultur	72
4.2.2	Vergleichbarkeit von Subpopulationen in PASMC und Fibroblasten	73
4.2.3	Messfehler im Zusammenhang mit den Patientenproben	74
4.3	Differentielle Expression auf Gen- und Proteinebene	75
4.3.1	FHL-1	75
4.3.2	S100 A4	78
4.3.3	BDNF und TrkB.....	82
4.3.4	TSP-1 und CD36.....	86
4.4	Schlussfolgerungen und Ausblick	91
5	Zusammenfassung	92
6	Summary	94
7	Literaturverzeichnis	96
8	Publikationen	116
9	Patientendatentabelle	117
10	Eidesstattliche Erklärung	119

11 Danksagung..... 120

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) stellt ein Symptom dar, welches idiopathisch oder als Folge verschiedener Krankheiten auftreten kann. Sie kann in verschiedene Formen eingeteilt werden.

1.1.1 Einteilung und Klassifikation

Nach der Klassifikation des Weltkongresses für pulmonale Hypertonie in Venedig 2003 gilt heute folgende Einteilung in 5 Kategorien (<http://www.kup.at/kardiologie>) [1]:

1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH):

- Idiopathische (IPAH) und familiäre PAH (FPAH) [früher primäre pulmonale Hypertonie (PPH)]
- Assoziierte pulmonal-arterielle Hypertonie (APAH) bei: Bindegewebserkrankung, angeborene systemisch-pulmonalen Shunts (u. a. Herzfehler), portale Hypertension, HIV-Infektion, Medikamente und Giftstoffe, andere Erkrankungen (der Schilddrüse, Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Splenektomie usw.), pulmonal-arterielle Hypertonie mit relevanter venöser oder kapillärer Beteiligung, pulmonale veno-okklusive Erkrankung (PVOD), pulmonale kapilläre Hämangiomatosis (PCH), persistierende pulmonal-arterielle Hypertonie des Neugeborenen (PPHN)

2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des linken Herzens:

Erkrankung des linken Vorhofs oder Ventrikels, Mitral- oder Aortenklappenfehler

3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankung und/oder Hypoxie:

Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Interstitielle Lungenerkrankung, Schlafapnoe-Syndrom, Alveolärer Hypoventilation, Chronische Höhenkrankheit, Anlagebedingte Fehlbildungen

4. Pulmonale Hypertonie aufgrund chronischer Thrombembolien (CTEPH):

Thrombembolischer Verschluss proximaler Lungenarterien, Thrombembolischer Verschluss distaler Lungenarterien, Nicht-thrombotische Lungenembolien (Tumor, Parasiten, Fremdkörper)

5. Sonstige:

Sarkoidose, Histiozytose X, Lymphangiomatosis usw.

Eine alternative Unterteilung der sekundären PH kann anhand der Ätiologie und Pathogenese erfolgen (**Tabelle 1**). Allen Formen gemeinsam ist ein pulmonaler Widerstandshochdruck.

Tabelle 1: Ätiologie und Pathogenese der sekundären PH [2]

Hypertonieform	Ätiologie	Pathogenese
Vasorestriktive PH	Lungenfibrosen, Lungentuberkulose, Morbus Boeck, Pneumokoniosen	Zerstörung des Lungenparenchyms und eingefasster Gefäße
Vasoostruktive PH	kongenitale Lungenarterienstenose, rezidivierende Lungenembolien, Panarteriitis nodosa	Verminderung des Lungengefäßquerschnittes
Vasokonstriktive PH	COPD, Chronische Höhenexposition	Verminderung des alveolären Sauerstoffpartialdruckes → Vasokonstriktion

1.1.2 Pathophysiologie

Physiologisch wird der Druck im Lungenkreislauf auf 16-20mmHg begrenzt. Dieses wird durch einen Autoregulationsmechanismus des Körpers bewerkstelligt. Als pulmonale Hypertonie, also einer Hypertonie des Lungenkreislaufes, versteht man eine Erhöhung des mittleren pulmonal-arteriellen Drucks auf mehr als 25mmHg in Ruhe oder 30mmHg unter Belastung. Ein Anstieg des pulmonal-vaskulären Widerstandes führt durch Abnahme des Herzzeitvolumens (HZV) zu einem konsekutiven Druckanstieg. Dies führt zu einem Lungengefäßumbau (Remodelling). Druckanstieg, Remodelling und Abnahme des HZV bilden einen Circulus vitiosus. Eine Konsequenz daraus ist die Ausbildung einer Rechtsherzhypertrophie bzw. eines Cor pulmonale [3]. Das Ansprechen der Pulmonalgefäße auf vasodilatierende Substanzen ist unterschiedlich gut und bei strukturellen Gefäßveränderungen meist eingeschränkt. Bedeutsam für den pulmonal-arteriellen Druck ist das Gleichgewicht vasodilatativer Mediatoren und Vasokonstriktoren, das unter pathophysiologischen Bedingungen nicht mehr gegeben ist (**Abbildung 1**). Klinische Daten von Patienten mit chronisch-pulmonaler Hypertonie zeigen ein Ungleichgewicht zu Gunsten vasokonstriktorischer Mediatoren [4]. Moleküle, die eine entscheidende Rolle spielen, sind Thromboxan A2, Endothelin-1, Angiotensin-2 (Vasokonstriktoren), Prostacyclin

und Stickstoffmonoxid (Vasodilatoren). Ursachen für dieses Ungleichgewicht können z.B. eine Mutation im BMPR2-Gen oder auch eine hypoxische Vasokonstriktion sein. Aktuelle Therapiekonzepte versuchen dieses Ungleichgewicht zu reduzieren. Ziel ist es, die Vasokonstriktion zu vermindern, den Gefäßumbau zu reduzieren und Thrombosen vorzubeugen [5, 6]. Medikamente wie Sildenafil (Phosphodiesterase-5-Hemmer), NO oder Ilomedin® (Prostacyclin-Analogen) wirken diesem Prozess entgegen. NO und Ilomedin® haben einen ausgeprägten vasodilatierenden Effekt. Sildenafil und Ilomedin® vermindern die Muskularisierung der Media. Sildenafil konnte zusätzlich die Hypertrophie des rechten Ventrikels reduzieren [7].

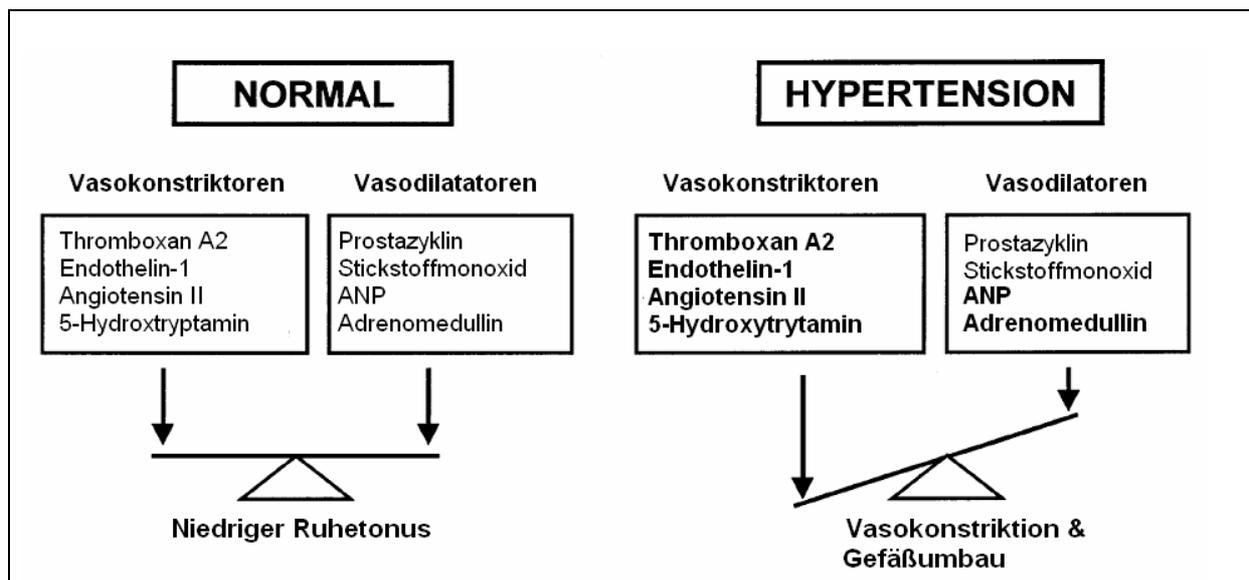


Abbildung 1: Gleichgewicht und Ungleichgewicht vasoaktiver Substanzen beeinflussen den pulmonalen Gefäßtonus und -umbau. (entnommen aus [8])

1.1.3 Morphologische Veränderungen

Alle Formen der pulmonal-arteriellen Hypertonie weisen ein morphologisches Korrelat auf. Der chronisch erhöhte pulmonal-arterielle Druck führt zu Umbauprozessen an den Lungengefäßen (Remodelling), der sogenannten pulmonal-hypertensiven Vaskulopathie. Diese zeigt sich bei den elastischen Lungenarterien später als bei den muskulären Lungenarterien [2]. In diesen Umbauprozessen verändern sich die Struktur und Funktion aller am Aufbau des Gefäßes beteiligten Zellen: Endothelzellen (EC), glatte Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten. Glatte Muskelzellen der Tunica media zeigen eine Hypertrophie und/oder Hyperplasie, was zu einer Verdickung der Tunica media führt. Während der Entwicklung einer chronischen PAH kommt es zu Intimaproliferation und einem Umbau in der Adventitia (über Proliferation der Fibroblasten und Anlagerung von Extrazellulärmatrix). Die Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes vollzieht sich

nicht nur über eine Verdickung der Media, sondern auch über eine partielle Muskularisation der Adventitia über eine Differenzierung der Fibroblasten [9, 10]. Bei hohen Drücken entstehen plexiforme Läsionen, die aus konvolutartigen Endothelzellproliferaten bestehen [11]. Bei der Bildung einer Neointima kommt es zur Differenzierung von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) der Media in einen proliferativen Phänotyp, gefolgt von einer Emigration und Proliferation in die Intima der Gefäßwand [12]. Des Weiteren kommt es zu einer Verdickung der Lamina elastica [13], und die EC neigen zur Bildung einer prokoagulatorischen Zelloberfläche [14]. Da die neointimalen Zellen gemeinsame ultrastrukturelle Merkmale mit Myofibroblasten bzw. differenzierten glattemuskulären Zellen aufweisen, ist ein Ursprung von den SMC der Media anzunehmen [13, 15, 16]. Die histomorphologischen Veränderungen werden mit der Klassifikation nach Heath und Edwards beschrieben (**Tabelle 2**). Ob die Grade 5 und 6 nach Heath und Edwards als Steigerung des Schweregrades der PH angesehen werden können, wird kontrovers diskutiert.

Tabelle 2: Klassifikation der pulmonal-hypertensiven Vaskulopathie nach Heath und Edwards

Grad	Histomorphologische Veränderungen
1	Muskularisierung von pulmonalen Arteriolen und Mediahypertrophie muskularisierter Arterien
2	Migration von SMC in die Intima → konzentrische Intimaproliferation
3	Transformation intimaler Myofibroblasten → konzentrisch laminaire Intimafibrose
4	Auftreten plexiformer Läsionen
(5)	Angiomatöse Läsionen und Rupturen dilatierter Gefäße → Hämorrhagien, exsudative Läsionen
(6)	Fibrinoide Degeneration und nekrotisierende Arteriitis

1.1.4 Die IPAH

Die Diagnose der idiopathischen pulmonal-arteriellen Hypertonie (IPAH) gilt als Ausschlußdiagnose, wenn keine andere Ätiologie für eine PH nachgewiesen werden kann. 1981 wurde in den USA am *National Institute of Health* ein Register zur prospektiven Erfassung von IPAH-Fällen eingerichtet. Aufgrund dieses Registers wird die Inzidenz der IPAH auf 1-2 Fälle pro eine Millionen Einwohner geschätzt. Der Krankheitsbeginn liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, Frauen sind doppelt so häufig betroffen wie Männer. Zu den initialen Symptomen gehört Luftnot und

Müdigkeit, gefolgt von verminderter Belastbarkeit und Synkopen. Zum Zeitpunkt der Diagnose kann meist ein mPAP von über 50mmHg gemessen werden. Unbehandelt führt die IPAH innerhalb von durchschnittlich 2,8 Jahren nach Erstmanifestation zum Tode [17].

Histomorphologisch ist die IPAH durch eine Obliteration der kleinen Pulmonalarterien in Verbindung mit plexiformen Läsionen, medialer Hypertrophie, Intimafibrose und thrombotischen Läsionen charakterisiert [18]. So zeigen histologische Schnitte aus IPAH-Lungen Gefäßveränderungen korrespondierend zu einem Grad 4 nach Heath und Edwards.

Molekularbiologie der IPAH:

1997 haben zwei unabhängig forschende Gruppen ein Gen identifiziert, welches in die Pathogenese der IPAH involviert ist. Es handelt sich um das „Bone Morphogenetic Protein Receptor 2“ (BMPR2)-Gen, welches zur „Transforming Growth Factor“ (TGF)- β -Rezeptor-Superfamilie gerechnet wird. TGF- β und seine Mediatoren spielen in Entwicklungs- und Wachstums-Kontroll-Prozessen eine wesentliche Rolle [19]. Mutationen im BMPR2-Gen treten in 55% der familiären PAH und in 25% der sporadischen PAH auf [20, 21]. Die „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMP) vermitteln ihre Signale über zwei Typen von Serin-/Threoninkinase-Rezeptoren, den Typ I- und den Typ II-Rezeptor. Nach BMP-Bindung phosphoryliert der Typ II- den Typ I-Rezeptor, welcher wiederum die intrazellulären Signaltransduzierenden Moleküle SMAD 1, 5 und 8 phosphoryliert [22]. Mutationen im BMPR2-Gen können zu einer veränderten und reduzierten Signaltransduktion führen, was wiederum zu gestörter Heterodimerisation oder zum Ausfall der Ligandenfunktion führen kann [20, 22]. Studien haben gezeigt, dass die BMP-Moleküle 2, 4 und 7 die Proliferation von VSMC unterdrücken und Apoptose in diesen Zellen induzieren. Aus diesem Grund könnte eine Veränderung in dem BMPR2-Rezeptormolekül zu einer Veränderung im Zellstoffwechsel und zu Proliferation von VSMC führen. Letztendlich wäre ein Gefäßumbau, im Sinne eines Remodelling, die Folge. In Patienten mit IPAH konnte eine verminderte Expression des BMPR2-Rezeptors im Endothel der Pulmonalarterien nachgewiesen werden [23]. Man nimmt an, dass eine alleinige Mutation des BMPR2-Rezeptors nicht den Ausbruch der Erkrankung herbeiführt und dass weitere Noxen zur Manifestation notwendig sind. Mutationen und Polymorphismen in anderen Genen wurden mit der Pathogenese der IPAH in Verbindung gesetzt. So sind Veränderungen in Genen beschrieben, die für den Serotoninrezeptor und -transporter, Kalium- und Calciumkanäle und das Angiotensin-1 codieren [24]. In **Abbildung 2** ist das Zusammenspiel einzelner Faktoren in der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie aufgezeigt.

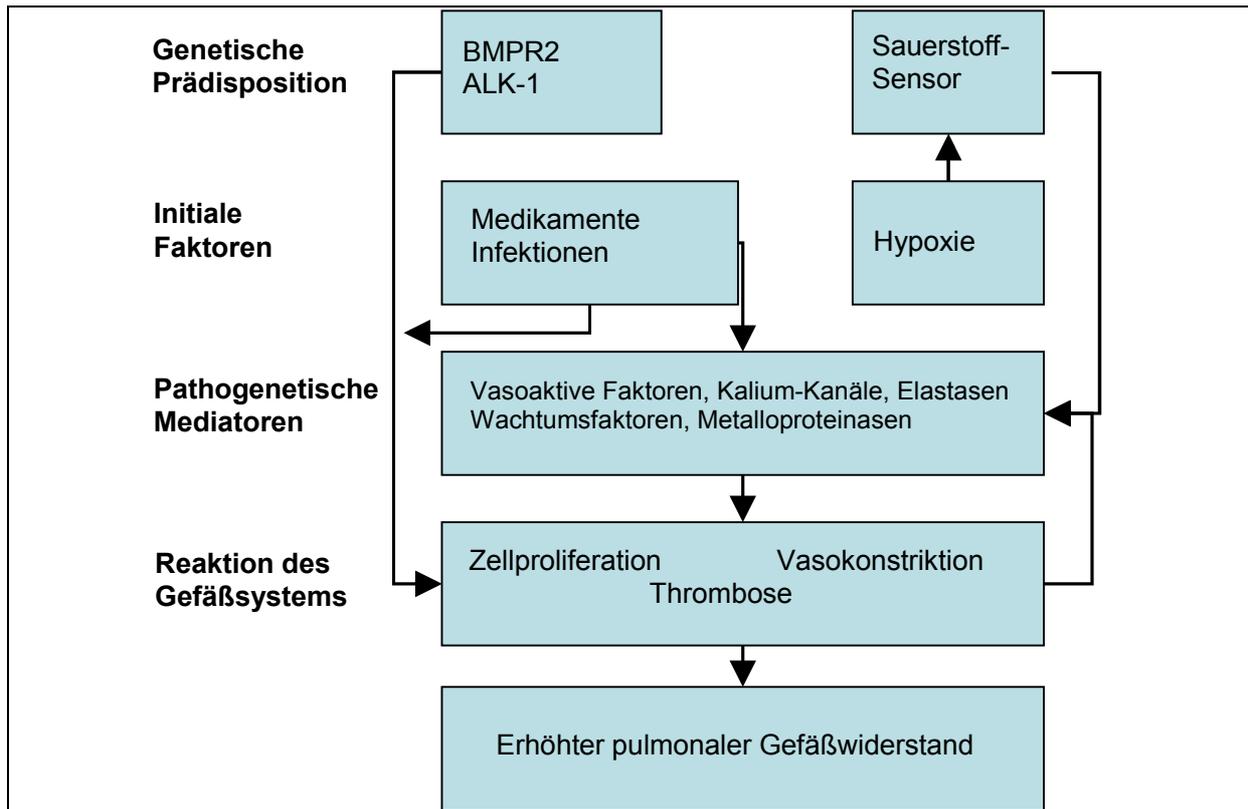


Abbildung 2: Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und pathogenetischen Faktoren in pulmonaler Hypertonie. (entnommen aus [8])

1.2 Hypoxie-induzierte pulmonale Hypertonie

1.2.1 Sauerstoff

Sauerstoff (O₂) ist ein lebenswichtiges Molekül für alle aeroben Lebensformen. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung ist notwendig für die Oxidation von Nährstoffen und die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Sauerstoff fungiert als Elektronenakzeptor im Mitochondrium am Ende der Atmungskette. Die metabolische Aktivität und der Energieverbrauch sind von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Aus diesem Grund wird das Sauerstoffangebot durch folgende Faktoren reguliert: pulmonale Ventilation, Hämoglobinaufsättigung und den systemischen Sauerstofftransport. Veränderungen in der Sauerstoffkonzentration (Hyperoxie, Hypoxie oder Anoxie) können zu verschiedensten Anpassungsreaktionen auf der Ebene des Gesamtorganismus, der Gewebeebene und der Zellebene führen [25, 26]. Eine verminderte Sauerstoffversorgung des Körpers ist verantwortlich für Anpassungsreaktionen von Zellen [27]. Diese Anpassung hilft dem Organismus, sich an das verminderte ATP-Angebot zu adaptieren und die normale Zellfunktion aufrechtzuerhalten [12]. Die Zellen weisen in der Hypoxie eine erhöhte Aktivität von Enzymen der anaeroben Glykolyse auf. Zusätzlich reagieren verschiedene Organe unterschiedlich im Falle einer Hypoxie. Sie exprimieren hypoxieabhängig Gene, die

zum Erhalt der jeweiligen Organfunktionen notwendig sind und zumeist durch hypoxieabhängige Transkriptionsfaktoren (HIF) induziert werden [26, 28].

1.2.2 Die Wirkung von Hypoxie auf den Gesamtorganismus und das Lungengewebe

Im menschlichen Organismus existieren verschiedene Kompensationsmechanismen, welche unter Hypoxie, einem verminderten Sauerstoffpartialdruck, aktiviert werden. Hierzu zählt z.B. die bei einem $P_a(O_2)$ -Abfall bzw. einem $P_a(CO_2)$ -Anstieg durch Chemorezeptoren (Glomus caroticum und Glomus aorticum) vermittelte Aktivierung des Atemzentrums in der Medulla oblongata mit daraus resultierender Mehrventilation [29]. Unter Hypoxie werden Mechanismen aktiviert, die die O_2 -Sättigung im Blut bewahren sollen: Eine Voraussetzung für die Erhaltung einer adäquaten Gewebeoxygenierung und -perfusion ist die Regulation des Gefäßwiderstandes, wofür die Balance zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren von großer Bedeutung ist. Im Gegensatz zum Körperkreislauf, wo Hypoxie zur Vasodilatation von Arteriolen führt, wirkt akute alveoläre Hypoxie als potenter Vasokonstriktor auf den pulmonal-arteriellen Gefäßbaum, was zu einem Druckanstieg in den Lungenarterien (speziell in den Widerstandsgefäßen) führt [13-15, 30-32]. Die Vasokonstriktion wird durch den 'von Euler-Liljestrand-Mechanismus' verursacht, der die regionale Lungenperfusion abhängig von der jeweiligen Atemgasfraktion in den angrenzenden Alveolarräumen anpasst. Eine Reduktion des alveolären O_2 -Partialdrucks in einem bestimmten Lungenabschnitt hat eine lokale Konstriktion der Arteriolen und damit eine verminderte regionale Durchblutung zur Folge. Durch diese Hypoxie-bedingte Widerstandserhöhung wird der Blutstrom in besser ventilerte Areale mit weitergestellten Gefäßen umgeleitet, was den Abfall des O_2 -Partialdrucks im Blut reduziert [33]. Dadurch ist eine optimale Oxygenierung des sauerstoffarmen Blutes während der Lungenpassage gewährleistet. Die Existenz von gering und nicht ventilerten Lungenarealen ist physiologisch.

Zwei unterschiedliche Hypothesen erklären die Entstehung der hypoxisch-pulmonalen Vasokonstriktion: Einerseits wird angenommen, dass Hypoxie die spannungsabhängigen Kalium-Kanäle in den Plasmamembranen der pulmonal-arteriellen Myozyten inhibiert, was zu einer Depolarisation mit nachfolgendem Ca^{2+} -Einstrom durch die spannungsabhängigen (L-Typ-) Calcium-Kanäle und resultierender Kontraktion der glatten Muskelzellen führt. Die Beobachtung, dass der Calcium-Antagonist Nifedipin der Entstehung einer HPV vorbeugt, untermauert diese Hypothese [30]. Andererseits gibt es Hinweise, dass Sauerstoffmangel in Endothelzellen (EC) die Synthese und Freisetzung des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 (ET-1) fördert, welcher die entsprechenden Rezeptoren der glatten Muskelzellen aktiviert [30].

1.2.3 Hypoxie-bedingter Gefäßumbau

Typische Merkmale aller Gefäße sind ein flaches Endothel, welches das Lumen begrenzt und mit dem subendothelialen Bindegewebe und den elastischen Fasern der Lamina elastica interna die Tunica intima bildet. Angrenzend findet sich eine unterschiedlich ausgeprägte Muskelschicht (Tunica media) und eine aus (Myo-) Fibroblasten bestehende Tunica adventitia. EC, SMC und Fibroblasten spielen Schlüsselrollen bei der Regulation der Gefäßfunktion. Zu deren Funktionen gehören die Erhaltung des physiologischen Gefäßtonus, die Kontrolle des Gerinnungssystems, Regulierung der Gefäßpermeabilität und das Wachstum der glatten Muskelzellen [34].

Eine Fehlregulierung der Mechanismen kann als auslösender Faktor der pulmonalen Hypertonie betrachtet werden. Ein entscheidender (beteiligter) Initiator des Gefäßumbaus im Rahmen einer sekundären PH ist die Hypoxie [35, 36]. Kurzzeitige Hypoxie führt bei EC zu einer physiologischen, reversiblen Modulation des Gefäßtonus und Blutflusses (Vasokonstriktor-dominierender Gefäßzustand), wohingegen chronische Hypoxie zur Produktion von Faktoren führt (siehe unten), die durch Proliferation von SMC und Fibrosierung einen irreversiblen Gefäßumbau induzieren [37]. Der Umbauprozess in den kleinen Gefäßen beginnt bereits nach 2d unter Hypoxie, eine Proliferation der SMC ist nach 4d zu beobachten. Die –verglichen mit der SMC-Proliferation– vorzeitig einsetzende Gefäßumstrukturierung könnte durch eine Differenzierung und/oder Migration von SMC-Vorläufern (Perizyten oder Fibroblasten) bedingt sein [38]. Zudem induziert die Hypoxie eine Dickenzunahme der Adventitia, bedingt durch eine Hyperplasie und Hypertrophie der Fibroblasten mit vermehrter Kollagenfaserdeposition. O₂-Mangel verursacht demnach Veränderungen in allen drei Gefäßschichten [13]. Während die großen Pulmonalarterien infolge Hypoxie eine geringe Wandverdickung aufweisen, nimmt mit abnehmendem Gefäßdurchmesser die Tendenz zur Mediahypertrophie zu. Ehemals nichtmuskuläre Gefäßäste können muskularisiert werden [15, 36, 39]. Der Gefäßumbau scheint proximal zu beginnen und sich nach distal fortzusetzen [36], mit den stärksten Veränderungen an den Widerstandsgefäßen [35, 40]. Aufgrund des bekannten Stimulus wird die hypoxisch-pulmonale Vasokonstriktion häufig als Modell für die PAH genutzt.

An dem Umbau der pulmonal-arteriellen Gefäße sind die in **Tabelle 3** aufgezeigten Faktoren beteiligt. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, Zytokine und vasoaktive Substanzen. Über Wachstumsfaktoren und vasoaktive Substanzen werden der Gefäßtonus und das Wachstum der SMC reguliert. So wird bei chronischer Hypoxie die Synthese von NO und Prostazyklin vermindert, was zu einer Vasokonstriktion und Proliferation von SMC führt. Umgekehrt führt Hypoxie zu einem Anstieg von Angiotensin II, Endothelin 1 (ET-1) und Thromboxan A₂. Diese Substanzen steigern

die Produktion von potenten Wachstumsfaktoren wie PDGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), insuline growth factor-I (IGF-I) und TGF- β , was zum Wachstum von SMC und Fibroblasten führt. Die SMC zeigen eine veränderte Morphologie mit Hypertrophie und Hyperplasie, Fibroblasten produzieren vermehrt ECM [41]. Direkt oder indirekt über Rezeptorbindung werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert und über Tyrosinkinase, Ca^{2+} , Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und Proteinkinase C (PKC) vermittelt. Andere Stimuli und Signalwege können diesen Effekt steigern, was zu einem verstärkten Gefäßumbau im Lungengewebe führen kann. Ein Merkmal des Remodellings ist die Ablagerung von Matrixproteinen, wie Pokollagen 1 α 1, Tropoelastin und Fibronectin. In diesen Prozess sind Zellen der Adventitia (Fibroblasten) involviert [31, 42, 43]. Weitere hypoxische Veränderungen der Fibroblasten sind übermäßige Zellproliferation und das Akkumulieren von α -SMC-Actin in manchen Fibroblastenpopulationen, was für eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten spricht. Die Veränderungen in der Adventitia tragen zur Einengung des Gefäßlumens bei und führen zu vermindertem Ansprechen auf vasodilatative Stimuli [44]. Eine aktuelle Übersicht über das Hypoxie-bedingte Remodelling in der Lunge bietet die Arbeit von Stenmark *et al.* [41].

Tabelle 3: Moleküle, die am Hypoxie-bedingten Gefäßumbau beteiligt sind (Moleküle in Klammern sind herunterreguliert). (entnommen aus [41])

Vasokonstriktoren/ Vasodilatoren	Adhäsionsmoleküle/ Zytokine/Prokoagulantien	Matrixmoleküle
PDGF-B	P-Selektin	Laminin
IGF	ICAM	Fibronectin
VEGF	VCAM	Thrombospondin-1
bFGF	VEGF-1	(Heparansulfat-Proteoglykan)
Serotonin	Gewebethromboplastin	
Endothelin	PAI-1	
LCT4/ D4	IL-1	
(Stickstoffmonoxid)	IL-8	
(PGI2)		

1.2.4 Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) als Beispiel einer sekundären Hypoxie-induzierten PH

Definition und Epidemiologie der COPD:

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) bezeichnet als Sammelbegriff eine Gruppe von Krankheiten der Lunge, die durch Husten, vermehrten Auswurf und Atemnot bei Belastung gekennzeichnet sind. In erster Linie sind die chronisch obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem zu nennen. Die COPD ist eine vermeidbare und behandelbare Erkrankung mit signifikanten extrapulmonalen Auswirkungen, welche mit der Schwere der Erkrankung korrelieren kann. Die pulmonale Komponente ist durch eine Obstruktion gekennzeichnet, welche nicht vollständig reversibel ist. Die Obstruktion ist in der Regel progressiv und geht mit einer Entzündungsantwort auf inhalative Noxen einher [45].

Die chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen (COPD) gehören weltweit zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Zigarettenrauch ist der größte Risikofaktor für COPD. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzte im Jahre 1996 die Anzahl der Raucher unter der Bevölkerung weltweit auf ca. 1,1 Mrd. Menschen. Trotz zunehmender Inzidenz der COPD liegen keine verlässlichen Zahlen für die Prävalenz der COPD vor. Die WHO schätzt ihre Prävalenz weltweit auf 0,8%. Halbert *et al.* untersuchten im Rahmen einer Metaanalyse 32 wissenschaftliche Artikel aus 17 verschiedenen Ländern. Dabei lag die Prävalenz der COPD zwischen 0,23 bis 18,3%, wobei insgesamt die Rate bei Männern höher lag als bei Frauen. Obwohl die Variabilität offenbar sehr hoch ist, steht jedoch fest, dass die COPD weltweit ein großes Gesundheitsproblem darstellt [46]. In Entwicklungsländern stellt die Behandlung von COPD-Exazerbationen eine der größten Probleme des Gesundheitssystems dar. In der europäischen Union nimmt die Behandlung der COPD 6% des gesamten Budgets, welches im Gesundheitssystem zur Verfügung steht, ein. Der Kostenanteil der COPD an allen pneumologischen Erkrankungen beträgt 56% [47].

Pathophysiologie der COPD:

Die COPD geht mit einer chronischen Entzündungsreaktion einher und zeigt pathologische Veränderungen der proximalen und peripheren Atemwege, des Lungenparenchyms und des pulmonalen Gefäßsystems [48]. Die Entzündungsreaktion auf irritative Substanzen, wie Zigarettenrauch, scheint um ein Vielfaches verstärkt in COPD-Patienten im Vergleich zur physiologischen Entzündungsreaktion. Eine genetische Komponente wird diskutiert. So entwickeln auch nichtrauchende Patienten eine COPD, wobei der Entzündungsmechanismus in diesen Patienten noch nicht hinreichend bekannt ist. Belegt ist, dass die entzündlichen Veränderungen der Lunge durch oxidativen Stress und

Proteinasenüberschuss verstärkt werden [49]. Basierend auf der Proteinase/Antiproteinase-Hypothese werden z.B. nach Inhalation von Zigarettenrauch Proteinase aus Entzündungszellen freigesetzt. Andererseits werden Antiproteinase durch Sauerstoffradikale inaktiviert und zerstört. Die übermäßige Freisetzung von Proteinase übersteigt die Menge an Antiproteinase, welche eine Schutzfunktion im Lungengewebe einnehmen. So kommt es u.a. zu einer Degradierung der ECM in den Alveolarwänden und einer Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen [50]. Die Folge daraus ist eine Zerstörung der Alveolarwände mit Ausbildung eines Emphysems. Der schwere hereditäre α_1 -Antitrypsinmangel stellt hierbei den am besten dokumentierten genetischen Risikofaktor dar [51]. Das α_1 -Antitrypsin ist ein wichtiger, im Blut zirkulierender Inhibitor für Serinproteasen. Der seltene α_1 -Antitrypsinmangel wird rezessiv vererbt und findet sich am häufigsten in Menschen nordeuropäischer Herkunft [52]. Weitere Proteinase, die an der Pathogenese der COPD beteiligt sind, gehören zur Gruppe der Serinproteasen, der Metalloproteinase und der Zystinproteasen [50].

Eine herabgesetzte FEV₁ resultiert in erster Linie aus einer Entzündungsreaktion und der Verengung der peripheren Atemwege im Rahmen der Umbauprozesse der chronischen Bronchitis. Eine sich ausdehnende Entzündung mit Fibrosierung und Exsudaten der kleinen Atemwege korreliert mit einer verminderten FEV₁ und FEV₁/FVC ratio [53].

Zerstörung des Lungengewebes und reduzierter Gasaustausch führen zu Hypoxämie und Hyperkapnie. Leichte bis mittelschwere Formen der pulmonalen Hypertonie können sich in der COPD entwickeln und sind auf die hypoxische Vasokonstriktion infolge des aktivierten Euler-Liljestrand-Mechanismus zurückzuführen [54]. Die beim Gesunden sinnvolle Vasokonstriktion im Bereich hypoxischer Alveolen führt bei Patienten mit COPD zu einer erheblichen Verringerung des Gesamtquerschnittes der pulmonalen Strombahn. Anstieg des pulmonal-arteriellen Widerstandes führt bei gleich bleibendem HZV zur konsekutiven Druckerhöhung im Lungenkreislauf und schließlich zu einer fixierten pulmonalen Hypertonie. Es kommt im folgenden zu einem Umbau der Lungengefäße mit Hypertrophie und Hyperplasie der Gefäßmuskulatur [55]. Auch der rechte Herzventrikel adaptiert an die Druckbelastung und hypertrophiert: es entwickelt sich ein Cor pulmonale [29]. Vor allem in Patienten mit schwerer Form der COPD wird ein solches Cor pulmonale beobachtet. Dieses hat einen entscheidenden Einfluss auf die Überlebenszeit und auf Anfälligkeit für weitere Erkrankungen [54]. Nach der globalen Initiative für COPD (GOLD) lassen sich unterschiedlich schwer ausgeprägte Stadien, die von Stadien 0 bis 4 reichen, unterscheiden [56].

Pulmonale Hypertonie und COPD:

Die weitaus häufigsten Auslöser einer PH sind Erkrankungen, die durch eine chronische alveoläre Hypoxie und Vasokonstriktion den präkapillären Widerstand der Pulmonalgefäße erhöhen. Wie weiter oben beschrieben kann es im Rahmen einer schweren COPD sekundär zu einer PH kommen. Als schwere Formen der COPD gelten die Stadien 3 und 4 nach der GOLD-Klassifikation mit FEV₁-Werten unter 50%. Es wird angenommen, dass über 20% der Patienten mit schwerer fortgeschrittener COPD an einer PH leiden [57, 58]. Der größte Teil der COPD-assoziierten PH ist milde bis moderat, mit einem mPAP von 20-35mmHg. Wenn COPD-Patienten eine PH entwickeln, sind sowohl die Morbidität als auch die Mortalität bei den Patienten signifikant erhöht. So kommt es zu einer signifikanten Erhöhung von COPD-Exazerbationen nach Entwicklung einer PH [59]. Schwere Formen der PH mit einem mPAP über 40mmHG treten lediglich in <5% der Fälle auf. Die mittlere Überlebenszeit bei COPD-Patienten mit schwerer PH liegt bei circa 40 Monaten [60].

Histomorphologisch finden sich Veränderungen der Lungengefäße mit Muskularisierung von Arteriolen und intimaler Verdickung im Sinne einer pulmonalhypertensiven Vaskulopathie Grad 1 und 2 nach Heath und Edwards [59]. Stenosierende Intimaproliferation und plexiforme Läsionen werden nur selten gesehen. Die sich im Laufe der COPD-assoziierten PH entwickelnde Hypoxie ist Ansatzpunkt von therapeutischen Konzepten. So ist die langfristige Gabe von Sauerstoff eine effektive Therapie, um die Progression der COPD-assoziierten PH zu verlangsamen [61]. Andere Ansatzpunkte stellen die Gabe von Vasodilatoren dar, um der Vasokonstriktion und dem Gefäßumbauprozess entgegenzuwirken (siehe 1.1.2).

1.3 Hypoxie-assoziierte Gen- und Proteinveränderungen

1.3.1 Überblick

Die Regulation auf Transkriptionsebene während der Hypoxie ist entscheidend für das Remodelling und umfasst zahlreiche Signal- und Zielgene. Es wurde gezeigt, dass einige Faktoren direkt über eine Induktion der Hypoxia-inducible factors 1-3 (HIF-1-3) reguliert werden, welche unter hypoxischen Bedingungen in einer Vielzahl von Zellen gebildet werden [12, 28]. HIF-1 wurde ursprünglich durch Bindung an das sogenannte 'hypoxia response element (HRE)' am 3'-Ende des humanen Erythropoietingens identifiziert. Die Bindung ist notwendig für eine Aktivierung der HIF-1 induzierten Transkription als Reaktion auf Hypoxämie [62]. HIF besteht aus der unter Hypoxie stabilisierten Untereinheit HIF-1 α und der konstant exprimierten HIF-

1 β Untereinheit. Über HIF wird die Expression von Genen, welche in der Erythropoese, Angiogenese, Glykolyse und der Modulation des Gefäßwiderstandes eine Rolle spielen, aktiviert [63]. Einige der Genprodukte, die über HIF induziert werden, sind im folgenden genannt (entnommen aus Semenza *et al.* [28]): PDGF, VEGF, acidic/basic fibroblast growth factor (a/bFGF), TGF- β , insuline growth factor 2 (IGF-2), Erythropoietin (Epo), Transferrinrezeptor, Glykolyse-Enzyme, Cyklooxygenase 2 (COX2), Endothelin 1 (ET-1), Angiotensin-konvertierendes Enzym (ACE), Angiotensin II (AngII), Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) und Hämoxygenase 1 (HO-1).

Andere Gene werden unter hypoxischen Bedingungen über reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) gesteuert [64]. Ein verminderter regionaler Blutfluss kombiniert mit chronisch-hypoxischer Vasokonstriktion kann zu Ischämie führen, was mit oder ohne entzündliche Veränderungen zur Produktion von ROS im Lungengewebe führt. Die Sauerstoff-Spezies des hypoxämischen Lungengewebes stammen unter anderem von der Endothelium-derived Xanthinoxidase, Cyklooxygenasen, Lipoxygenasen, Endothelial-NO-synthase (eNOS), VSMC-derived NADH-oxidase und aktivierten Makrophagen [65]. Bei einer Ansammlung von ROS kann das NO im Lungengewebe vermindert werden, was zu Vasokonstriktion, Zellproliferation und Zelltod führt [66]. In EC, VSMC und Fibroblasten werden Sauerstoff-Spezies innerhalb von Minuten bis Stunden produziert, während in neutrophilen Granulozyten eine gleichmäßige Abgabe beobachtet wird [67].

Bisher wurden bereits mehrere Gene und Proteine, die an Hypoxie-induzierten Regulationen und Gefäßumbauvorgängen in der humanen Lunge beteiligt sind, genauer charakterisiert (z.B. VEGF). Laborinterne Untersuchungen ließen jedoch vermuten, dass weitere relevante Gene und Proteine im Lungengefäßumbau Hypoxie-bedingt reguliert werden. Im einem Mausmodell zur Hypoxie-induzierten pulmonal-arteriellen Hypertonie konnten mittels Microarray- und 2D-Page-Analysen Kandidatengene und -proteine in intrapulmonalen Arterien identifiziert werden [68, 69]. In der vorliegenden Arbeit wurden 6 dieser Gene und Proteine näher untersucht und ermittelt, ob diese auch in humanen Lungen bei pulmonaler Hypertonie differentiell exprimiert werden.

1.3.2 FHL-1

Four and a Half LIM Domain Proteine (FHL) sind eine Gruppe von LIM-Proteinen, die im Skelettmuskel, aber auch in anderen Geweben identifiziert wurden. Charakteristisch sind 4 aufeinanderfolgende LIM-Domänen und eine Einzel-Zinkfinger Domäne, lokalisiert an der N-terminalen Region. Bis jetzt wurden vier Isoformen beschrieben (FHL 1-4). Das in dieser Arbeit untersuchte FHL-1 besitzt eine Molekülmasse von 30kDa [70].

LIM-Proteine, wie LIN-11, ISL-1 und MEC-3 tragen ein Motiv, das aus zwei Zink-Fingern besteht, die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können und an der Transkriptionskontrolle beteiligt sind. Sie können interagierend wirken in der Zellentwicklung, zellulärer Differenzierung und Zytoskelettänderungen. Neben den klassischen Transkriptionsfaktoren werden zunehmend Zink-Finger-Proteine isoliert, die sowohl Signaltransduktions- als auch Transkriptionsfaktor-Funktionen übernehmen. Trotzdem gibt es keinen Beweis, dass LIM-Domänen direkt an DNA binden [71]. Ein Beispiel für solche Proteine ist das im Skelettmuskel und in der Herzmuskulatur hoch exprimierte LIM-Protein FHL-1 (auch „SLIMMER“ genannt). Eine starke Expression des Gens findet sich außerdem in den Genitalorganen und in der Lunge, eine geringe Expression ist im Thymus, den Lymphknoten und der Leber zu beobachten [72].

Brown *et al.* konnten demonstrieren, dass Skelettmuskel-LIM-Proteine-1 (SLIM-1, auch FHL-1 genannt) in den Kernen von Myoblasten und im Zytoplasma von Myotubuli lokalisiert sind. Sie nahmen an, dass FHL-1 sich möglicherweise zwischen Kern und Zytoplasma hin und her bewegt. Weiterhin vermuteten sie, dass FHL-1 aufgrund von LIM-Domänen als Verbindungsprotein in einem größeren Funktionskomplex innerhalb der „focal adhesions“-Bereiche auftritt [71]. Extrazelluläre Reize, wie ECM, Zytokine, Antikörper und Wachstumsfaktoren, können auf Zellen einwirken. Sie reagieren an der Zellmembran spezifisch mit Rezeptoren und aktivieren Signalkaskaden. In Abhängigkeit von externen Stimuli bilden Zellen konzentrierte Ansammlungen von Signalmolekülen, die sog. „focal adhesions“, über die an der Membran oder im Zytosol eine oder mehrere Signalkaskaden in Gang gesetzt werden [73].

FHL-1 induziert über eine Signalkaskade die alpha5-beta1-Integrin-abhängige Muskeldehnung. Eine Überexpression von FHL-1 begünstigt die Myoblastenausbreitung und die Zellmigration. Robinson *et al.* konnten zeigen, dass FHL-1 Integrin-vermittelte zelluläre Funktionen reguliert. Bei einer Inhibition von Integrinsignalen zeigte FHL-1 eine diffuse Lokalisation im Zytosol und eine verminderte Expression im Nucleus. Robinson *et al.* nahmen außerdem an, dass eine Überexpression von FHL-1 die normale Myoblastenadhäsion stören kann [74]. Boettiger *et al.* zeigten, dass eine Überexpression von aktiviertem alpha5-beta1-Integrin die Myoblastenadhäsion erhöht, aber die Zellmigration inhibiert [75].

1.3.3 S100 A4

S100 A4, auch Mts-1 genannt, ist ein 11kDa großes dimeres Molekül und wird zu der Ca²⁺-bindenden S100 Proteinfamilie gezählt. Eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung von Krebszellen wird diskutiert [76]. In diversen Metaplasien und Kanzerosen konnte eine Hochregulation von S100 A4 nachgewiesen werden.

Beispiele hierfür sind Karzinome der Mamma, Ovarien, Schilddrüse, Lunge, Ösophagus, Magen, Kolon und Prostata. Das Protein wird von Krebszellen und Fibroblasten sezerniert [77].

Die Wirkmechanismen von S100 A4 sind nicht vollständig entschlüsselt, man nimmt aber eine intra-, wie auch extrazelluläre Wirkweise an. Intrazellulär wirkt S100 A4 auf Proteine des Zytoskeletts, welche in die Zellmotilität involviert sind, wie z.B. das nichtmuskuläre Myosin II [78]. Weiterhin beeinflusst und reguliert S100 A4 verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle, wie das Tumorsupressorprotein p53 [79]. Wie andere Moleküle aus der S100 Familie besitzt S100 A4 keine Enzymaktivitäten, reguliert aber die Aktivität des Bindungspartners über Veränderungen seiner Struktur [80]. In sezernierter Form stimuliert S100 A4 die neuronale Differenzierung, Angiogenese, EC-Motilität, Metalloproteinaseaktivität, SMC-Migration und Proliferation und *in-vitro* die Kardiomyogenese. Es wird angenommen, dass diese Effekte über eine Bindung an Zellmembranrezeptoren hervorgerufen werden. Die angiogenen Effekte von S100 A4 konnten über eine Bindung an Annexin II gezeigt werden, welches sich auf der Oberfläche von EC befindet [81-83].

1.3.4 BDNF

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gehört zur Gruppe der Neurotrophine (NT), einer Polypeptidfamilie von Wachstumsfaktoren [84]. Andere Vertreter dieser Familie sind der Nervenwachstumsfaktor (NGF), Neurotrophin 3 (NT-3) und Neurotrophin 4/5 (NT-4/5). Neurotrophine sind am besten charakterisiert als Mediatoren in neuronalen Zellen des ZNS und PNS, zuständig für Entwicklung, Überleben, Differenzierung und Plastizität der Synapsen [85]. Darüberhinaus haben Studien gezeigt, dass Neurotrophine auch in nicht neuronalen Zellen, wie EC, SMC, Zellen des Immunsystems und Epithelzellen verschiedener Organe, eine Rolle spielen [86-88].

BDNF wird, wie alle NT, über eine Vorstufe synthetisiert. Das inaktive pro-BDNF wird proteolytisch gespalten und ergibt das C-terminale reife Protein. Dabei besitzt pro-BDNF eine Molekülmasse von 30kDa, BDNF eine Molekülmasse von 13,5kDa [89]. BDNF vermittelt seine Wirkung über Bindung an zwei Rezeptorklassen. Zum einen die Tyrosinrezeptorkinase (Trk), welche spezifisch für die einzelnen Neurotrophine ist und dem unspezifischen $p75^{NTR}$, an welches alle NT und pro-NT binden können [90, 91]. BDNF bindet mit hoher Affinität an den TrkB-Rezeptor. Beide Moleküle werden in verschiedenen nicht neuronalen Geweben exprimiert (Skelettmuskel, Herz, Lunge, Gefäßsystem), in vergleichbarer Menge wie im ZNS [92, 93]. In pathologischen Prozessen, wie Gefäßverletzungen und allergischem Asthma bronchiale, konnte eine veränderte Expression von BDNF und TrkB nachgewiesen werden [94, 95]. Im Falle von Asthma bronchiale konnte BDNF als Bindeglied zwischen den entzündeten

Atemwegen und dem hypereagiblen Bronchialsystem identifiziert werden. Dabei spielt BDNF eine Rolle in der neuronalen Kontrolle der SMC-Kontraktilität.

1.3.5 TrkB

TrkB gehört zur Familie der Tyrosinrezeptorkinasen (Trk) und fungiert als Membranrezeptor für die Neurotrophine BDNF, NT-3 und NT-4/5 [96]. Die Bindung von Neurotrophinen an Trk-Rezeptoren induziert diverse Prozesse des sich entwickelnden und adulten Nervensystems, wie Zellproliferation, -überleben, Determination neuronaler Progenitorzellen, Axon- und Dendritenwachstum [97]. Das BDNF/TrkB-System wurde als Hauptregulator der exzitatorisch synaptischen Übertragung und Synapsenplastizität bei Speicherung von Gedächtnisinhalten identifiziert [98]. Neben der Entwicklung und Integrität des Nervensystems spielt das BDNF/TrkB-System eine wichtige Rolle im Koronarsystem des Herzen [99]. Weiterhin zeigt sich eine Assoziation mit allergischem Asthma bronchiale und dem Tumorzellwachstum in einigen malignen Tumoren (z.B. Neuroblastom) [95, 100].

Die Aktivierung von TrkB durch seine Liganden bewirkt eine Autophosphorylierung einiger Tyrosinseitenketten und Aktivierung von Signalkaskaden über die Moleküle Shc-Ras-mitogen-aktivierte Proteinkinase, Phosphatidylinositol3-kinase/Akt, Phospholipase C_v-Ca²⁺ und Proteinkinase C [101].

Zusätzlich zu dem Volllängen-TrkB-Rezeptor (gp145^{TrkB}) mit einem Molekulargewicht von ~145kDa existiert eine Isoform mit trunkierter intrazellulärer Tyrosinkinase-Domäne (gp95^{TrkB}) mit einem Molekulargewicht von ~95kDa [102]. Es wird vermutet, dass eine verstärkte Expression des Volllängen-TrkB-Rezeptors in hypoxisch/ischämischen Rattengehirnen eine existenzielle Rolle für den frühen Schutzmechanismus der betroffenenen Neurone spielt [103]. Vermutlicherweise wirkt die trunkierte Form als negativer Inhibitor für die Volllängenform und/oder als 'Scavenger-Rezeptor' für BDNF und NT-4/5 [104, 105]. Zusätzlich wurde eine Signaltransduktion über die trunkierte Form beschrieben. Die Bindung von BDNF an die trunkierte Form von TrkB induziert über einen G-Protein- und Proteinkinase C-vermittelten Signalweg eine Differenzierung von neuronalen Stammzellen in gliale Vorläuferzellen und Astrozyten [106].

1.3.6 TSP-1

Thrombospondin-1 ist ein multifunktionales Makromolekül, welches in der Organogenese und bei Umbauvorgängen im adulten Gewebe exprimiert wird [107]. Immunhistochemische Färbungen bestätigen die Lokalisation von TSP-1 in diversen humanen Geweben, wie Lunge, Gefäßwand, Bindegewebe und Skelettmuskel [108]. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass TSP-1 während der Entwicklung von Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Nieren, Knochen und Skelettmuskel verstärkt exprimiert wird

[109]. Es ist außerdem in Entzündungsreaktionen, Wundheilung, Angiogenese und Tumorenstehung involviert [107]. Die spezifischen Effekte von TSP-1 auf Zellebene sind abhängig von dem Zelltyp und der zelltypspezifischen Expression von Zellmembranrezeptoren. So induziert TSP-1 in VSMC eine Proliferation, während es in EC die Proliferation inhibiert [110, 111]. TSP-1 wird unter anderem von EC, VASMC, Fibroblasten und Typ II Pneumozyten synthetisiert und sezerniert.

TSP-1 ist ein 450kDa großes homotrimeres Glykopeptid, welches in löslicher und gebundener Form vorkommt [112]. Auf Zellebene vermittelt TSP-1 direkt die Zelladhäsion und -migration und besitzt zusätzlich regulierenden Einfluss auf Zelladhäsion und -migration über Veränderungen in der ECM. Dies geschieht durch Bindung von TSP-1 an eine Vielzahl von Zellmembranrezeptoren, wie z.B. CD 36, CD 47, Integrine ($\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ und $\alpha 3\beta 1$) und Heparansulfat-Proteoglykane [107]. Über die Rezeptorbindung kann weiterhin eine Entzündungsantwort vermittelt werden.

Über eine Bindung an extrazelluläre Proteine wie Heparin, Plasminogen, Fibrinogen oder Fibronectin kann TSP-1 die Fibrinolyse regulieren. Außerdem besitzt TSP-1 die Fähigkeit, an TGF- β zu binden und dieses zu aktivieren. Diese Interaktionen führen wiederum zu Zellmigration, Differenzierung und Proliferation [113, 114]. In vielen Zelltypen bewirkt die Bindung von TSP-1 eine Zellausdehnung mit einer ausgeprägten Umstrukturierung des Actin-Zytoskeletts. Beteiligte Proteine sind das F-Actin und das Actin-bündelnde Protein Fascin [115].

Die Expression von TSP-1 wird durch Hitzeschockproteine, Hypoxie und durch die Wachstumsfaktoren PDGF, TGF- β und bFGF reguliert. Untersuchungen in Endothelzellen zeigten eine Interaktion von TSP-1 mit dem Zellrezeptor CD36 sowie eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung anti-angiogener und pro-apoptotischer Aktivität [116].

1.3.7 CD36

Das Zellmembranoberflächenmolekül CD36 (Thrombospondin-Rezeptor, Glykoprotein IV) ist ein 88kDa großes Glykoprotein und wird auf Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen gefunden [117]. Asch *et al.* vermuteten, dass CD36 die Funktion als zellulärer TSP-1 Rezeptor besitzt.

Monozyten und Makrophagen spielen eine Hauptrolle in der Aufrechterhaltung und Auslösung einer Immunantwort des menschlichen Körpers und zählen damit auch zu den wichtigsten Effektorzellen dieses Systems. Während einer Entzündungsreaktion kommt es zur Aktivierung, Differenzierung, Migration, Phagozytose und Antigenpräsentation sowie zum programmierten Zelltod der Makrophagen [118]. Monozyten und Makrophagen besitzen an ihrer Oberfläche Rezeptoren für

Immunglobuline, Komplementfaktoren, Wachstumsfaktoren, Zytokine und für andere Mediatoren, wie z. B. TSP-1.

CD36 dient als Adhäsionsstelle für TSP-1 und Kollagen I und IV. Auf Endothelzellen ist CD36 speziell für die Bindung von TSP-1 zuständig, wodurch es zur Hemmung der Proliferation, der Einleitung der Apoptose und zur Hemmung der Angiogenese kommt. Proteine, die an CD36 binden, wie Kollagen und intakte CD36-spezifische Antikörper, induzieren einen 'oxidative burst' (reaktive Sauerstoffspezies) in Monozyten und Thrombozyten. Diese reaktiven Sauerstoffspezies sind wichtig für die intrazelluläre Verdauung von phagozytiertem Fremdmaterial wie beispielsweise Krankheitserregern [119].

1.4 Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, ausgewählte Gene und Proteine näher zu charakterisieren, die an dem vaskulären Umbau und möglicherweise an der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie in primärer (IPAH) und sekundärer Form (COPD) beteiligt sind. Erkrankungsspezifische Unterschiede auf Gen- und Proteinebene sollten aufgezeigt werden. Die 6 ausgewählten Gene und Proteine (FHL-1, S100 A4, BDNF, TrkB, TSP-1 und CD36) waren in vorausgegangenen Microarray- und 2D-PAGE-Analysen der untersuchenden Arbeitsgruppe am Mausmodell der hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie als reguliert aufgefallen. Ihre Präsenz in humanen Pulmonalarterien war in weiteren Experimenten immunhistochemisch bestätigt worden. Es stellte sich die Frage, ob die in dem Tiermodell gefundenen Ergebnisse sich auf Probematerial aus humanen Lungen übertragen lassen. Zunächst wurde die RNA- und Proteinexpression an humanem Lungenhomogenat untersucht. Anschließend folgte eine Isolation und Kultivierung von pulmonal-arteriellen SMC und adventitiellen Fibroblasten. In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss einer Hypoxiestimulation (24h; $FiO_2=0,01$) auf die RNA- und Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten untersucht.

Folgende Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche der Gene und Proteine weisen im Lungenhomogenat von IPAH- und COPD-Lungen eine differentielle Expression im Vergleich zu Spenderlungen auf? Wie unterscheidet sich die Expression in einer idiopathischen Lungengefäßerkrankung (IPAH) und einer chronisch hypoxischen Lungenerkrankung (COPD) verglichen mit der Expression in Spenderlungen?
2. Bestehen Expressionsunterschiede zwischen Lungenhomogenat und isolierten primären PASMC und Fibroblasten unter normoxischen Bedingungen?
3. Welchen Einfluss hat eine 24h Hypoxiestimulation auf die Gen- und Proteinexpression von kultivierten PASMC und Fibroblasten? Bestehen erkrankungsspezifische Unterschiede? Reagieren isolierte Primärzellen aus IPAH- oder COPD-Lungen anders auf die Hypoxiestimulation als Zellen aus Spenderlungen? Reagieren PASMC anders auf die Hypoxiestimulation als Fibroblasten?
4. Wo sind die Proteine in den PASMC und Fibroblasten lokalisiert? Bestehen Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen den untersuchten Proteinen? Bestehen erkrankungsspezifische Unterschiede? Verändert die Hypoxiestimulation das Verteilungsmuster in der Zellart?

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente und Geräte

ABI PRISM [®] Sequence Detection System 7700	PE Applied Biosystems (Foster City, CA, U.S.A.)
Biofuge A	Heraeus (Hanau)
Centrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
CO ₂ -Inkubator IR 1500	Flow Laboratories (Meckenheim)
Falcon PP-Tube sterile 15-50ml	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Gelkämme (15 und 10 Zähne)	Biorad (München)
Kodak X-Omatic Röntgenkassette	Kodak (New Haven, U.S.A.)
Kryostat Jung CM 3000	Leica (Benzheim)
Lab Tek [®] Chamberslides	Nunc (Wiesbaden)
LEICA Immunfluoreszenz Mikroskop (DMLA, Kamera: DC 300 FX)	Leica (Wetzlar)
Mini Trans-Blot Cell	Biorad (München)
Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis System	Biorad (München)
Nadeln 0,9 x 40mm	Becton Dickinson (Heidelberg)
Nanodrop [®] ND-1000	NanoDrop Technologie (Rockland, U.S.A.)
Olympus-Mikroskop (Inverted Research Microscope (IMT-2))	Olympus Optical Co. GmbH (Hamburg)
PCR-Platten	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Petrischalen, 60 x 15 mm, Polysterol	Falcon (Le Pont de Claix, Frankreich)
pH-Meter	Mettler (Essex, England)
Pipetten 1-1000µl	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen 10-1000µl	Greiner Bio-one (Frickenhausen)
Pipettus, elektrische Pipettierhilfe	Laboserv GmbH (Gießen)
PowerPac Basic Power Supply	Biorad (München)
PVDF Transfer Membrane Immobilon P	Milipore (Bedford, U.S.A.)
Safe Lock Tubes 100-2000µl	Eppendorf (Hamburg)
Spritzen 5ml	Braun (Melsungen, Deutschland)
Sterilbank Typ BSB, 4a	Flow Laboratories (Meckenheim)
Wasserbad	Memmert GmbH (Schwalbach)

2.1.2 Chemikalien, Inkubationsmedien, Sera und Enzyme

Acrylamid 30%	Roth (Karlsruhe)
APS 25% (Ammoniumpersulfat)	Roth (Karlsruhe)
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Complete, Protease Inhibitor	Roche (Mannheim)
Deoxycholat 1%	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma (Taufkirchen)
FCS (fetales Kälberserum), hitzeinaktiviert für 30 Minuten bei 56°C, steril filtriert	Gibco (Karlsruhe)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Laemli [®] Probenpuffer	Sigma Aldrich (St. Louis, U.S.A.)
Low serum	
L-Glutamin 1%	Invitrogen (Karlsruhe)
MCDB 131 Medium	Gibco (Karlsruhe)
Methanol	Sigma Aldrich, Fluka (Buchs, Schweiz)
Natriumvanadat Na ₃ VO ₄ , pH 10	Treibacher Industrie AG (Althofen, Österreich)
NuPAGE [®] LDS Probenpuffer (4x)	Invitrogen (Oregon, U.S.A.)
PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung)	Seromed (Berlin)
Penicillin/Streptomycin 1%	Genaxxon Bioscience (Ulm)
Promocell SMC Growth medium 2,	Bioscience Alive (Heidelberg)
Rotiphorese-Gel 30	Roth (Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	Sigma (Deisenhofen)
Skim Milk Powder	Sigma Aldrich, Fluka (Buchs, Schweiz)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)
Temed (Tetramethyläthylendiamin)	Roth (Karlsruhe)
Tissue Tek [®]	Sakra (Zoeterwoude, Niederlande)
Trifast [®]	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
Tris Base und HCL	Merck (Darmstadt)
Triton X-100 1%	Roche (Mannheim)
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco (Karlsruhe)
Tween20	Appli Chem (Darmstadt)

Folgende Lösungen wurden steril und frisch angesetzt (Chemikalien und Seren s.o.):

Blotting Puffer: Methanol 200ml, Tris Base 20mM, Glycin 150mM, auf 1L mit Aqua dest. auffüllen

Minimalmedium: FCS 0,1%, Penicillin/Streptomycin 1%, L-Glutamin 1%, mit MCDB 131 auf 100% auffüllen

Elektrophorese Puffer Qualitative PCR (5xTBE-Puffer):

54g Tris Base, 27,5g Borsäure, 20ml 0.5M EDTA (pH 8.0), 1000ml destilliertes Wasser

Elektrophorese Puffer Western Blot:

Tris Base 5,02g, Glycin 18,8g, SDS 10% 10 ml, auf 1L mit Aqua dest. auffüllen

RIPA Lyse-Puffer: NaCl 150mM, Tris 10mM/pH 7,2, SDS 0,1%, Triton X-100 1%, Deoxycholat 1%, EDTA 5mM ; bei Verwendung Complete 1:25 und Natriumvanadat 1:100 frisch hinzugeben

Blockinglösung: 5g Skim Milk Powder auf 100ml PBS + 0,1% Tween20

Stripping Puffer pro Membran:

Glycin 1M 5ml, H₂O 10ml, HCL 25% 750µl

Trenngel 10% für Western Blot:

H₂O 6,1ml, Tris 1,5 M/pH 8,8, Acrylamid 30% 5ml, SDS 10% 150µl, Temed 20µl, APS 25% 20µl

2.1.3 Kommerzielle Assays und Detektionsagenzien

BCA™ Protein Assay Kit	Pierce Technology (Rockford, U.S.A.)
Chemiluminescence Film	Chalfont, Buckinghamshire, UK)
DakoCytomation Flourescent Mounting Medium	Dako (Hamburg)
ECL Plus™Western Blotting Detection Reagents	Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Hyperfilm™ECL High Performance	Amersham Biosciences (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
Precision Plus Potein™Standards Dual Color	Bio Rad (Hercules, CA, U.S.A.)

2.1.4 Antikörper

Für die Immunfluoreszenz und das Western Blotting wurden folgende primäre und sekundäre Antikörper verwendet (**Tabelle 4 und 5**).

Tabelle 4: Primäre Antikörper verwendet für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper (Anti-human)	Verdünnung (WB)	Molekül- größe in kDa	Verdünnung (IF)	Hersteller
Beta-actin ¹	1:5000	45	Keine IF	Biozol (Eching, Deutschland)
FHL-1 ¹	1:750	30	1:25-1:50	Abcam (Cambridge,UK)
S100 A4 ²	1:200-1:500	10		Abnova (Taipeh,Taiwan)
S100 A4 ¹	1:250-1:1000	10	1:50	LabVision (Westinghouse, U.S.A.)
BDNF ²	1:100-1:1000	30		Abcam (Cambridge,UK)
BDNF ¹	1:100-1:1000	30	1:25	SantaCruz (Santa Cruz, U.S.A.)
TrkB ¹	1:750	140/90		SantaCruz (Santa Cruz, U.S.A.)
TrkB ¹		140/90	1:100	BD Bioscience (Franklin Lakes, U.S.A)
TSP-1 ¹	1:1000-1:2000	175	1:200	US Biological (Massachusetts, U.S.A.)
CD36 ¹	1:200-1:500	88	1:50	SantaCruz (Santa Cruz, U.S.A.)

¹ Kaninchen, polyklonal

² Maus, monoklonal

Bemerkung zum verwendeten TrkB-Antikörper:

Der in dieser Arbeit verwendete Antikörper für die Western Blot Analyse stammt von der Firma Santa Cruz (794-sc12). Laut Datenblatt wird die zytoplasmatische Domäne des C-Terminus von TrkB der Maus detektiert. Damit soll der Antikörper ausschließlich die Vollängenform (145kDa) in Proteinlysaten von Maus, Ratte und Mensch erkennen. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass keine

Kreuzreaktivität mit der trunkierten Form (95kDa) besteht. Interessanterweise wird auf dem Datenblatt ein Western Blot mit einer einzigen Bande gezeigt, welche zwischen 48 und 96kDa liegt. Dieses soll der Volllängenform entsprechen. Bereits Ricci *et al.* setzten den Antikörper ein, um sowohl die Volllängen- als auch die trunkierte Form nachzuweisen. Sie fanden beide Formen in bronchialer glatter Muskulatur und glatten Muskelzellen pulmonaler Arterien [120]. Insofern ist davon auszugehen, dass der Antikörper tatsächlich beide vorkommenden TrkB-Formen erkennt. In Analogie zu dem Datenblatt konnte in dieser Arbeit ein TrkB mit einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa nachgewiesen werden.

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper verwendet für Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

Antikörper	Verdünnung (WB)	Verdünnung (IF)	Hersteller
Immunopure [®] Maus anti-Kaninchen	1:2000-1:3000		
Immunopure [®] Maus anti-Maus	1:2000-1:3000	Kein Einsatz in IF	Pierce Technology (Rockford, U.S.A.)
Immunopure [®] Maus anti-Ziege	1:2000-1:3000		
FITC [®] Ziege anti-Maus-IgG	Kein Einsatz in WB	1:200	Sigma (Deisenhofen)
Alexa Fluor [®] 555 Ziege anti-Hase IgG	Kein Einsatz in WB	1:2000	Invitrogen (Oregon, U.S.A.)

2.1.5 PCR-Reagenzien

DNA/Hinf I Marker Φ X174

Promega (Madison, U.S.A.)

GeneAmp RNA PCR Kit:

Applied Biosystems Roche (Foster City, CA, U.S.A.)

(MuLV Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor,

Random Hexamers, Oligo d(T)₁₆, 10x PCR Buffer II,

25 mM MgCl₂ Solution, dNTP)

QIA-Shredder

Qiagen (Hilden)

Platinum[®] SYBR Green[®] qPCR SuperMix-UDG:

Invitrogen (Oregon, U.S.A.)

(SYBR Green I, 50 mM MgCl₂, ROX Reference Dye)

Primer → Primersequenzen siehe 2.3.6

MWG-Biotech AG (Ebersberg)

RNeasy Mini Kit:

Qiagen (Hilden)

(RNeasy mini spin columns (Extraktionssäule),

Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE, RNase-free Water)

Top Vision™ LEG Q Agarose

Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.6 Software und Datenbanken

1-D Analysesoftware Quantity One

Biorad (München)

ExPASy Proteomics Server

www.expasy.ch

IrfanView 3.99

www.irfanview.com

Microsoft® Excel und Word 2003

Microsoft GmbH

(Unterschleißheim)

Primer Express PPC

Applied Biosystems (Darmstadt)

PubMed (National Center for Biotechnology Information)

www.ncbi.nlm.nih.gov

2.2 Untersuchungen am Lungengewebe und an der Zellkultur (Primärkultur)

2.2.1 Experimentelle Planung

Die Untersuchungen wurden an humanem Lungenhomogenat und an der Zellkultur durchgeführt. Als Techniken wurden real-time PCR, indirekte Immunfluoreszenz und Western Blot eingesetzt. Die durchgeführten Arbeitsschritte sind in **Abbildung 3** graphisch dargestellt.

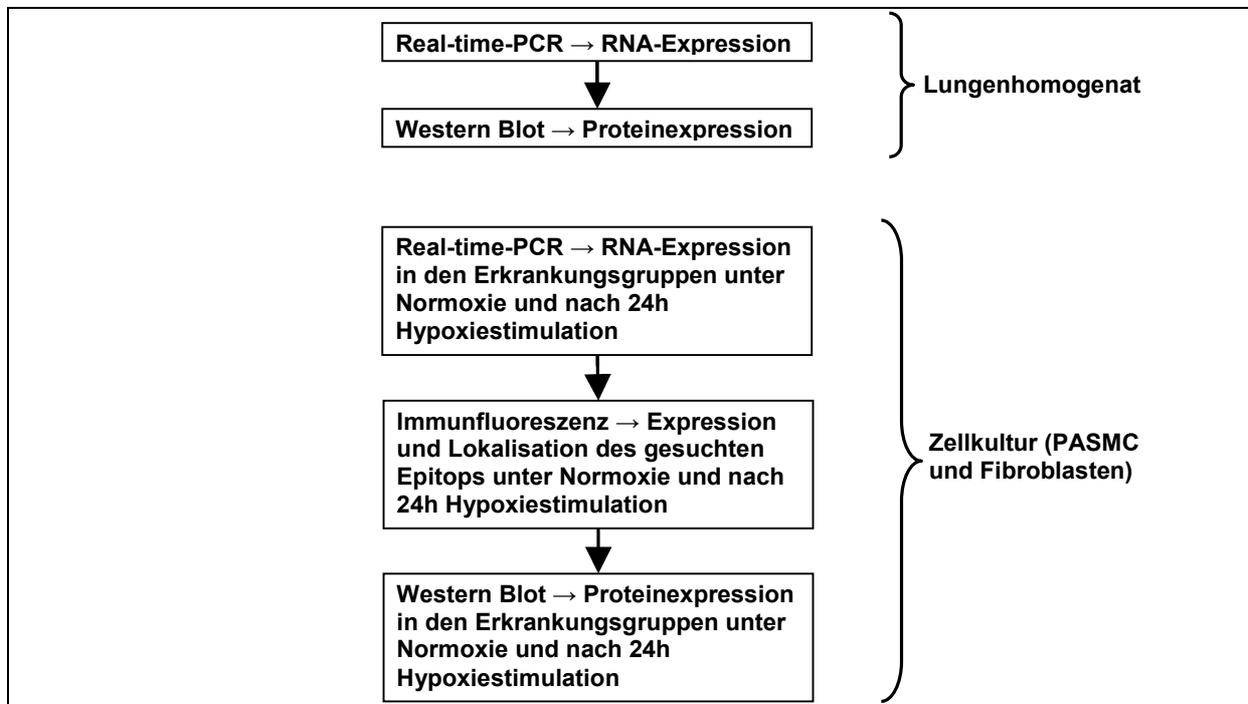


Abbildung 3: An humanem Lungenmaterial durchgeführte Arbeitsschritte.

2.2.2 Lungenhomogenat

Das Gewebe der humanen Lungen stammt vom AKH Wien, Abteilung für Thoraxchirurgie/Transplantationschirurgie. Bei den Lungen handelt es sich um explantierte Lungen, die von Prof. Dr. Walter Klepetko, Leiter des Lungentransplantationsprogrammes des Universitätsklinikums Wien, zur Verfügung gestellt wurden. Alle Spender haben nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung gegeben. Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission des Fachbereiches Medizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen genehmigt (Bestätigung der Ethikkommission vom 19.01.2006; Aktenzeichen 10/06; Vorsitz: Prof. Dr. K. L. Schmidt). Aufbauend auf den Ergebnissen der Tierversuche, sollten Gen- und Proteinexpressionen an humanem Probenmaterial bestimmt werden. Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit standen Lungenproben von jeweils 5 IPAH- und COPD-Patienten, sowie von 5 Spendern zur Verfügung (siehe 8). Damit sollten Tendenzen oder eventuelle signifikante Unterschiede, im Sinne einer explorativen Studie, aufgezeigt werden. Limitiert wurde der Stichprobenumfang von dem zur Verfügung stehenden Material. Die Erkrankungen wurden klinisch diagnostiziert und im Institut für Pathologie, Justus-Liebig-Universität, histologisch bestätigt. Verglichen wurde eine Kontrollgruppe von Spenderlungen mit Lungenhomogenat von IPAH-, und COPD-Lungen. Die gefrorenen Gewebestücke wurden wie folgt aufbereitet:

Vorbereitung für die RNA Extraktion:

Der Gewebestück wurde mittels Tissue Tek[®] auf einem Gewebestempel eingebettet. Im Kryostat wurden von dem Gewebestück 40 Schnitte a 10µm Dicke angefertigt und in einem Eppendorf Gefäß aufgefangen. Das Gewebe wurde nun mit 1ml Trifast[®] versetzt und mittels Nadel und Spritze homogenisiert. Das Lysat wurde bei Raumtemperatur 5min stark gevortext und anschließend 15min bei 13000rpm in der auf 4°C gekühlten Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Proteinextraktion zur Western-Blot-Analyse:

Lungengewebe von 60mm³ wurde mittels Mörser und Pistill pulverisiert. Das entstandene Pulver wurde in RIPA Zellyse-Puffer, welches mit den Proteininhibitoren Complete (1:25) und Vanadat (1:100) versetzt wurde, aufgelöst. Das Lysat wurde abgekratzt, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend mittels Nadel und Spritze homogenisiert. Im Anschluss wurde das Lysat 15min bei 13000rpm in der auf 4°C gekühlten Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3 Isolation und Kultur der pulmonal-arteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) und Fibroblasten der Adventitia

Sowohl die PASMC als auch die Fibroblasten wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. N. Weissmann (Zellkultur Seltersberg/Haus C), Zentrum für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, isoliert und in der 2. bis 8. Passage zur Verfügung gestellt. Für diese Arbeit wurden Zellen in der 2. bis 10. Passage weiterverwendet (siehe 8). Die Zellen wurden nach gängigen Protokollen isoliert [121]. Eine Typisierung wurde durch die Arbeitsgruppe von Dr. med. B. Eul vorgenommen. Folgender Stichprobenumfang wurde für jede Zellart und Erkrankung (IPAH, COPD und Kontrollgruppe) verwendet: Zur Bestimmung der RNA-Expression wurde für die PASMC n=5, für die Fibroblasten n=3 verwendet. Zur Bestimmung der Proteinexpression mittels Western Blot konnte, aufgrund von Platzmangel auf dem Elektrophoresegel, nur n=4 für PASMC und n=2 für die Fibroblasten verwendet werden. Damit sollten Tendenzen oder eventuelle signifikante Unterschiede, im Sinne einer explorativen Studie, aufgezeigt werden. Ein größerer Stichprobenumfang konnte nicht gewählt werden, da die Zellbestände limitiert waren. Wie bei dem Lungenhomogenat wurde eine Kontrollgruppe mit einer IPAH- und COPD-Gruppe verglichen.

Kultur der PASMC und Fibroblasten:

Für die Kultivierung der PASMC und Fibroblasten wurde das Kulturmedium jeden 2. Tag gewechselt und die Zellen im Inkubator angezüchtet. Unter dem Mikroskop wurde das Konfluenzstadium beurteilt und die Zellen nach erreichter Konfluenz für weitere Versuche verwendet. Um die Zellen in eine andere Passage zu überführen wurde wie folgt vorgegangen: Nach erreichter Konfluenz wurde die Zellkulturplatte mit 7ml Trypsin-EDTA für 5min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1ml FCS 100% durch die darin enthaltenen Trypsininhibitoren gestoppt. Die suspendierten Zellen wurden nun in ein 50ml Falcon überführt und für 5min bei 1200rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet vorsichtig in frischem Medium resuspendiert. Danach wurden die suspendierten Zellen in einer der Wachstumsgeschwindigkeit entsprechenden Verdünnung auf Zellkulturschalen ausgesät (neue Passage).

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die passagierten Zellen auf einen 8-kammerigen Kultur-Objektträger ausgesät. Um gleich viele Zellen pro Kammer zu gewährleisten wurden die suspendierten Zellen mittels Neubauer-Kammer gezählt und zu jeweils 10.000 Zellen pro Kammer ausgesät.

2.2.4 Hypoxiestimulation

Die dicht gewachsenen Zellkulturschalen wurden für 24h unter normobaren hypoxischen Bedingungen ($FiO_2=0,01$; entsprechend 1% O_2) inkubiert. Dazu wurden die Zellen zunächst 2x mit RPMI gewaschen und einen Tag vor dem Experiment mit Minimalmedium versetzt. Für die Hypoxiestimulation wurden die Zellkulturplatten mit frischem Minimalmedium versetzt und für 24h in der Hypoxiekammer inkubiert. Als Kontrolle dienten gleichbehandelte Platten, welche 24h unter normobaren normoxischen Bedingungen ($FiO_2=0,21$) inkubiert wurden. Nach 24h Exposition wurden die Zellkulturplatten auf Eis gestellt, das Medium verworfen und die Platte einmalig mit PBS gewaschen. Die Platten konnten nun für die weitere Aufbereitung verwendet werden:

Zur Vorbereitung für die RNA Extraktion wurden die Zellen einer 60mm Platte in 600 μ l RLT-Puffer + 1% β -Mercapto-Ethanol gelöst, mehrmals mit der Lösung gespült und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Im Anschluss wurde das Gefäß bei -80°C eingefroren.

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen einer 60mm Platte mit 400 μ l NuPage Puffer (NuPage/ H_2O im Verhältnis 1:4) + 2% β -Mercapto-Ethanol versetzt und mit dem Zellschaber von der Oberfläche der Platte abgekratzt. Die gelösten Zellen wurden nun mittels Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde das Medium von dem Objektträger entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren, wurden jede Kammer mit 400 μ l eiskaltem Methanol befüllt und für 10min bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde das Methanol verworfen und die Platte zweimal mit PBS gewaschen.

2.3 Real-time PCR

2.3.1 RNA-Isolation aus Lungenhomogenat und Primärkultur

Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Um Verunreinigungen mit DNasen zu vermeiden, wurden die Proben in einem QIA-Shredder bei 10.000rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit äquivalenter Menge 70%igem Ethanol gemischt und auf die Silica-Säulen transferiert. Die Säulen wurden bei 8.000rcf für 15sek zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurden 350µl RW1 Puffer auf die Säulen gegeben und erneut bei 8.000rcf zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses, wurde 80µl DNase Mix auf die Säulen pipettiert und bei Raumtemperatur 15min inkubiert. Dieses diente dem Abbau genomischer DNA. Es folgte ein weiterer Schritt mit 350µl RW1 Puffer und Zentrifugation bei 8.000rcf. Im nächsten Schritt wurde zweimalig 500µl RPE Puffer auf die Säulen appliziert und bei 8.000rcf zunächst 15sek, dann 2min zentrifugiert. Die Säule wurde danach unter $\geq 8.000rcf$ trocken zentrifugiert. Um die RNA zu eluieren, wurde auf die Säule 34µl Aqua_{dest.} pipettiert bei 8.000rcf 1min zentrifugiert und der Durchfluss erneut unter denselben Einstellungen zentrifugiert. Danach folgte eine Lagerung auf Eis und die Konzentrationsmessung der RNA.

2.3.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Messung der RNA-Konzentration wurde das Gerät NanoDrop[®] (Rockland, USA) mit entsprechender Software verwendet, welches über die UV-Absorption die Konzentration bestimmt. Zunächst wurde eine Nullmessung mit Aqua_{dest.} durchgeführt. Für die Messung der RNA wurde ein Volumen von 1,5µl RNA-Lösung verwendet. Dabei absorbiert RNA eine Wellenlänge von 260nm. Proteine würden bei einer Wellenlänge von 280nm absorbieren. Ein Peak bei Wellenlänge 280nm würde eine Verunreinigung mit Proteinen anzeigen. (Dabei absorbiert RNA eine Wellenlänge bis maximal 260nm. Der Quotient von OD₂₆₀ und OD₂₈₀ zeigt den Grad der Verunreinigung durch Proteine an. Proteine absorbieren v.a. wegen ihres Tryptophangehaltes bis maximal einer Wellenlänge von 280nm.)

2.3.3 Reverse Transkription der RNA (cDNA Synthese)

Für die Reverse Transkription wurden 600ng RNA in 10µl H₂O gelöst und in einem Doppelansatz angesetzt. Die Proben wurden zur Denaturierung zunächst für 10min bei 70°C erhitzt und danach 5min auf Eis gelagert. Auf 10µl RNA-Lösung wurde 10µl Mastermix pipettiert (**Tabelle 6**). Nach dem Zusammenmischen der Probe mit dem Mastermix folgte die Reverse Transkription unter folgenden Bedingungen im TrioBlock. Zunächst für 10min bei 20°C, dann für 75min für 43°C und als letzter

Schritt für 5 min bei 99°C. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C gelagert und für die real-time-PCR verwendet.

Tabelle 6: Mastermix

Substanz	Konzentrationen der Komponenten	Volumen pro Reaktionsansatz [μl]
10x Buffer II	100mM Tris-HCL, 500mM KCL, pH 8,3	2,0 μl
MgCL ₂	25mM	4,0 μl
dNTP's	10mM each	1 μl
Random Hexamers	5 μM	1 μl
RNAse Inhibitor	10U	0,5 μl
Reverse Transcriptase	50U	1,0 μl
Aqua _{dest.}		0,5 μl
Σ		10 μl

2.3.4 Quantitative real-time-PCR

Die quantitative real-time-PCR, welche mit dem ABI PRISM[®] Sequence Detection System 7700 durchgeführt wurde, erfolgte stets für mehrere Gene gleichzeitig und unter Einsatz derselben Menge an Ausgangsmaterial sowie unter identischen PCR-Bedingungen. Das Ansatzvolumen betrug 25 μl , davon 2 μl cDNA und die restlichen 23 μl Reaktionsansatz (**Tabelle 7**). Die Oligonukleotid-Primer wurden aus untenstehender Tabelle verwendet, für jedes Gen 0,5 μl entsprechender Primer (siehe **2.3.6**). Für jedes Gen wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, bei der anstelle der cDNA-Probe 2 μl Wasser in den sonst identischen Reaktionsansatz gegeben wurden. Die PCR-Bedingungen wurden wie in **Tabelle 8** dargestellt gewählt. Da der SYBR Green[®] I Farbstoff unselektiv auch an Primerdimere binden kann, wurde sowohl eine Schmelzkurvenanalyse als auch eine Gelelektrophorese mit dem Produkt durchgeführt (siehe **2.3.5**). Ab einem CT-Wert von über 38 Zyklen wurde die Probe als negativ gewertet.

Tabelle 7: Reaktionsansatz real-time-PCR

Substanz	Volumen
2x Invitrogen Super Mix Puffer	12,5µl
MgCl ₂ (50mM)	1µl
Vorwärts-Primer (10µM)	0,5µl
Rückwärts-Primer (10µM)	0,5µl
Rox Reference Dye50x	0,5µl
H ₂ O	8µl
cDNA	2µl
Σ	25µl

Tabelle 8: Reaktionsbedingungen für die real-time-PCR

Temperatur/°C	Zeitdauer	Zyklen	Funktion
50°C	2min	1x	Uracil N'-glykosylase-Reaktion zum Abbau evtl. kontaminierender PCR-Produkte
95°C	10min	1x	Inaktivierung der Uracil N'-glykosylase und Aktivierung der Taq DNA-Polymerase
95°C	5sek	} 45x	Denaturierung der dsDNA
59°C	5sek		Hybridisierung der Primer (Annealing)
72°C	10sek		Elongation/Polymerisation

Der SYBRGreen® I Farbstoff liefert ein Signal proportional zur Menge an PCR-Produkt. Das Signal wird vom Sequenzer nach jedem Zyklus gemessen und erstellt eine Amplifikationskurve. Für jede Kurve wird bestimmt, wie viele Zyklen bis zum Erreichen eines Schwellenwertes benötigt wurden. Dieser Schwellenwert oder auch CT-Wert gilt als Maß für die initiale Menge an Zielsequenz. Dabei wird der Schwellenwert in Höhe der exponentiellen Phasen gelegt, wo die Amplifikationskurven möglichst wenig Hintergrundrauschen aufweisen und die Amplifikation noch möglichst ungehindert abläuft.

Die RNA-Expression der Kandidatengene wurde mit quantitativer real-time-PCR bestimmt. Um die relativen Unterschiede der Transkriptmengen zu bestimmen, wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode benutzt. Die Daten der real-time-PCR wurden als Fluoreszenzsignal ΔR_n gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die Software des Taqman-Gerätes berechnet ΔR_n mit der Formel $\Delta R_n = (R_n^+) - (R_n^-)$, wobei R_n^+ das Fluoreszenzsignal des Produktes zu einem beliebigen Zeitpunkt und R_n^- das Fluoreszenzsignal der Grundemission darstellt. Der Schwellenwert (threshold) wurde mittig in dem Graphen gewählt, welchen die Software berechnet hat. Dabei stellt ΔR_n die Ordinate (Y-Achse) und die Zykluszahl die Abszisse (X-Achse) dar. Bei dem Lungenhomogenat wurde ein Thresholdwert von 0,05, bei den Zellen ein Wert von 0,07 verwendet. Ein konstanter Threshold wurde verwendet, um die Ergebnisse untereinander vergleichen zu können. Der CT-Wert ist definiert als die Zykluszahl, an welcher der ΔR_n den Threshold schneidet. Unterschiede im RNA-Niveau konnten mit dem ΔCT -Wert dargestellt werden. Die Formel dafür ist:

$$\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{Referenz}} - \text{CT}_{\text{Kandidat}})$$

Als Referenzgene wurden humanes PBGD und HPRT verwendet und die CT-Werte beider Ergebnisse gemittelt. Unterschiede zwischen normoxisch und hypoxisch behandelten Zellen wurden anhand der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte bestimmt:

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\Delta\text{CT}_{\text{Hypoxie}} - \Delta\text{CT}_{\text{Normoxie}})$$

Unter Annahme idealer Amplifikation ergibt sich der Regulationsfaktor gemäß

$$\text{RF} = 2^{\Delta\Delta\text{CT}}$$

2.3.5 Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese

Da anhand einer Amplifikationskurve mit SYBR Green[®] I nicht entschieden werden kann, ob das Signal von einem spezifischen Produkt kommt, wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Neben der Überprüfung der Spezifität der Primerpaare kann dieses Verfahren wichtige Hinweise auf unspezifische Amplifikationsprodukte wie beispielsweise Primer-Dimere geben und dient somit der qualitativen Überprüfung der zuvor durchgeführten Amplifikation. Hierbei werden die Reaktionsansätze im Anschluss an die PCR langsam und gleichmäßig von 60°C auf 95°C erwärmt, wobei kontinuierlich die Fluoreszenzintensität gemessen wird. Die Schmelztemperatur macht sich als plötzliche starke Fluoreszenzabnahme bemerkbar, welche als ein Maximum in der ersten negativen Ableitung dieser Funktion darstellbar ist. Diese Fluoreszenzabnahme erklärt sich durch den Übergang von doppelsträngiger (ds) zu einzelsträngiger (ss) DNA, dem so genannten Schmelzen. Bei diesem Vorgang wird der Farbstoff SYBR Green[®] I in seine schwache Grundfluoreszenz zurückversetzt. Die hierbei ermittelten Schmelztemperaturen konnten dann mit den für jedes Amplikon zuvor mit der Software Primer Express PPC errechneten Schmelztemperaturen verglichen werden.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den entstandenen Amplifikaten auch hinsichtlich der Amplifikatlänge um das erwünschte Produkt handelt, wurde für jedes Primer-Paar eine Gelelektrophorese in 2.5%igem Agarose-Gel durchgeführt (**Abbildung 4**). Nur bei Auftreten einer einzigen Bande auf erwarteter Höhe wurde die Probe in die Auswertung aufgenommen. Wie in genannter Abbildung zu sehen, wurden Negativkontrollen (Pufferkontrollen) für jedes zu testende Amplikat mitgeführt. Bei den Negativkontrollen wurde anstatt cDNA Wasser für die PCR verwendet. Nur wenn diese Probe keine Bande in der Gelelektrophorese aufwies, wurde der PCR-Lauf in die Auswertung aufgenommen. Die Gelelektrophorese wurde wie folgt durchgeführt: für die DNA-Analyse wurde ein 1.5%iges Gel (0.75g Agarose Top-Vision LE GQ aufgekocht und gelöst in 55ml 0.5x TBE Puffer) gegossen. Nach 15min wurde das polymerisierte Agarosegel mit 0.5x TBE Puffer überschichtet. Pro Tasche wurde ca. 1µg DNA, welche zuvor mit Ladepuffer vermischt wurde, in einem Volumen von 10µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte im Anschluss mit einer Spannung von 120V für 30–40min, um anschließend die DNA-Banden unter einer UV-Lampe (322nm) sichtbar zu machen. Als Marker diente 1µl des ΦX174 DNA/Hinfl mit Fragmentlängen von 24 bis 726 Basenpaaren.

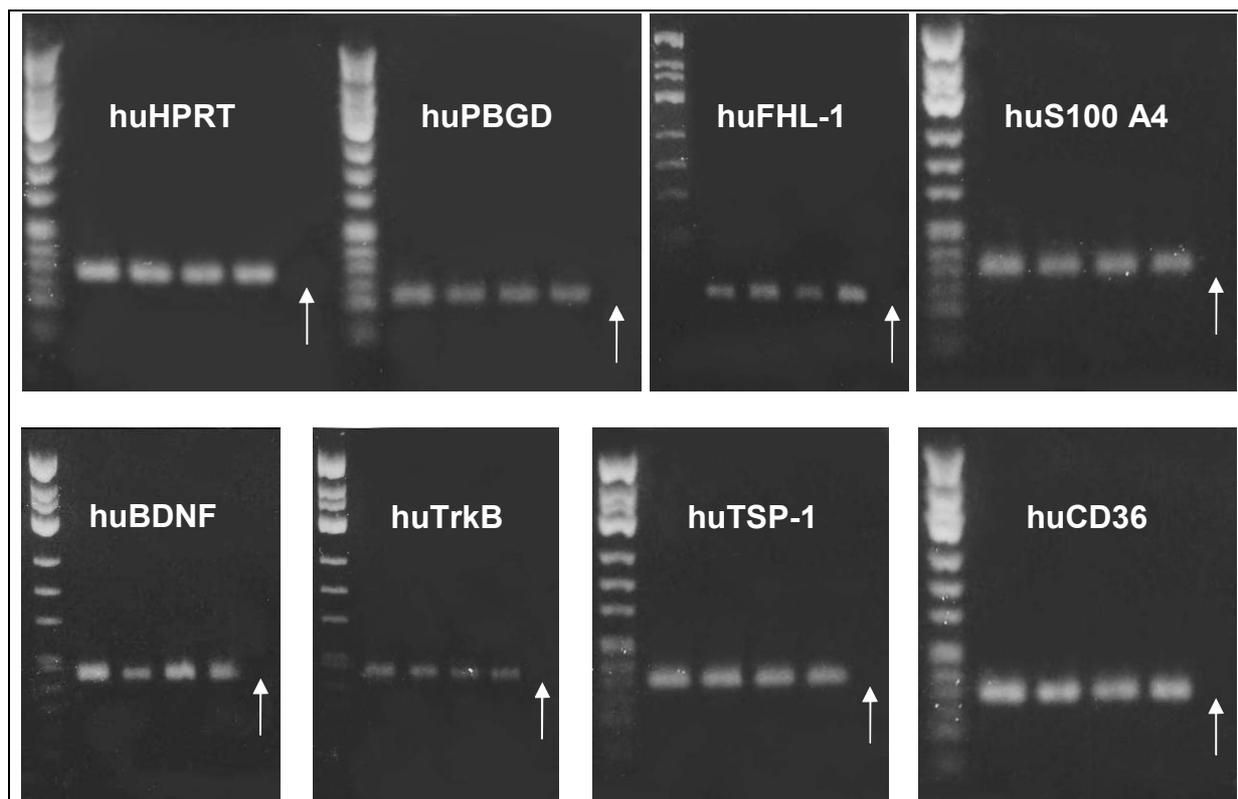


Abbildung 4: Nachweis der Produktspezifität der real-time PCR mit Hilfe der Gelelektrophorese. Links sind jeweils die Markerbanden des Längenstandards Hinf I dargestellt; es folgen die 4 amplifizierten Proben (je 2 Proben PASM C unter Normoxie und nach 24 Hypoxie), rechts ist die Negativkontrolle (Pufferkontrolle) mit Pfeil markiert.

2.3.6 Primer Sequenzen und Länge des Amplifikates

Intron-überspannende spezifische Primer wurden mit Hilfe des Programmes Primer Express entworfen. Die Sequenzen wurden der GenBank entnommen. Validiert wurden die Primer von der Arbeitsgruppe.

Tabelle 9: Primersequenzen und Größe des Amplifikates

Zugangsnummer	Name des Genes (Alle Human)	Primersequenz von 5´- 3´ (FP/RP)	Länge des Amplifikates
NM000194	Hypoxanthin-Guanin-Phosphribosyltransferase (HPRT)	- AGG AAA GCA ATC ACT CTC AT - - GGT GGA GAT GAT CTC TCA ACT TTA A -	94 bp
NM000190	Porphobilinogen desaminase (PBGD)	-CCC ACG CGA ATC ACT CTC AT- - TGT CTG GTA ACG GCA ATG CG -	69 bp

Zugangsnummer	Name des Genes (Alle Human)	Primersequenz von 5´ - 3´ (FP/RP)	Länge des Amplifikates
NM001449	SLIM1 (FHL-1)	- GGC CAA GAA GTG TGC TGG AT - - GTA GTC GTG CCA GGA TTG TCC -	93 bp
NM002961	S100 calcium-binding protein A4 (S100 A4)	- CTA AAG GAG CTG CTG ACC CG - - TCC CTG TTG CTG TCC AAG TTG -	101 bp
NM001709	Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)	- CAA GGC AGG TTC AAG AGG CTT - - CTG GAC GTG TAC AAG TCT GCG -	131 bp
NM006180	Tyrosine receptor kinase B (TrkB)	- ACA TTT CCG TCA CCT TGA CTT GT - - GGS TGG ATT TAG CCT CTT GGA G -	103 bp
NM003246	Thrombospondin 1 (Tsp-1)	- AAT GCT GTC CTC GCT GTT GG - - GTC GAA TTC CAT TGC CAC AG -	98 bp
NM000072	CD36 Antigen	- GTG ATG ATG AAC AGC AGC AAC A - - CCT CAG CGT CCT GGG TTA CAT -	99 bp
NM000291	Phosphoglycerate kinase (PGK-1)	- GAC GTT AAA GGG AAG CGG GT - - GAA TTT GAT GCT TGG GAC AGC -	110 bp

2.4 Indirekte Immunfluoreszenz der Zellkultur

2.4.1 Färbetechnik

Zum Blockieren der freien Bindungsstellen wurde BSA verwendet und in PBS zu einer 5%igen Lösung angesetzt. In jede Kammer des Chamberslides wurde 400µl 5% BSA-Lösung pipettiert und für 60min geschüttelt. In einem 2. Schritt wurde der Primär-Antikörper in passender Verdünnung (siehe **2.1.4**) in einer 2.5% BSA-Lösung gelöst, in die Kammern pipettiert und für 60min auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation folgten drei 5-minütige Waschschrte auf dem Schüttler mit PBS. Als sekundäre, farbstoffmarkierte Antikörper wurden verwendet: FITC-Antikörper gegen Ziege (anti-Ziege) in einer Verdünnung 1:200 und ALEXA 555-Antikörper gegen Kaninchen (anti-Kaninchen) in einer Verdünnung 1:2000, jeweils gelöst in 2,5% BSA-

Lösung. Der sekundäre Antikörper wurde für 40min auf dem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Es folgten nun acht 5-minütige Waschschrte mit PBS ebenfalls im Dunkeln. Danach wurde das Chamberslide für 5min mit dem Kernfärbemittel DAPI in einer Verdünnung 1:100 behandelt. In einem weiteren Fixierungsschritt wurde der Chamberslide für 8min mit 4% PFA-Lösung behandelt. Die Kammern auf dem Objektträger wurden entfernt. Die Zellen wurden mit DAKO Immunfluorescence Medium eingedeckt. Zum Schluß wurde der Objektträger mit einem Deckglas versehen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Zur Sicherstellung, dass die Färbung nicht durch eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers zustande gekommen ist, wurde stets eine Negativkontrolle durch Applikation eines sekundären Antikörpers, bei Substitution des primären Antikörpers durch Puffer, durchgeführt.

2.4.2 Auswertung am Immunfluoreszenz-Mikroskop

Die Auswertung erfolgte mit einem Leica Mikroskop (DMLA, Kamera: DC 300 FX). Es wurde von jeder Erkrankung sowohl PASC und adventitielle Fibroblasten verwendet. Um Fluoreszenzintensitäten miteinander vergleichen zu können, wurde darauf geachtet die Einstellungen bei jedem Bild konstant zu halten. Die Zellen wurden unter 10, 40 und 100 facher Vergrößerung betrachtet und ausgewertet.

Mit der DAPI-Kernfärbung wurde der Zellkern angefärbt. Anschließend wurden getrennt Bilder von DAPI-Kernfärbung und der Färbung des interessierenden Proteins aufgenommen. Mit Hilfe der Software konnte eine Überlagerung beider Bilder erzeugt werden und sowohl mit der Kernfärbung als auch mit der spezifischen Färbung verglichen werden.

2.5 Western Blot Analyse

2.5.1 Messung der Proteinkonzentration und Aufbereitung der Proteine

Bei den in NuPage[®] gelösten Proteinen wurde keine Konzentrationsmessung durchgeführt. Hier wurde versucht, über eine Angleichung der Intensität der β -Actin Banden eine annähernd gleiche Proteinkonzentration zu erreichen. Die Konzentrationsmessung der in RIPA gelösten Proteine des Lungenhomogenates wurde mit Hilfe eines kommerziellen spectro-fotometrischen Assays (BCA assay kit) durchgeführt. Unmittelbar vor der Elektrophorese wurden die Proteine mit Laemli[®] Puffer in einem Verhältnis 1:2 versetzt, die in NuPage[®] gelösten Proteine bedurften keines Laemli[®] Puffers. Sämtliche Proteinproben wurden kurz vor dem Auftragen auf das Gel für 10min auf 95°C erhitzt und danach auf Eis gelagert.

2.5.2 SDS-Page Elektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine Methode zum Auftrennen von Molekülen, insbesondere von Proteinen und Nukleinsäuren. Da die zu trennenden Moleküle eine Ladung besitzen, werden sie beim Anlegen einer Spannung durch das Polymer "gezogen" und abhängig von Ladung, Größe, Molmasse und Beschaffenheit des Trennmediums elektrophoretisch aufgetrennt. In dieser Arbeit wurde die PAGE zum Auftrennen von Proteinen verwendet. Die Elektrophorese wurde mit einem 10%igem SDS-Polyacrylamidgel (Zusammensetzung siehe **2.1.2**) durchgeführt. Dabei wurden entweder Gele einer Dicke von 1,5mm oder 0,75mm verwendet. Proteine aus Lungenhomogenat wurden in gleichen Konzentrationen zu je 20µg auf das Gel aufgetragen. Es wurde stets ein Probenvolumen von 20µl pro Gelkammer verwendet. Um bei den Zellproben eine annähernd gleiche Proteinkonzentration zu gewährleisten, wurden in der Zellkultur gleich große Petrischalen und Konfluenz der Zellen vorausgesetzt. Konzentrationsunterschiede konnten über die Kontrollbande mit β -Actin erkannt werden. Die Kontrollbande sollte bei sämtlichen Proben von Lungengewebe und Zellen gleich dichte Banden vorweisen. Um die Größe des Proteins der spezifischen Banden zu ermitteln wurde ein Protein Standard (BioRad) verwendet. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Laufmittelfront das Ende des Gels erreicht hat.

Elektrophoresebedingungen: 120V für ca. 60min

2.5.3 Transfer der Gele auf PVDF-Membranen (Blotting)

Die fertigen Gele wurden auf eine 0,45µm PVDF-Membran transferiert. Kurz vor dem Blotten wurde die PVDF-Membran für 1min in Methanol eingelegt und abgesättigt.

Blottingbedingungen: 100V für 60min

2.5.4 Immundetektion

Um die unspezifischen Bindungsstellen auf den Membranen zu blockieren, wurden die Membranen in einer 5%igen entfetteten Milchpulverlösung (Lösungsmittel PBS + 0,1% Tween20) für eine Stunde inkubiert (Blockinglösung). Die Membranen wurden mit dem primären Antikörper (siehe **2.1.4**) in passender Verdünnung über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS + 0,1% Tween20 für jeweils 10min gewaschen. Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper gegen die entsprechende Spezies des Primärantikörpers für 60min auf der Membran inkubiert. Es wurde eine Verdünnung von 1:2000-1:3000 des Sekundärantikörpers verwendet. Sämtliche Antikörper für Western Blot wurden in der Blockinglösung gelöst. Nach den Inkubationsschritten folgten weitere drei 15-minütige Waschschrte mit PBS + 0,1% Tween20. Um die spezifischen Banden zu detektieren, wurden die Membranen mit einem Chemilumineszenzreagenz (ECL PlusTM) behandelt und mittels

Röntgenkassette und hochsensitiven Filmen ausgewertet. Die Expositionszeit der Filme richtete sich dabei nach der Stärke der Lumineszenz.

2.5.5 Membranstripping

Um die Membranen mit neuen Antikörpern inkubieren zu können, wurde die Membran mit Stripping Puffer (Zusammensetzung siehe **2.1.2**) für 75min behandelt. Es folgten zwei Waschschriffe a 10min mit PBS + 0,1% Tween20 und eine Inkubation der Membranen mit Blockinglösung für 30min. Im Anschluß konnten die Membranen wiederverwendet werden (siehe **2.5.4**).

2.5.6 Bestimmung der Bandenintensitäten mittels Densitometrie

Die Intensitäten der detektierten Banden wurden densitometrisch analysiert. Dazu wurde ein GS-800TM kalibriertes Densitometer und die 1-D Analysesoftware Quantity One (beide Bio-Rad Laboratories) verwendet. Als Referenzprotein diente β -Actin. Die logarithmischen Verhältnisse von interessierendem Protein zu β -Actin (log Ratio Protein/ β -Actin) wurden gemittelt. Soweit dies möglich war, wurde zwischen den Gruppen, den Versuchsbedingungen und der Zellart verglichen. Die β -Actin-Referenzbanden der Kontrollgruppe im Lungenhomogenat konnten nicht vollständig verwendet werden. Die erste Bande zeigte eine Artefaktüberlagerung und wurde bei den Berechnungen nicht berücksichtigt.

2.6 Statistische Auswertung

Alle statistischen Angaben im Text sowie in Abbildungen und Tabellen sind Mittelwerte \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM). Unterschiede zwischen Mittelwerten wurden mit dem t-Test geprüft. Für inter-individuelle Daten wurde der Welch-t-Test, für intra-individuelle Daten der gepaarte t-Test angewendet. Werte, die mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert der übrigen in der Gruppe befindlichen Werte abwichen, wurden aus dem Test entfernt (4- σ Test). Aus jeder Stichprobe wurde maximal 1 Wert entfernt. Zur Auswertung der Western-Blot-Daten wurden die log-Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin für den t-Test verwendet. Die in dieser Arbeit gewonnen Ergebnisse wurden im Sinne einer explorativen Studie gewonnen. Die angegebenen p-Werte dienen als Abschätzung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse. Unter Annahme der Nullhypothese sind die errechneten p-Werte nur ein Maß für die Reproduzierbarkeit bzw. für die Evidenz der Ergebnisse. Ein Signifikanzniveau für die Ablehnung von Nullhypothesen ist nicht angegeben. Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgt anhand der Effektgrößen.

3 Ergebnisse

3.1 FHL-1

3.1.1 FHL-1: RNA-Expression im Lungenhomogenat

Sowohl die IPAH- als auch die COPD-Gruppe zeigten höhere RNA-Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p_{\text{IPAH}}=0,008$, $p_{\text{COPD}}=0,007$; **Abbildung 5**).

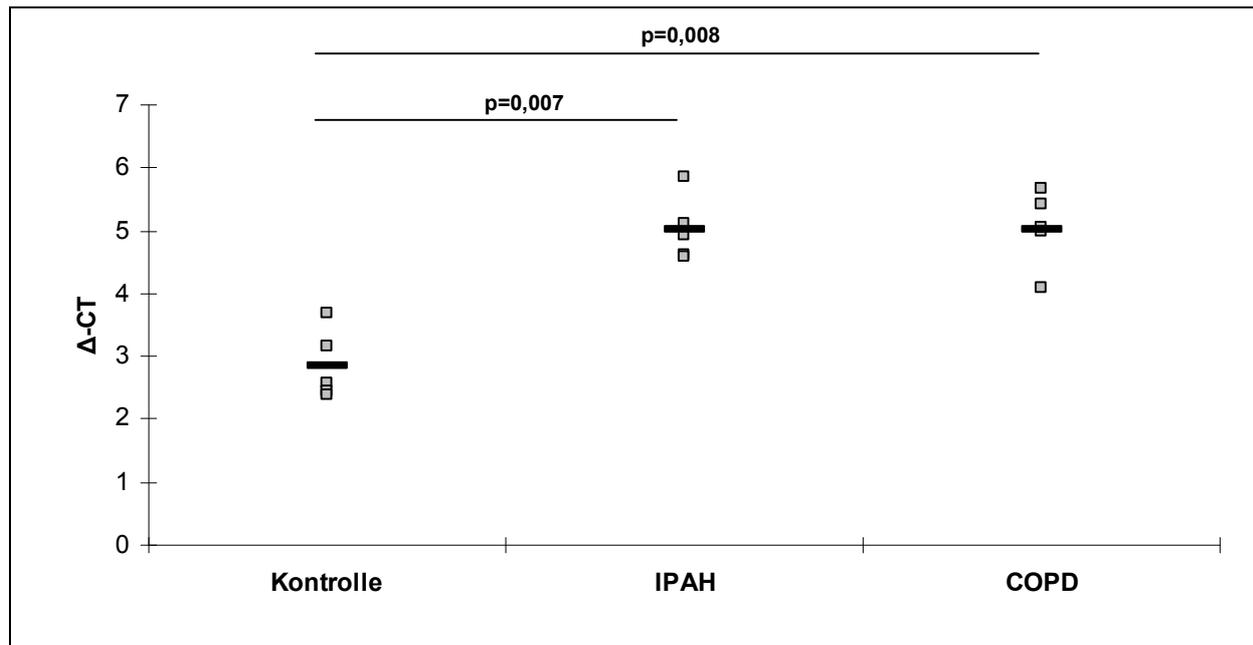


Abbildung 5: RNA-Expression von FHL-1 im Lungenhomogenat. Die Punkte geben die Einzelwerte der jeweiligen Gruppe an, der schwarze Balken den Mittelwert ($n=5$).

3.1.2 FHL-1: Proteinexpression im Lungenhomogenat

Es zeigte sich eine höhere Proteinexpression in der IPAH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,007$; **Abbildung 6**). Zwischen der COPD-Gruppe und Kontrollgruppe zeigte sich kein Unterschied.

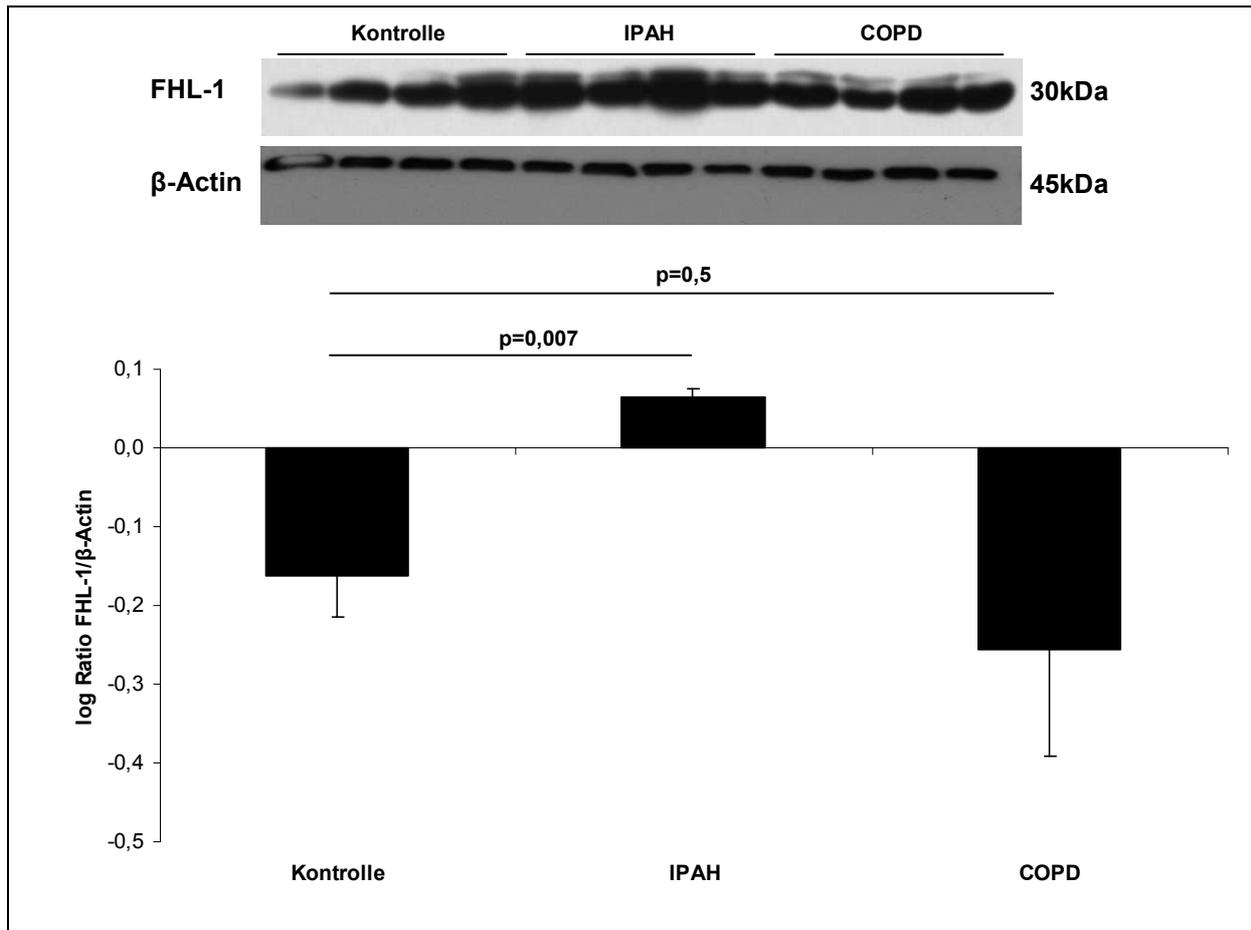


Abbildung 6: Western Blot Analyse von FHL-1 im Lungenhomogenat. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4).

3.1.3 FHL-1: Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Unter Normoxie zeigte sich bei den PASMC sowohl in der IPAH- als auch in der COPD-Gruppe eine erhöhte RNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p_{\text{IPAH}}=0,032$, $p_{\text{COPD}}=0,005$). Bei den Fibroblasten fand sich weder in der COPD- noch in der IPAH-Gruppe eine vermehrte RNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 24h Hypoxiestimulation zeigte sich bei den PASMC in der Kontrollgruppe eine vermehrte RNA-Expression ($p=0,001$; **Abbildung 7**). Bei den Fibroblasten war sowohl in der IPAH- als auch in der COPD-Gruppe eine erhöhte Expression messbar ($p_{\text{IPAH}}=0,0002$, $p_{\text{COPD}}=0,043$). In der Kontrollgruppe zeigte sich nach 24h Hypoxie kein Unterschied zu den normoxisch gehaltenen Zellen. Der Vergleich zwischen den Zellarten ergab folgendes Ergebnis: in der IPAH-Gruppe zeigte sich unter Normoxie eine niedrigere RNA-Expression zwischen PASMC und Fibroblasten ($p=0,015$).

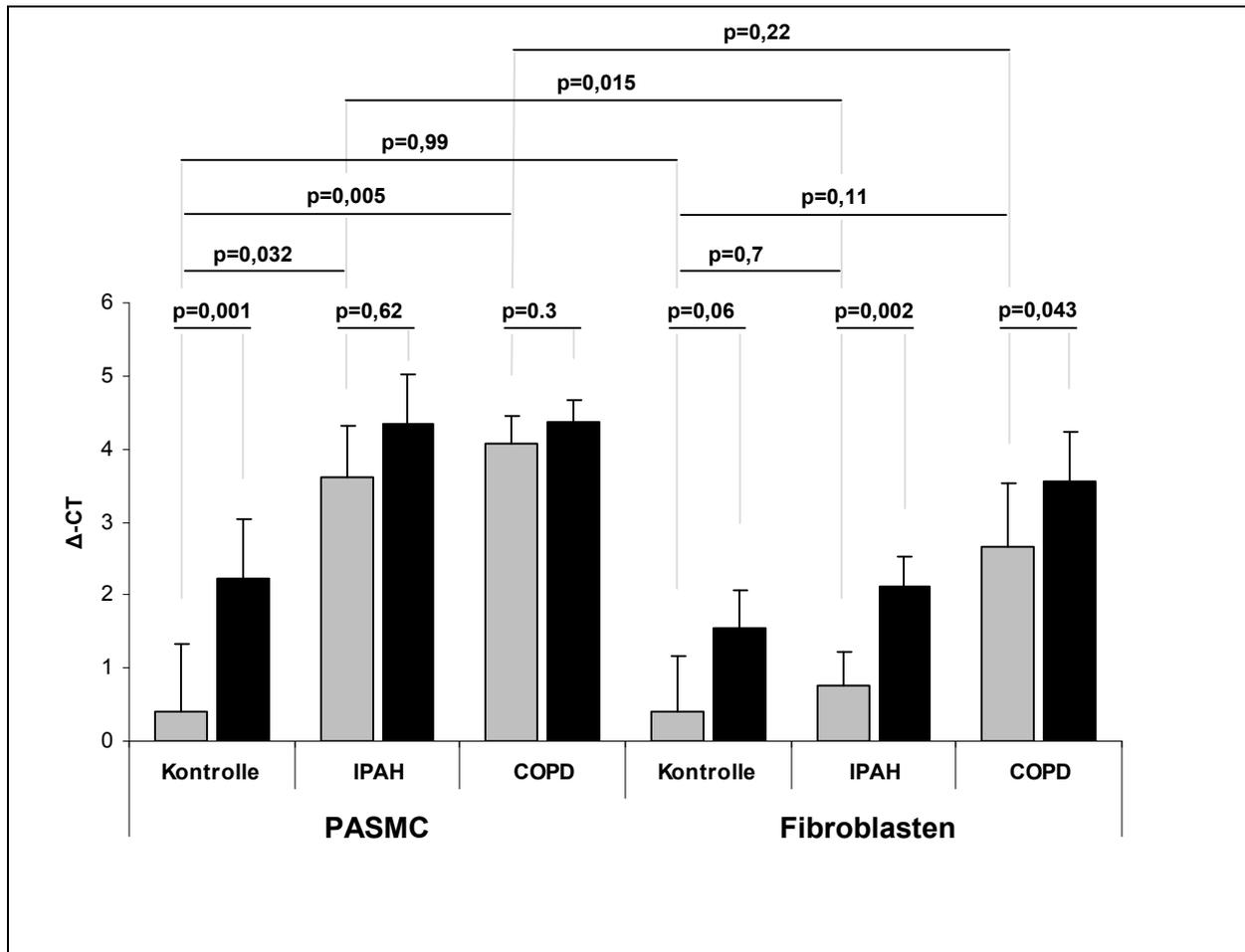


Abbildung 7: Vergleich der FHL-1 RNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen, unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz) sowie zwischen Zellarten. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der Δ -CT Werte an (n=5).

3.1.4 FHL-1: Lokalisation und Expression in PSMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Die Expression von FHL-1 wurde in allen Gruppen und beiden Zellarten unter Normoxie nachgewiesen. Dabei zeigte sich in allen Gruppen eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung. Eine Veränderung der Fluoreszenzintensität nach 24 h Hypoxie wurde nicht festgestellt (**Abbildung 8 und 9**). Nach 24h Hypoxie wurde weder in den PSMC der COPD-Gruppe, noch in den Fibroblasten der IPAH-Gruppe ein Signal gemessen.

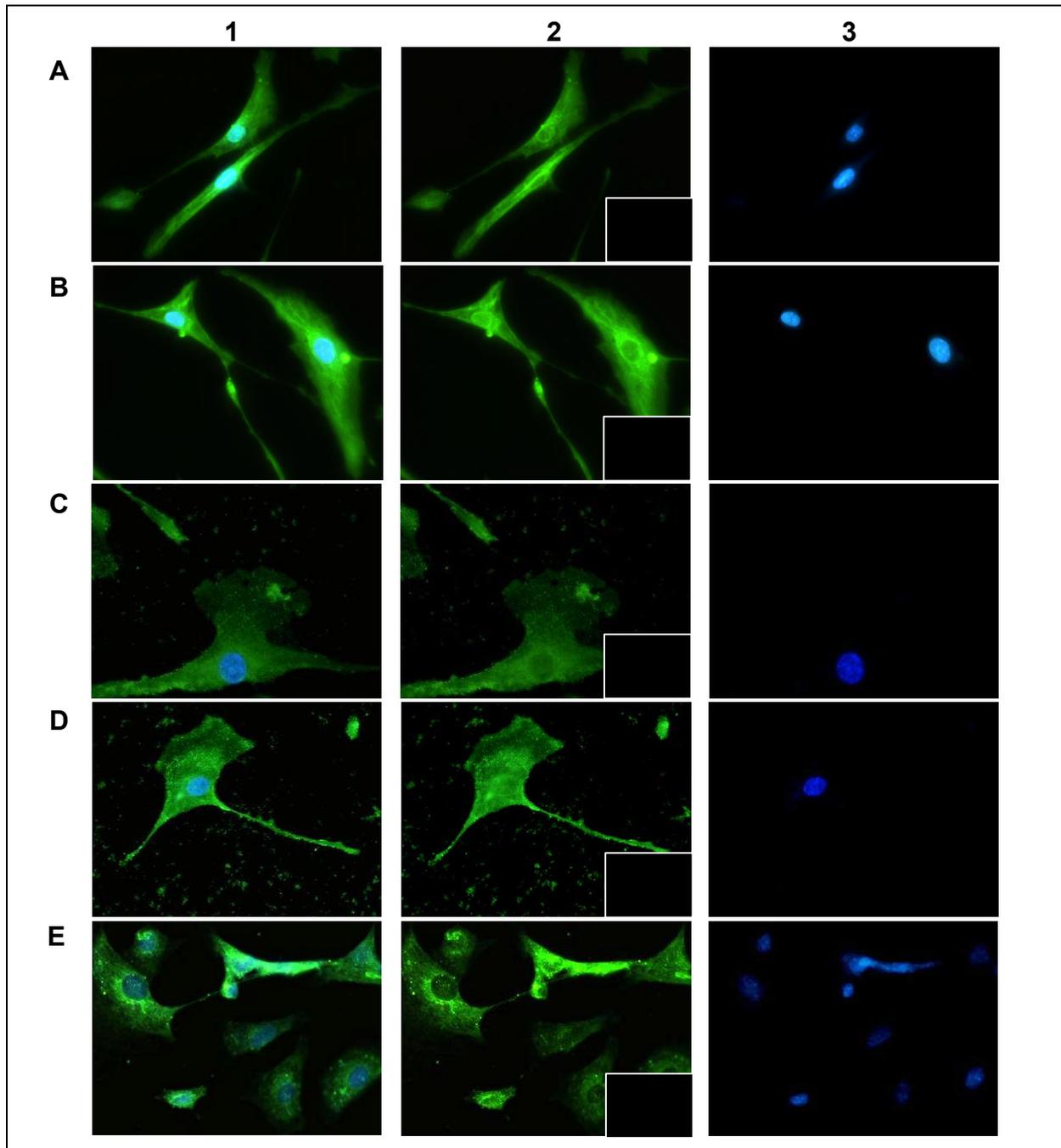


Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung von PASMC in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) PASMC Kontrollspenderlunge Normoxie, (B) nach 24h Hypoxie. (C) PASMC IPAH-Lunge Normoxie, (D) nach 24h Hypoxie. (E) PASMC COPD-Lunge Normoxie.

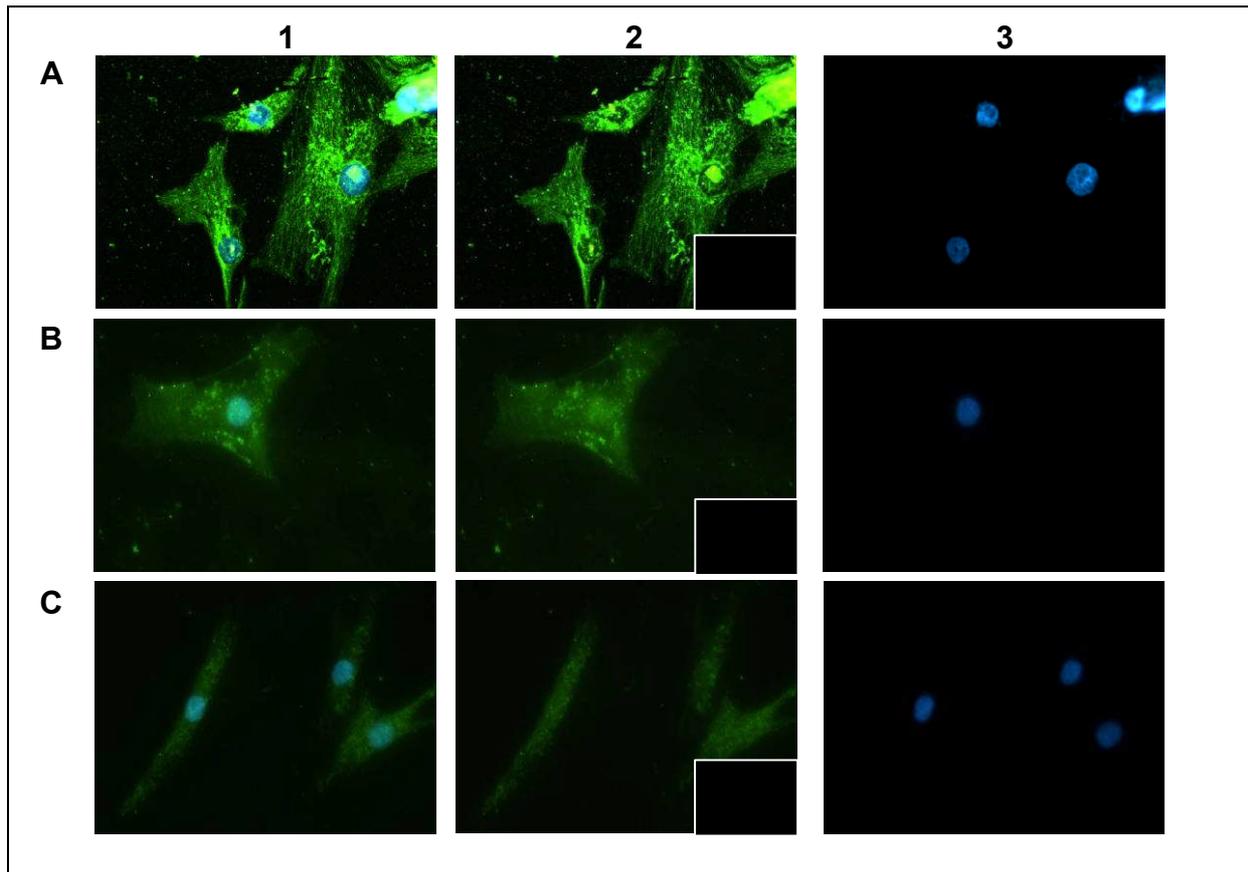


Abbildung 9: Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) Fibroblasten IPAH-Lunge Normoxie. (B) Fibroblasten COPD-Lunge Normoxie, (C) nach 24h Hypoxie.

3.1.5 FHL-1: Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Unter Normoxie zeigte sich in PASMC der IPAH-Gruppe eine vermehrte Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,032$; **Abbildung 10**). Bei den Fibroblasten zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Proteinexpression in der IPAH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,017$). Ein relevanter Einfluss von 24h Hypoxie auf die Proteinexpression wurde weder in PASMC noch in Fibroblasten gemessen (**Abbildung 11**). Bei den Fibroblasten konnte eine Proteinexpression nur bei den Zellen der COPD-Gruppe gemessen werden.

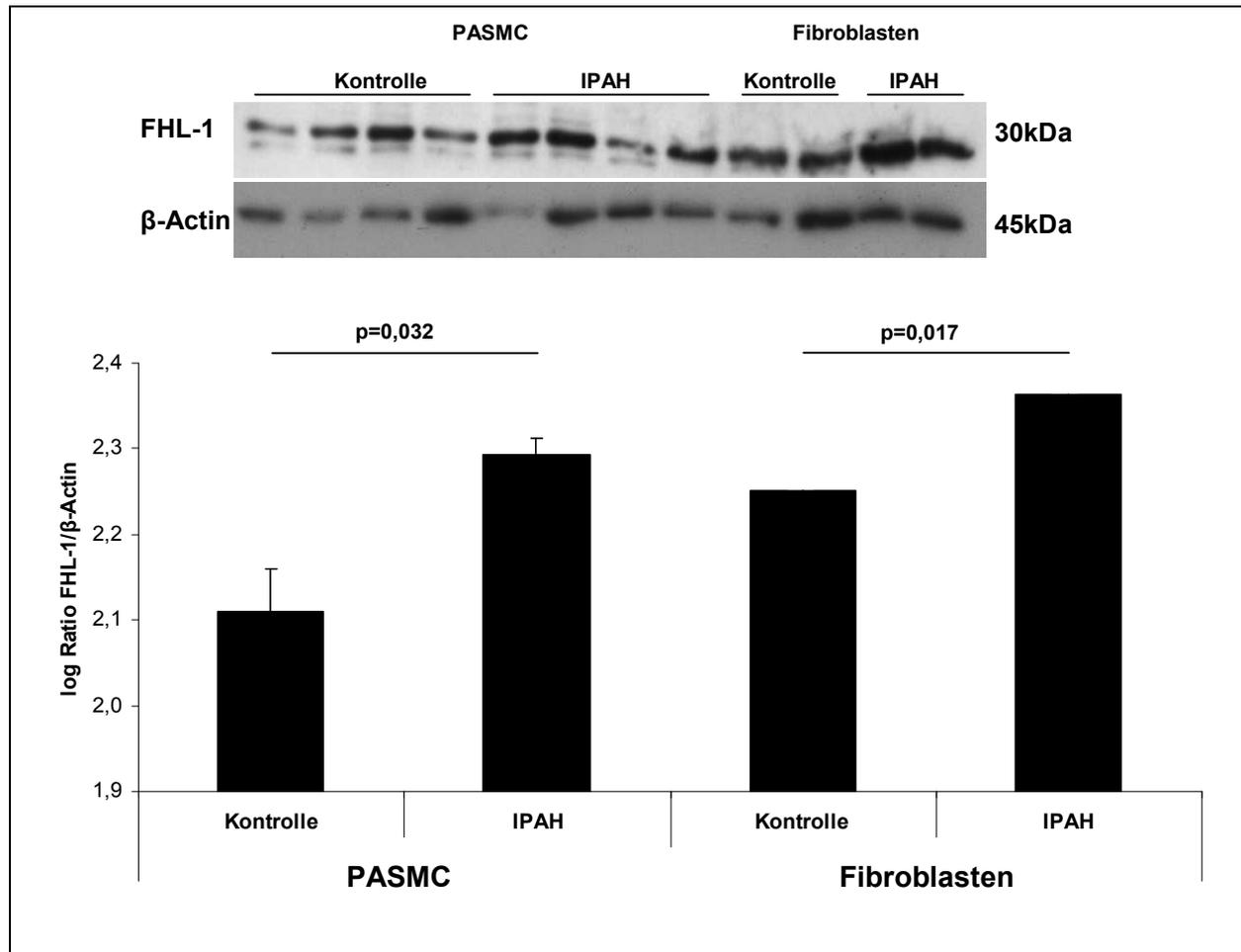


Abbildung 10: Western Blot Analyse von FHL-1 in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie. Vergleich von Kontrolle zu IPAH. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4 bei PASMC, n=2 bei Fibroblasten).

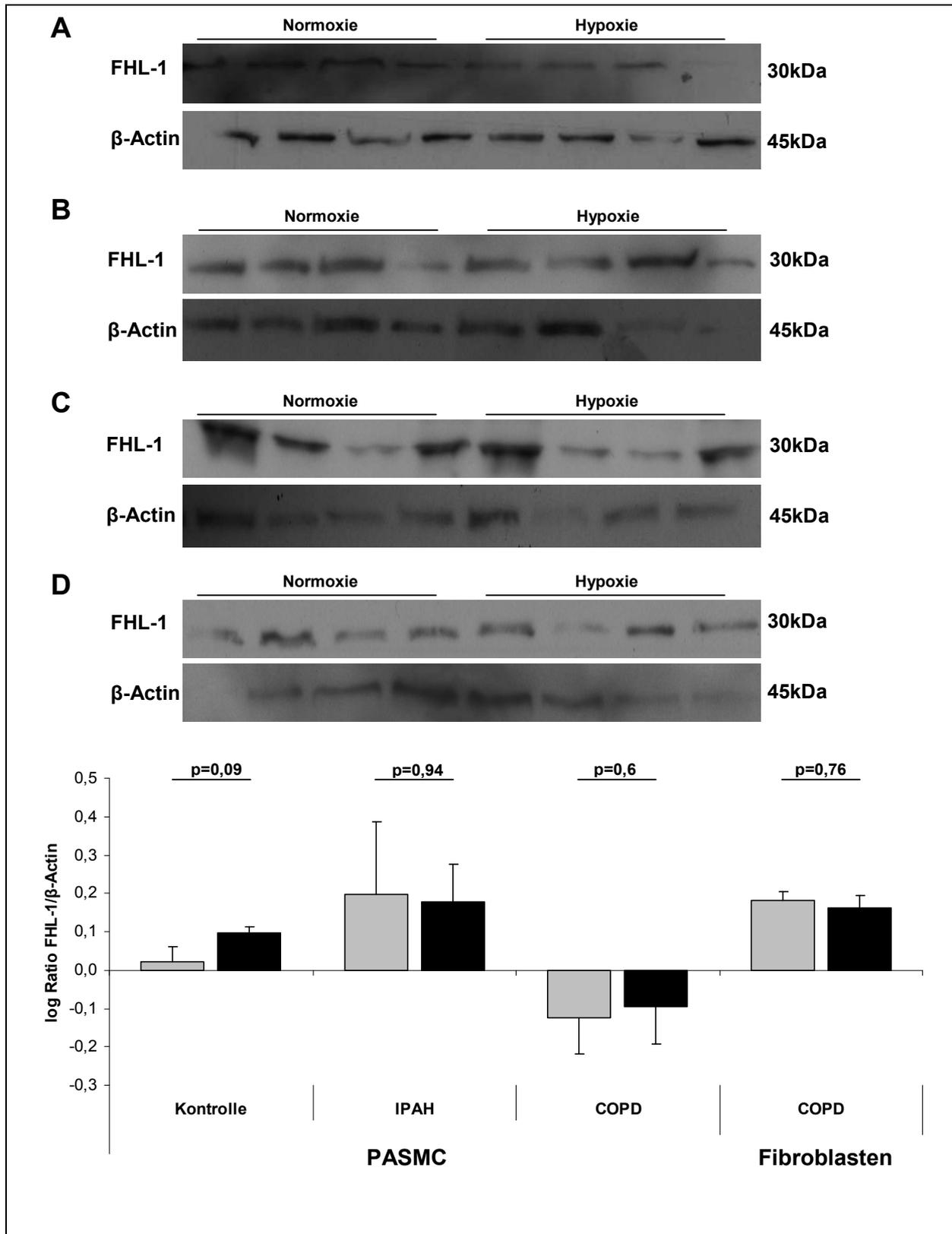


Abbildung 11: Western Blot Analyse von FHL-1 von PASMC und Fibroblasten unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz). Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4). (A) Kontrollgruppe, (B) IPAH-Gruppe, (C) COPD-Gruppe jeweils PASMC. (D) COPD Fibroblasten.

3.2 S100 A4

3.2.1 S100 A4: RNA-Expression im Lungenhomogenat

Sowohl die IPAH- als auch die COPD-Gruppe zeigten eine vermehrte RNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p_{\text{IPAH}}=0,021$, $p_{\text{COPD}}=0,005$; **Abbildung 12**).

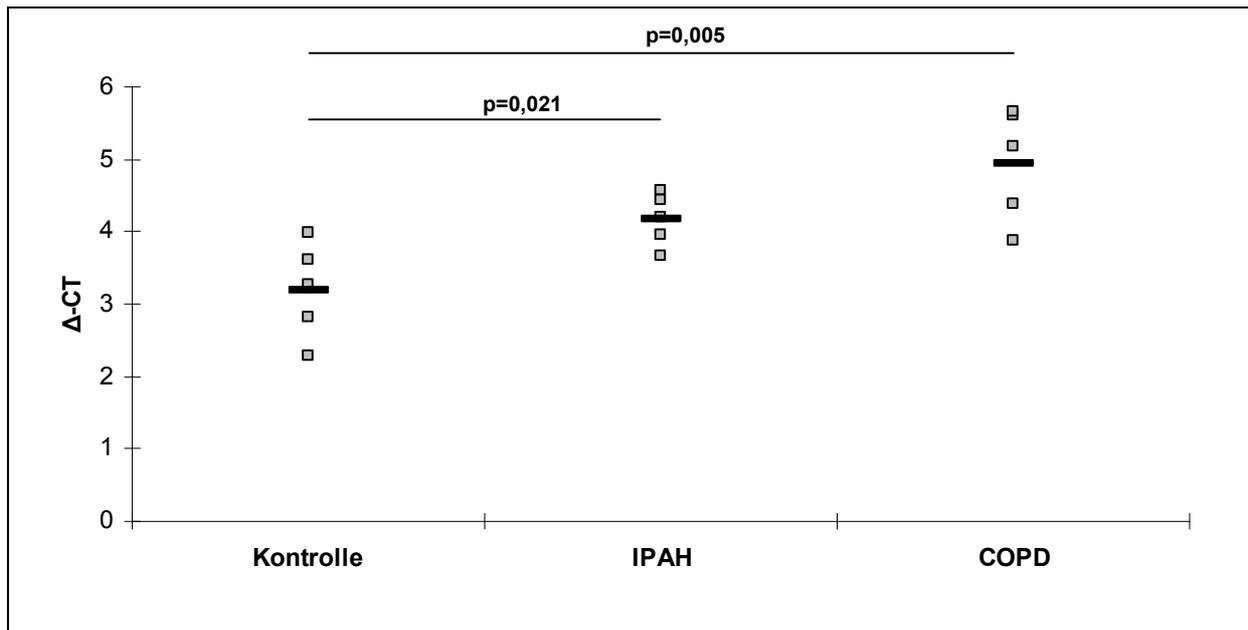


Abbildung 12: RNA-Expression von S100 A4 im Lungenhomogenat. Die Punkte geben die Einzelwerte der jeweiligen Gruppe an, der schwarze Balken den Mittelwert (n=5).

3.2.2 S100 A4: Proteinexpression im Lungenhomogenat

Weder zwischen der IPAH- noch der COPD-Gruppe zeigten sich unterschiedliche Proteinexpressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abbildung 13**).

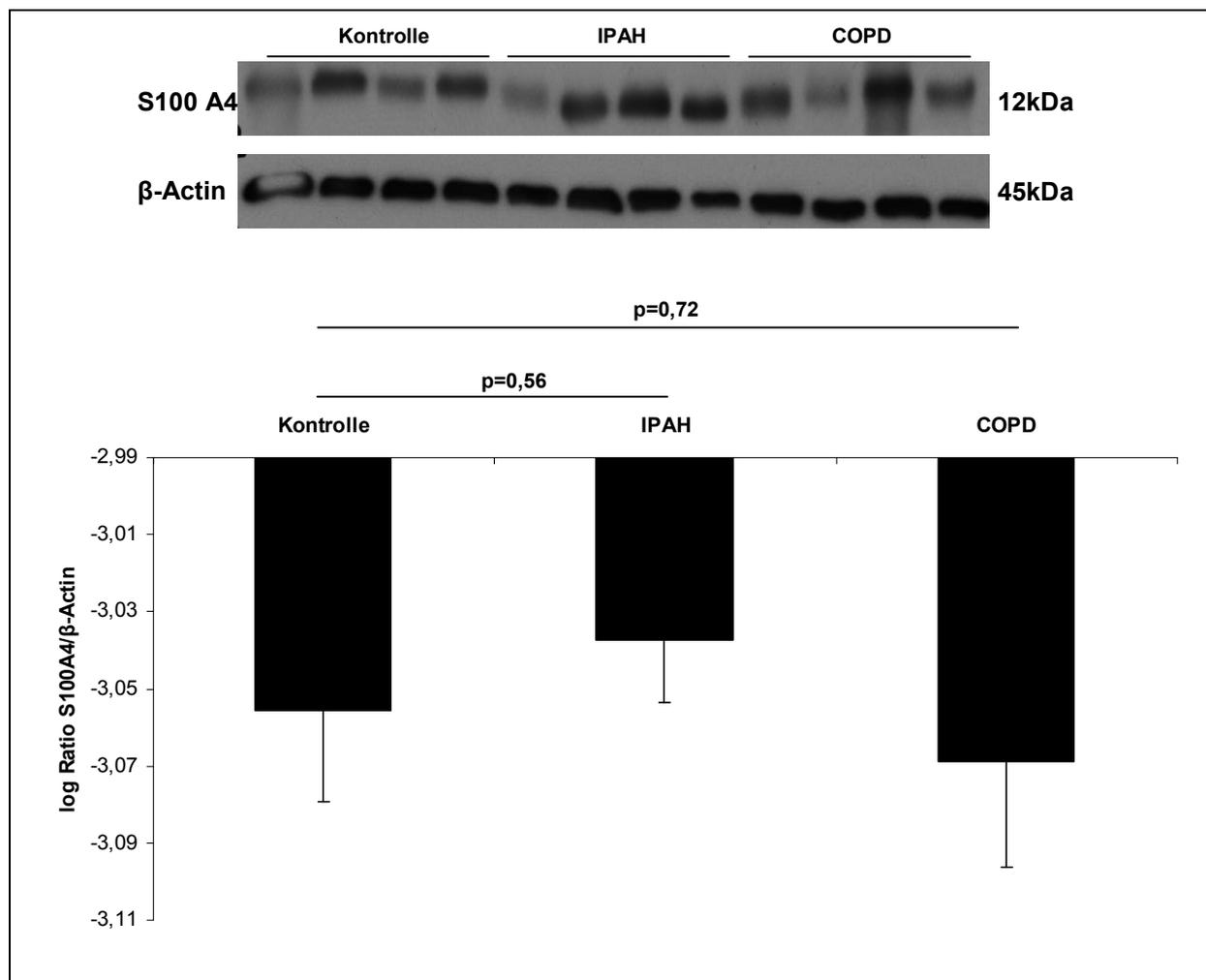


Abbildung 13: Western Blot Analyse von S100 A4 im Lungenhomogenat. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4).

3.2.3 S100 A4: Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Unter Normoxie zeigten sich bei den PASMC in der IPAH-Gruppe keine RNA-Expressionunterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (**Abbildung 14**). Eine verminderte RNA-Expression zeigte sich in der COPD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,058$). In Fibroblasten konnte kein Unterschied unter Normoxie gemessen werden. Die 24h Hypoxiestimulation zeigte in PASMC keinen Einfluss auf das RNA-Niveau von Kontroll- und IPAH-Gruppe. In der COPD-Gruppe war die RNA-Expression nach 24h Hypoxie erhöht ($p=0,011$). Bei den Fibroblasten zeigte sich nach 24h Hypoxiestimulation bei jeder Erkrankung und Kontrolle eine höhere RNA-Expression ($p_{\text{Kontrolle}}=0,042$, $p_{\text{IPAH}}=0,041$, $p_{\text{COPD}}=0,016$). Im Zellvergleich von PASMC zu Fibroblasten unter Normoxie zeigten sich in der IPAH- und der COPD-Gruppe erhöhte RNA-Expressionen ($p_{\text{IPAH}}=0,034$, $p_{\text{COPD}}=0,038$).

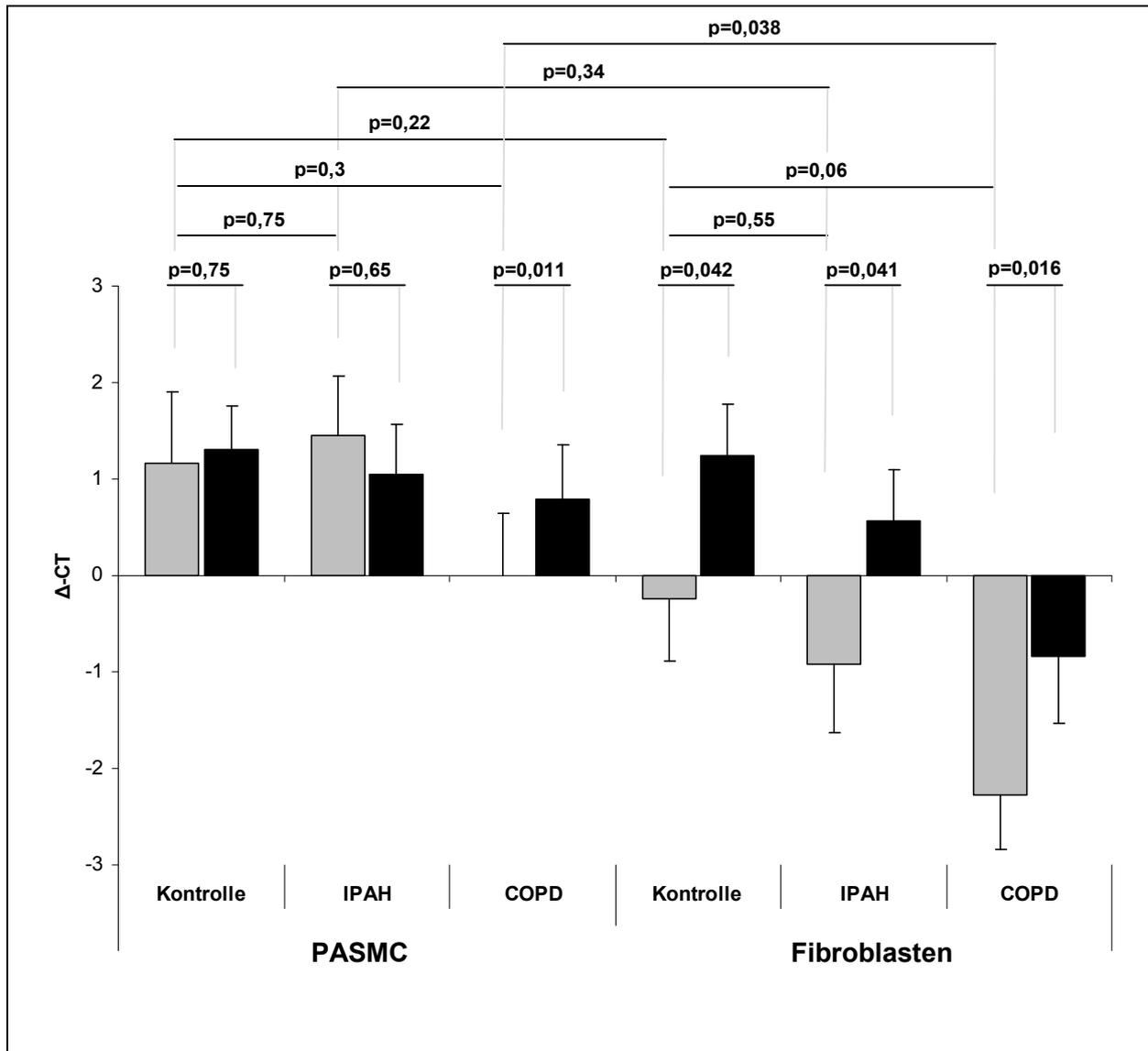


Abbildung 14: Vergleich der S100 A4 RNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen, unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz) sowie zwischen Zellarten. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der Δ -CT Werte an (n=5).

3.2.4 S100 A4: Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Es zeigte sich in beiden Zellarten von IPAH- und Kontrollgruppe eine zytoplasmatische Anfärbung. Eine Anfärbung in Zellen der COPD-Gruppe zeigte sich nicht. Eine starke Expression wurde bei den PASMC nachgewiesen (**Abbildung 15**). Die Fibroblasten zeigten auch bei hohen Antikörperkonzentrationen eine schwache Markierung. Ein Einfluss von 24h Hypoxie auf die Expression zeigte sich nur bei den Fibroblasten der IPAH-Gruppe. In der IPAH-Gruppe schien S100 A4 außerdem im Nucleus von PASMC und Fibroblasten lokalisiert.

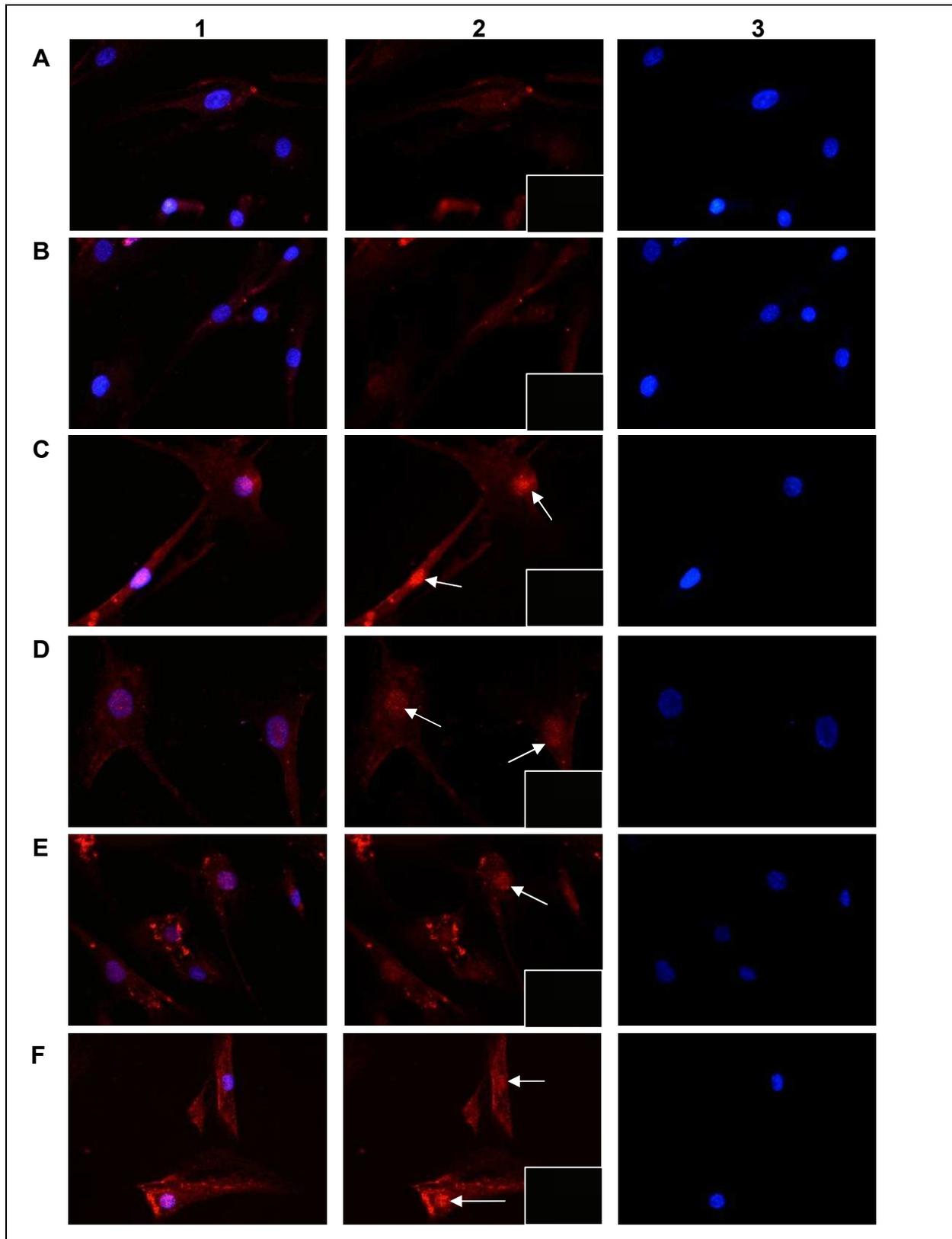


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von PASM und Fibroblasten in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) PASM CTR Spenderlunge Normoxie, (B) 24h Hypoxie. (C) PASM IPAH-Lunge Normoxie, (D) nach 24h Hypoxie. (E) Fibroblasten IPAH-Lunge Normoxie, (F) nach 24 Hypoxie. Die Pfeile in den Bildern weisen auf eine Expression von S100 A4 im Nucleus hin. Im Vergleich von E2 zu F2 zeigt sich eine stärkere Expression in F.

3.2.5 S100 A4: Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Nach 24h Hypoxiestimulation zeigte sich in PASMC der Kontrollgruppe eine vermehrte Proteinexpression ($p=0,048$; **Abbildung 16**). In Fibroblasten wurde keine Proteinexpression mittels Western Blot gemessen.

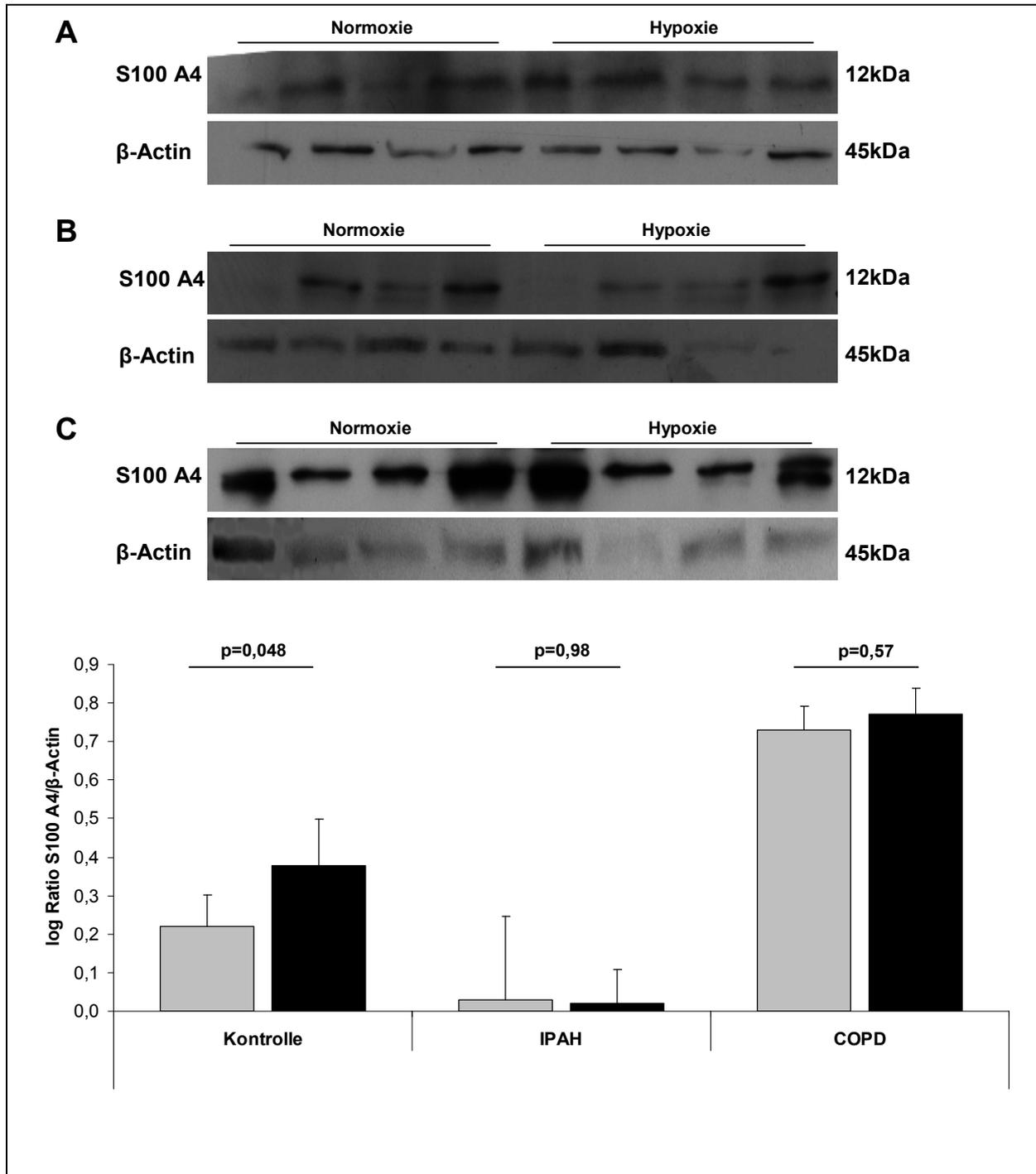


Abbildung 16: Vergleich der Proteinexpression von S100 A4 in PASMC unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz). Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an ($n=4$). (A) Kontrollgruppe, (B) IPA-Gruppe, (C) COPD-Gruppe.

3.3 BDNF

3.3.1 BDNF: RNA-Expression im Lungenhomogenat

Sowohl die IPAH- als auch die COPD-Gruppe zeigten vermehrte RNA-Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p_{\text{IPAH}}=0,006$, $p_{\text{COPD}}=0,008$; **Abbildung 17**).

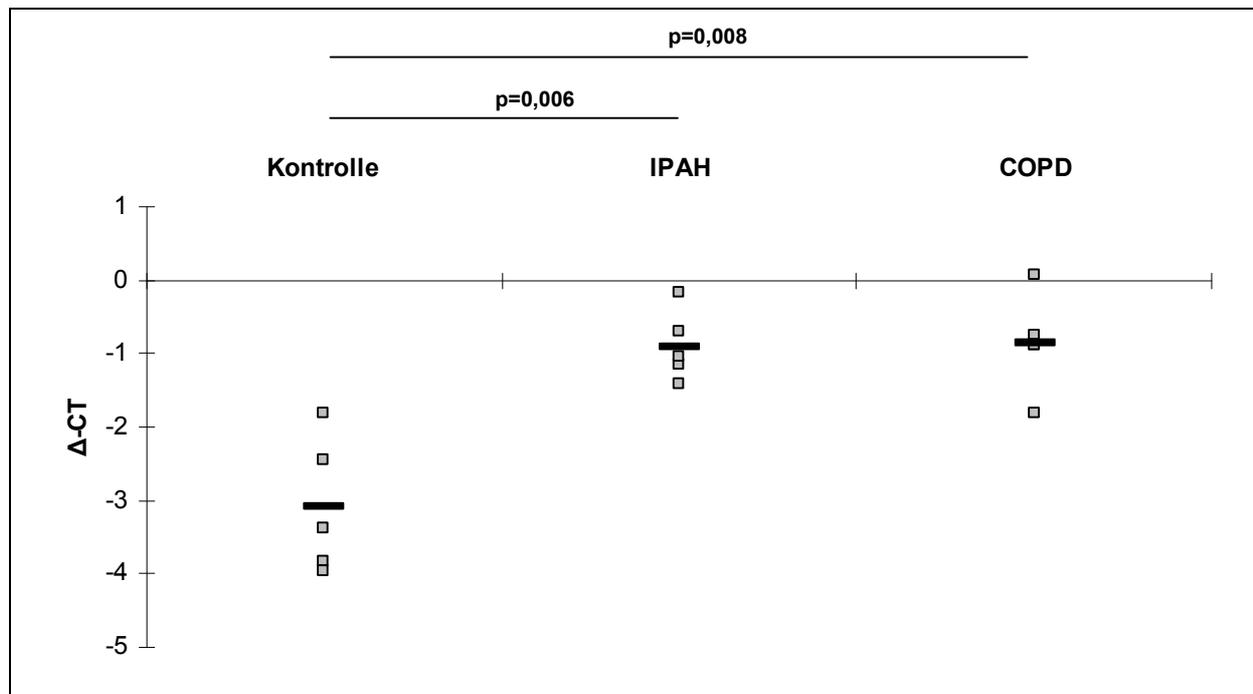


Abbildung 17: RNA-Expression von BDNF im Lungenhomogenat. Die Punkte geben die Einzelwerte der jeweiligen Gruppe an, der schwarze Balken den Mittelwert (n=5).

3.3.2 BDNF: Proteinexpression im Lungenhomogenat

Im Western Blot zeigten sich zwei spezifische Banden für BDNF. Zum einen die pro-BDNF Bande bei ca. 35kDa, zum anderen die BDNF Bande bei ca. 20kDa. Beide Formen zeigten individuell sehr variable Proteinexpressionen zwischen der IPAH-, COPD-, und der Kontrollgruppe (**Abbildung 18**).

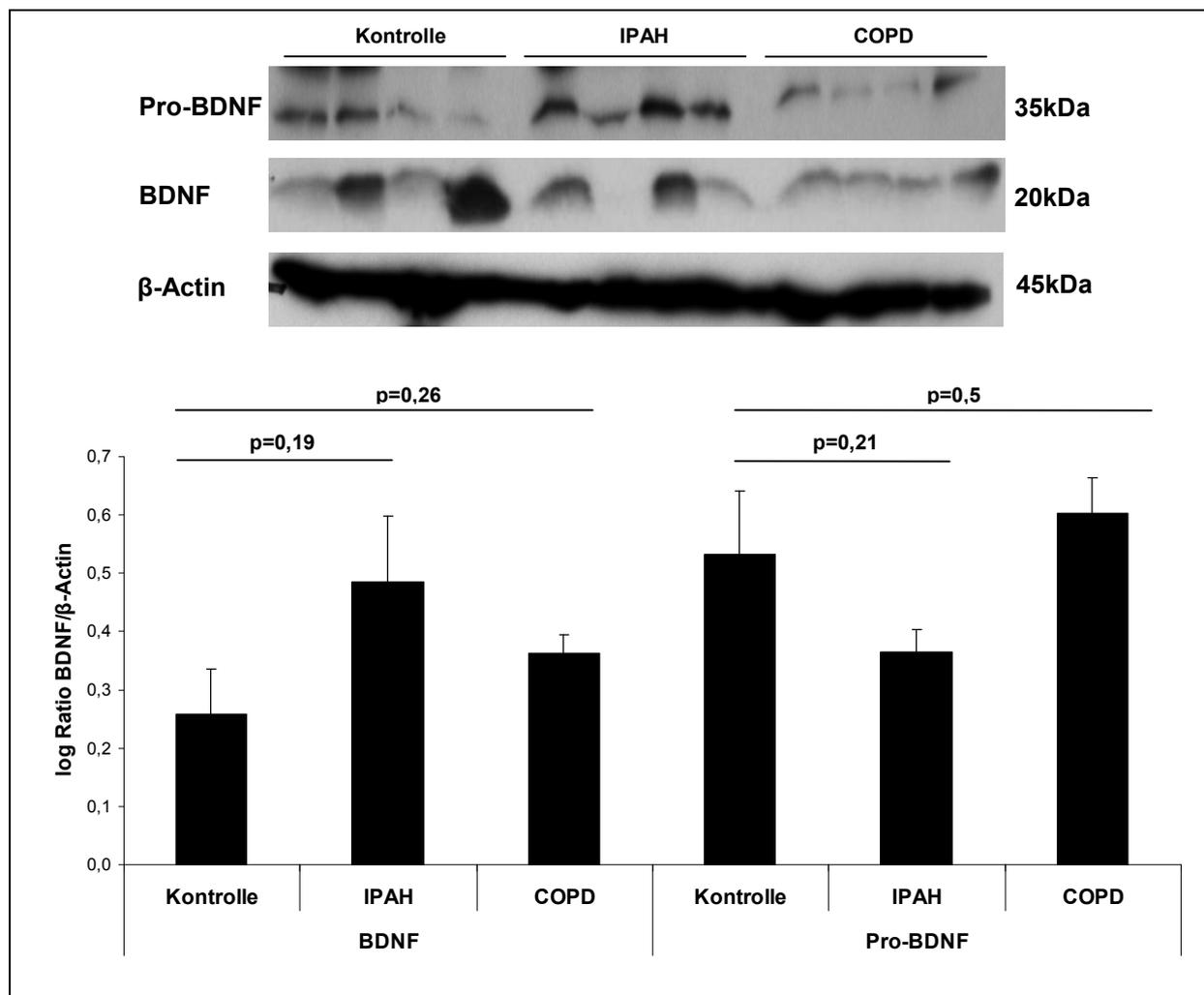


Abbildung 18: Western Blot Analyse von BDNF im Lungenhomogenat. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4). In der Western Blot Analyse zeigten sich zwei spezifische Banden, für BDNF (20kDa) und Pro-BDNF (35kDa).

3.3.3 BDNF: Differentielle RNA-Expression in PASC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Es wurden weder bei den PASC noch bei den Fibroblasten unterschiedliche RNA-Expressionen im Vergleich von Erkrankungsgruppe zu Kontrollgruppe gemessen (**Abbildung 19**). Die intraindividuellen Unterschiede nach 24h Hypoxiestimulation sahen wie folgt aus: bei den PASC hatte 24h Hypoxie keinen Einfluss auf das RNA-Niveau von Kontroll-, IPAH-, und COPD-Gruppe. Bei den Fibroblasten zeigte sich nach 24h Hypoxie bei jeder Erkrankung und Kontrolle eine erhöhte Expression ($p_{\text{Kontrolle}}=0,049$, $p_{\text{IPAH}}=0,026$, $p_{\text{COPD}}=0,03$). PASC im Vergleich zu Fibroblasten zeigten in der COPD-Gruppe sowohl unter Normoxie ($p=0,012$), als auch nach 24h Hypoxiestimulation ($p=0,034$) erhöhte Expression.

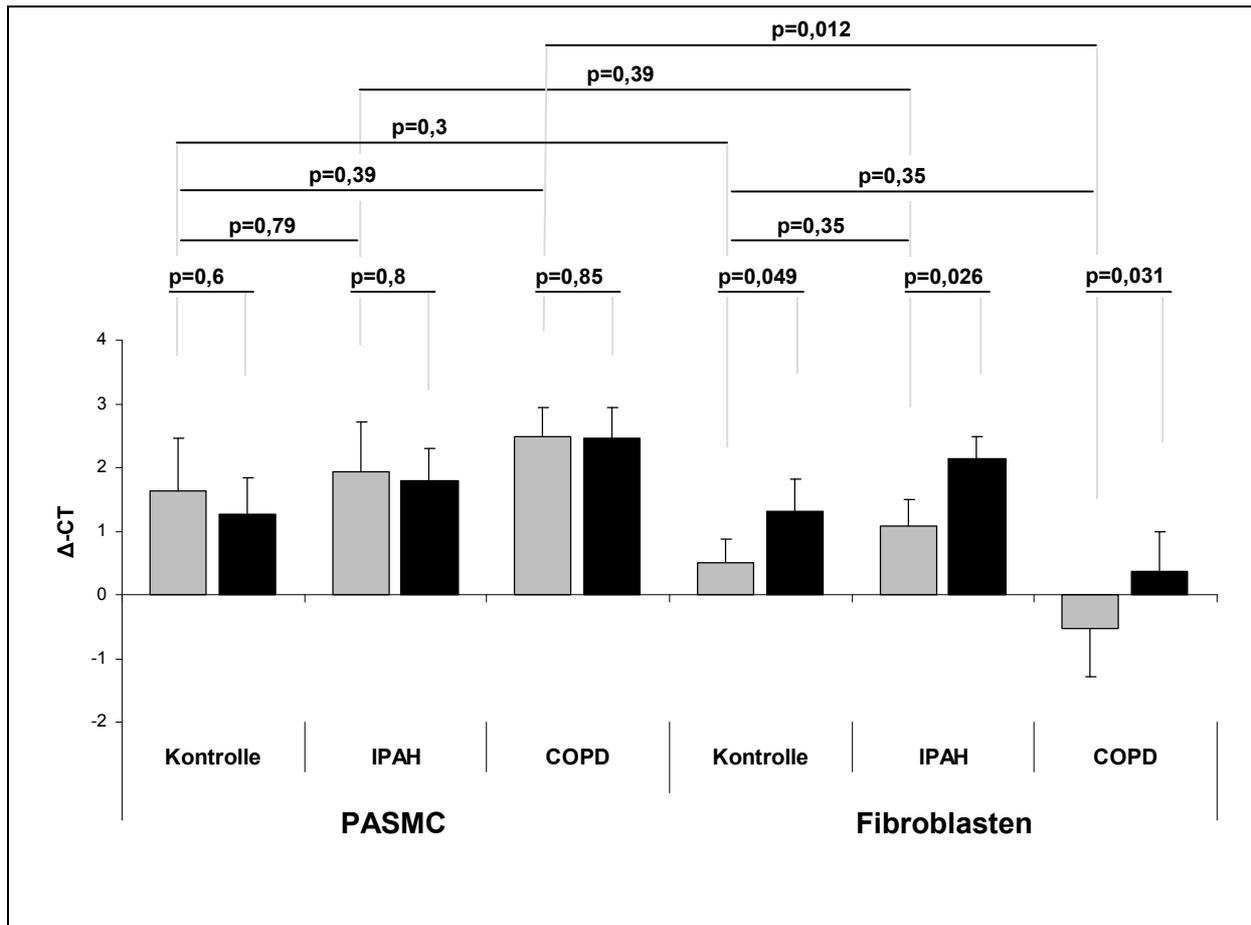


Abbildung 19: Vergleich der BDNF RNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen, unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz) sowie zwischen Zellarten. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der Δ -CT Werte an (n=5).

3.3.4 BDNF: Lokalisation und Expression in PSMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

In allen untersuchten Gruppen wurde eine zytoplasmatische Lokalisation gezeigt. Nach 24h Hypoxiestimulation wurde nur in Fibroblasten der COPD-Gruppe eine vermehrte BDNF-Expression gemessen (**Abbildung 20**). Dies korreliert mit der RNA-Expression (siehe 3.3.1).

3.3.5 BDNF: Proteinexpression in PSMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Auch nach mehrmaligen Versuchsansätzen, unter Erhöhung der Antikörperkonzentration und Verlängerung der Expositionszeit, wurde keine BDNF-Proteinexpression mittels WB in PSMC und Fibroblasten gemessen. Eine Detektion derselben Membran mit Antikörpern gegen FHL-1, S100 A4, TrkB, TSP-1 und β -Actin verlief positiv.

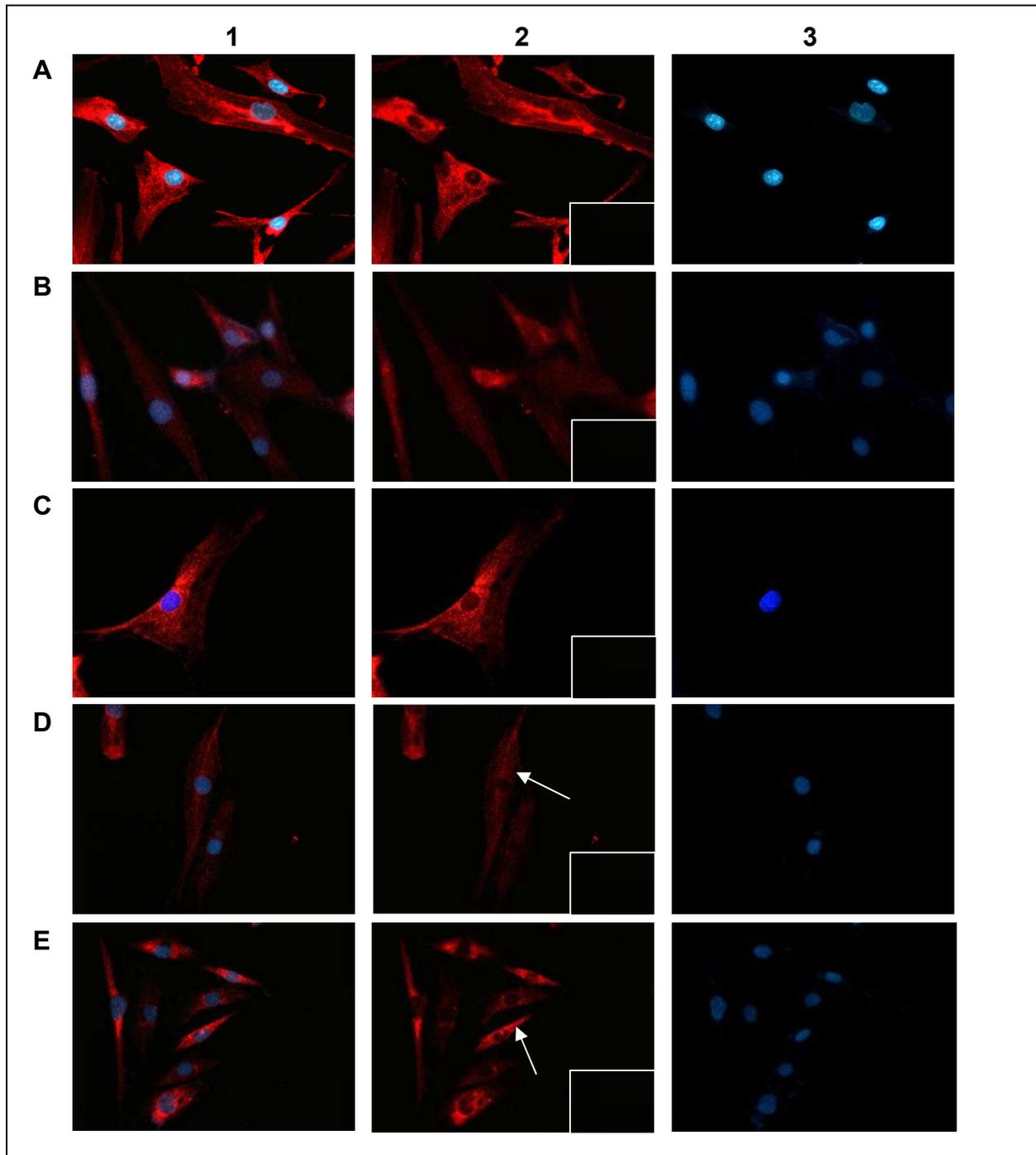


Abbildung 20: Immunfluoreszenzfärbung von PSMC und Fibroblasten in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) PSMC Kontrollspenderlunge Normoxie. (B) Fibroblasten Kontrollspenderlunge Normoxie. (C) Fibroblasten IPAH-Lunge Normoxie. (D) Fibroblasten COPD-Lunge Normoxie, (E) nach 24h Hypoxie. Im Vergleich von D2 zu E2 (siehe Pfeile) zeigt sich eine vermehrte Expression in (E).

3.4 TrkB

3.4.1 TrkB: RNA-Expression im Lungenhomogenat

Sowohl die IPAH- als auch die COPD-Gruppe zeigten vermehrte RNA-Expressionen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p_{\text{IPAH}}=0,012$, $p_{\text{COPD}}=0,0006$; **Abbildung 21**).

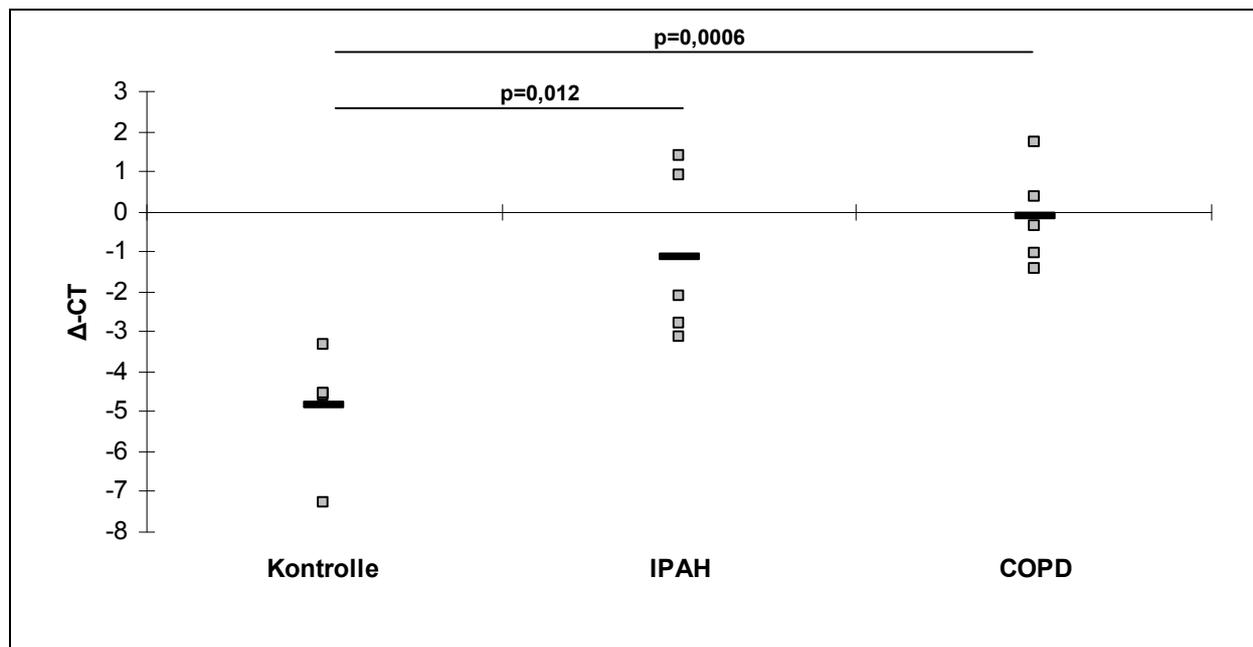


Abbildung 21: RNA-Expression von TrkB im Lungenhomogenat. Die Punkte geben die Einzelwerte der jeweiligen Gruppe an, der schwarze Balken den Mittelwert ($n=5$).

3.4.2 TrkB: Proteinexpression im Lungenhomogenat

Weder in der IPAH- noch in der COPD-Gruppe zeigte sich eine unterschiedliche Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der IPAH-Gruppe traten zusätzliche Proteinbanden auf, welche bei der Kontroll- und der COPD-Gruppe nicht nachweisbar waren (**Abbildung 22**).

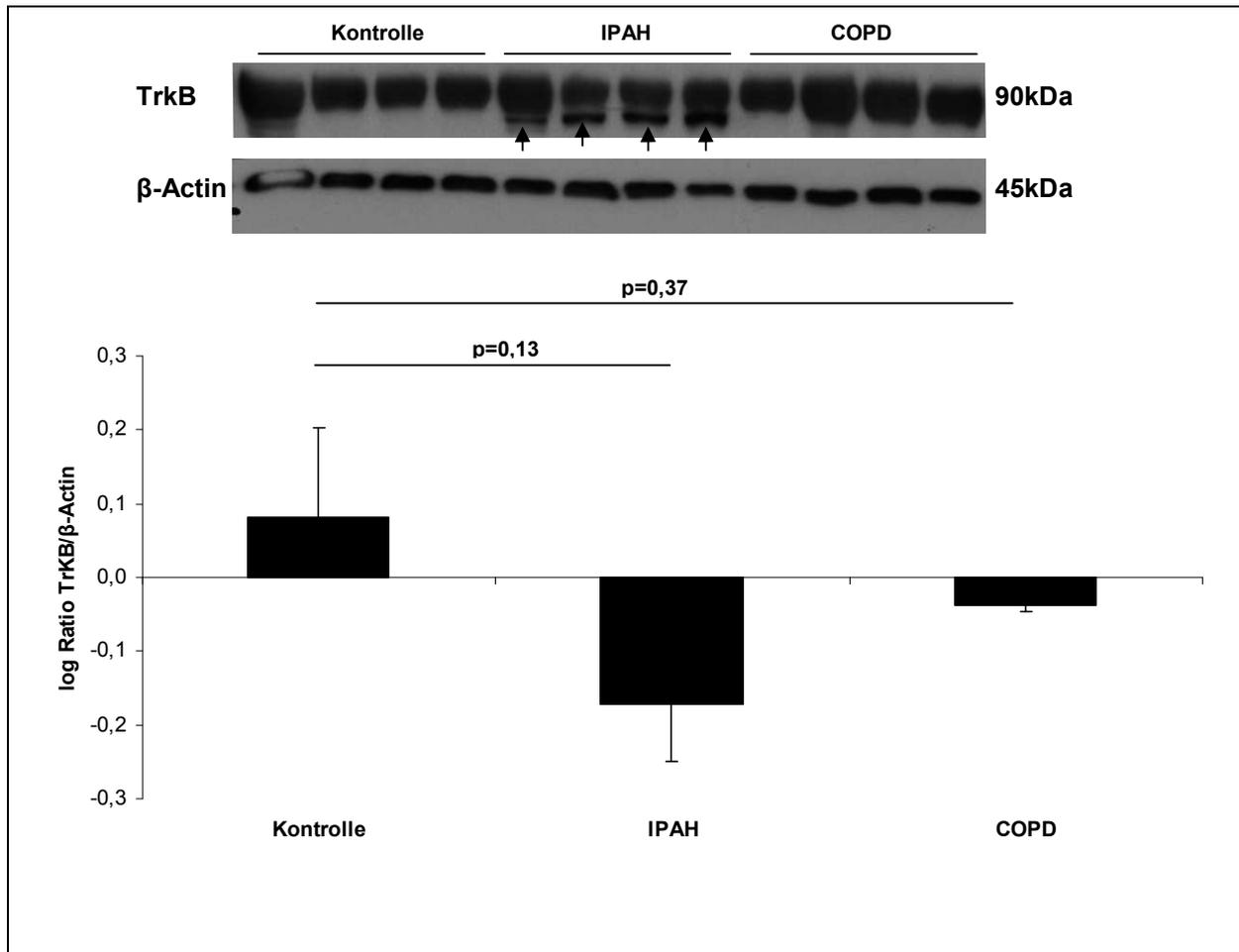


Abbildung 22: Western Blot Analyse von TrkB im Lungenhomogenat. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4). In der IPAH-Gruppe zeigten sich Doppelbanden (siehe Pfeile).

3.4.3 TrkB: Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Unter Normoxie zeigte sich bei den PASMC in der IPAH-Gruppe eine vermehrte RNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (p=0,03; **Abbildung 23**). In Fibroblasten konnte kein Unterschied unter Normoxie gemessen werden. Die 24h Hypoxiestimulation zeigte in PASMC keinen Einfluss auf das RNA-Niveau von Kontroll- und IPAH-Gruppe. In der COPD-Gruppe bestand eine vermehrte RNA-Expression nach 24h Hypoxie (p=0,019). Bei den Fibroblasten zeigten sich nach 24h Hypoxie in keiner Gruppe unterschiedliche RNA-Expressionen. Im Vergleich von PASMC zu Fibroblasten zeigte sich unter Normoxie in der IPAH-Gruppe eine verminderte Expression in den Fibroblasten (p=0,002).

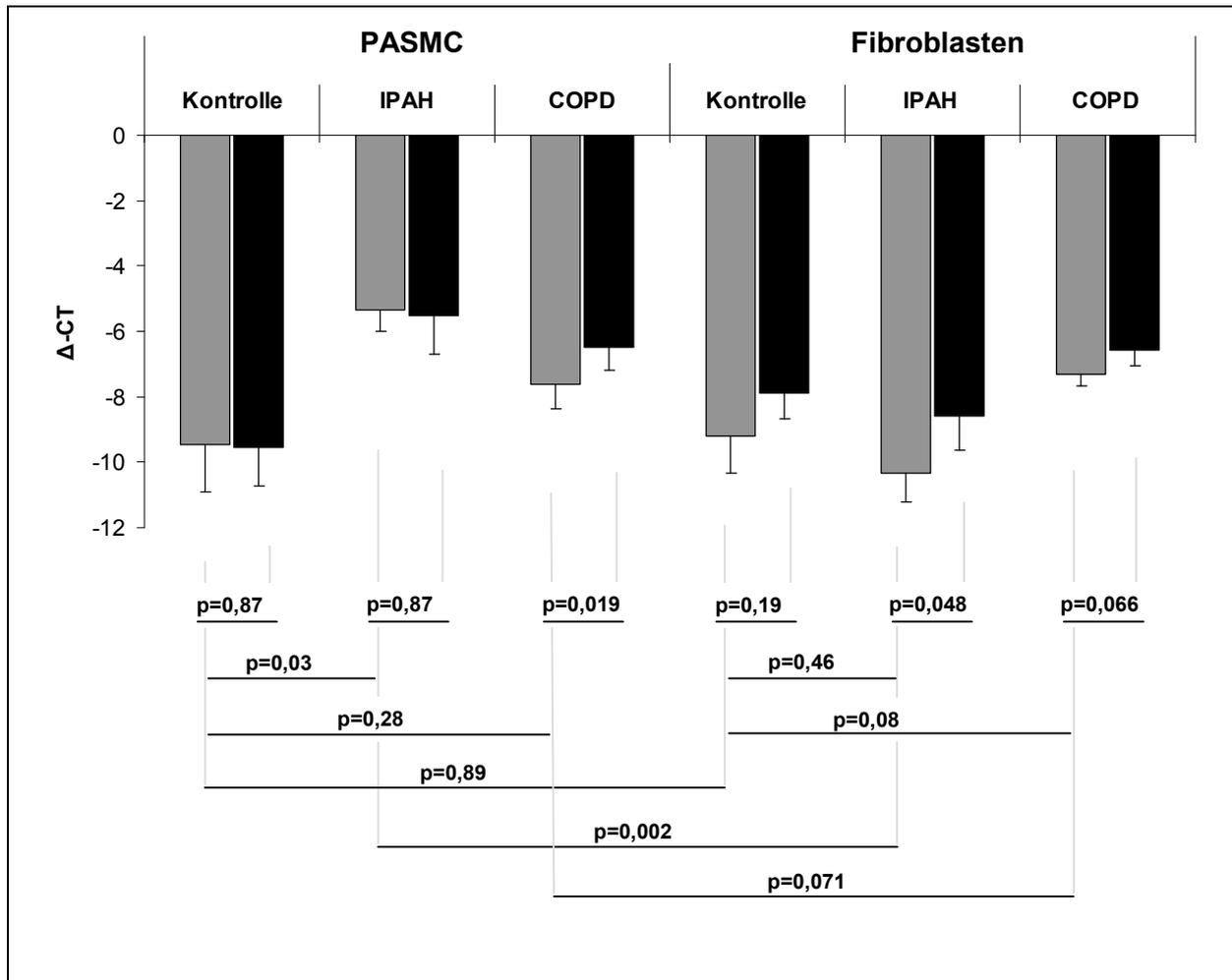


Abbildung 23: Vergleich der TrkB RNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen, unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz) sowie zwischen Zellarten. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der Δ -CT Werte an (n=5).

3.4.4 TrkB: Lokalisation und Expression in PSMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

In allen untersuchten Gruppen wurde eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung gezeigt. Ein Einfluss von 24h Hypoxie auf die TrkB-Expression wurde in keiner Erkrankung und Zellart nachgewiesen (**Abbildung 24**).

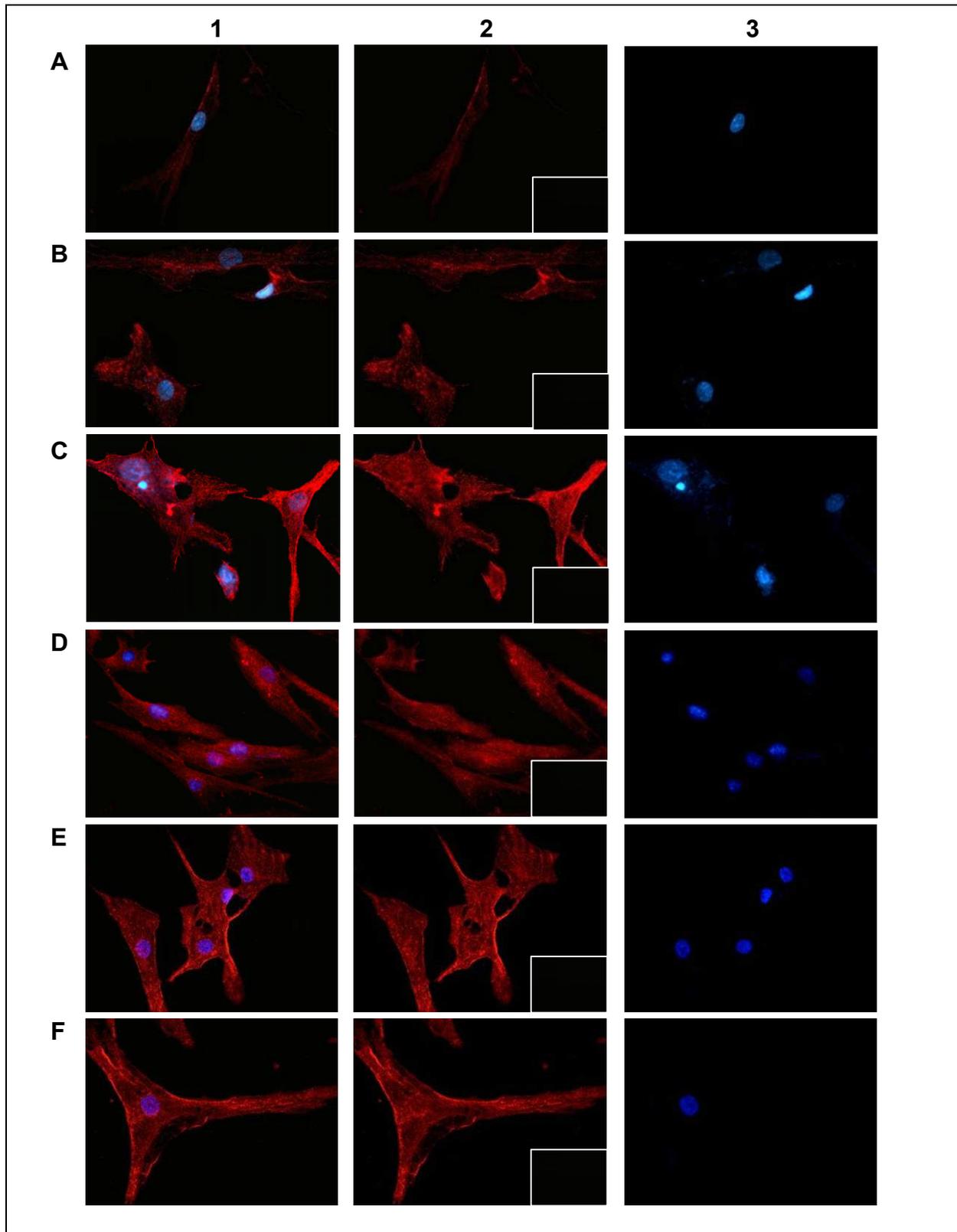


Abbildung 24: Immunfluoreszenzfärbung von PASM und Fibroblasten in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) PASM Kontrollspenderlunge Normoxie. (B) PASM IPAH-Lunge Normoxie. (C) PASM COPD-Lunge Normoxie. (D) Fibroblasten Kontrollspenderlunge Normoxie. (E) Fibroblasten IPAH-Lunge Normoxie, (F) nach 24h Hypoxie.

3.4.5 TrkB: Proteinexpression in PASM C und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Nur bei den PASM C der COPD-Gruppe wurde eine Hochregulation nach 24h Hypoxie gemessen ($p=0,02$). Dieses Ergebnis korreliert mit den RNA-Ergebnissen aus 3.4.3. In allen übrigen Gruppen wurden keine Unterschiede im Vergleich von Normoxie zu 24h Hypoxie gemessen (**Abbildung 25 und 26**).

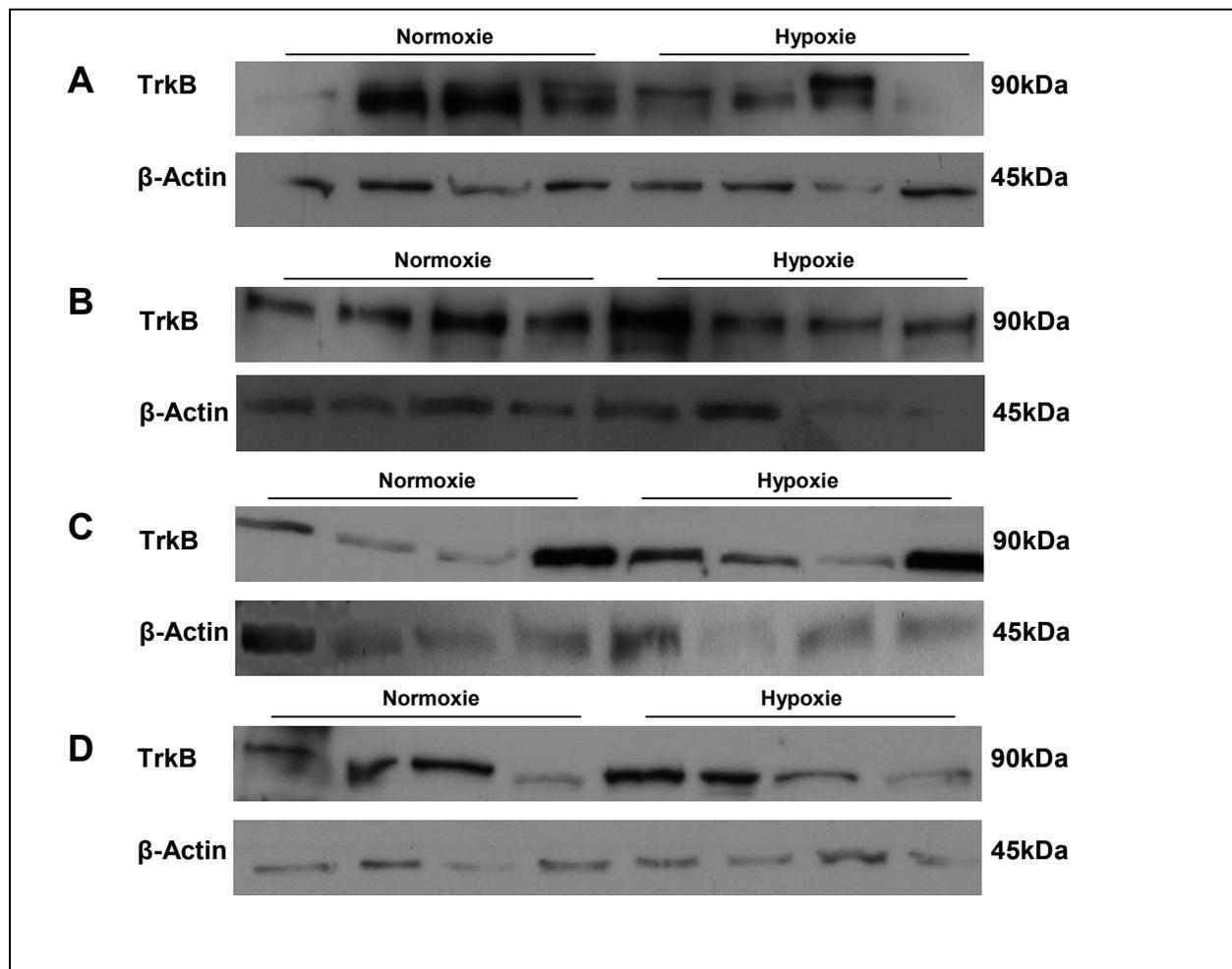


Abbildung 25: Vergleich der Proteinexpression von TrkB in PASM C Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation. (A) Kontrollgruppe, (B) IPAH-Gruppe, (C) COPD-Gruppe jeweils PASM C. (D) COPD Fibroblasten.

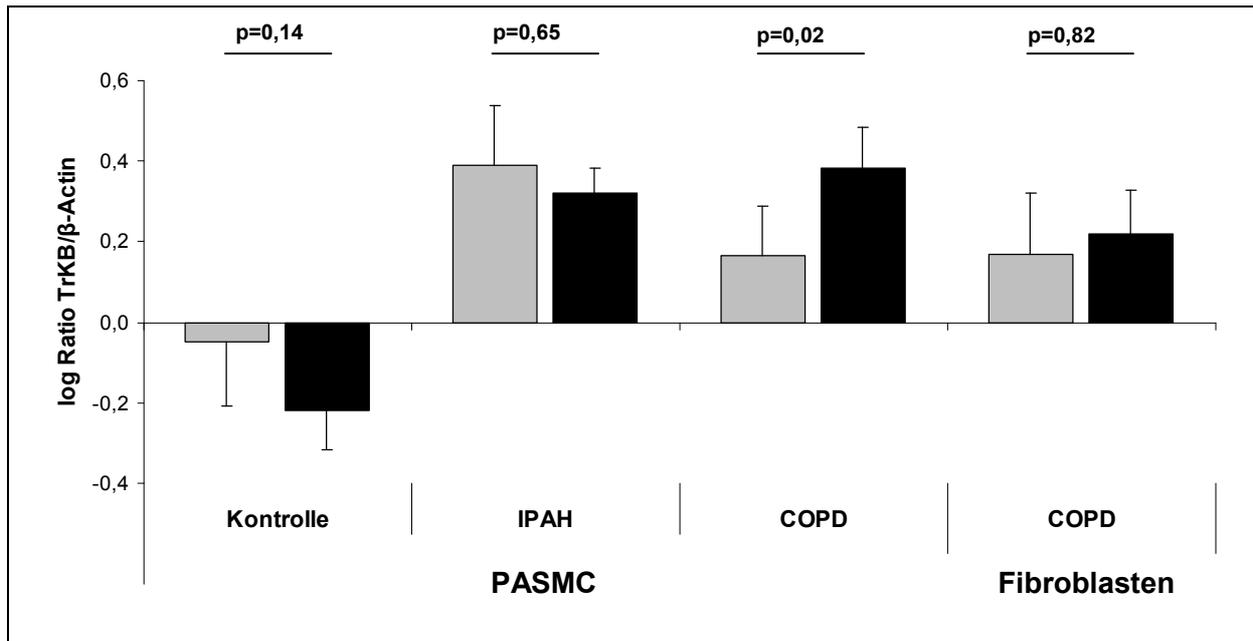


Abbildung 26: Vergleich der Proteinexpression von TrkB in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz). Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4).

3.5 TSP-1

3.5.1 TSP-1: RNA-Expression im Lungenhomogenat

Es wurden keine RNA-Expressionsunterschiede in der IPAH- und COPD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (**Abbildung 27**).

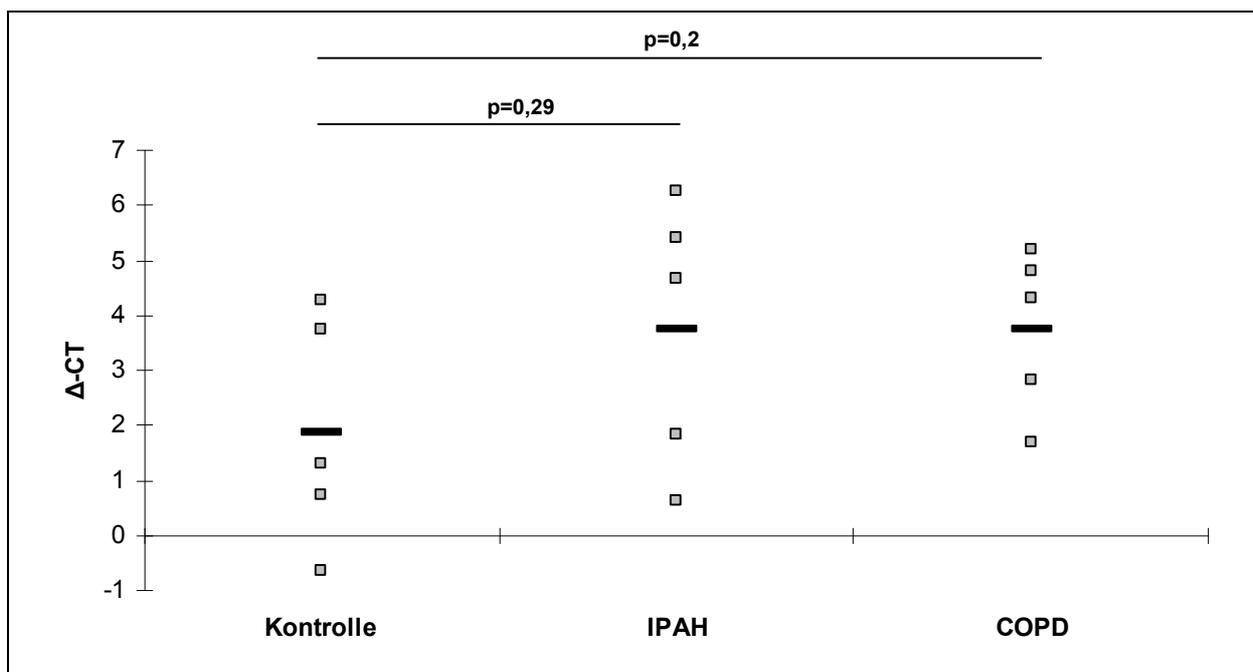


Abbildung 27: TSP-1 spezifische RNA-Expression im Lungenhomogenat. Die Punkte geben die Einzelwerte der jeweiligen Gruppe an, der schwarze Balken den Mittelwert (n=5).

3.5.2 TSP-1: Proteinexpression im Lungenhomogenat

Im Vergleich von IPAH- zur Kontrollgruppe wurde kein Unterschied gezeigt. Die COPD-Gruppe zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine vermehrte Proteinexpression ($p=0,02$, **Abbildung 28**).

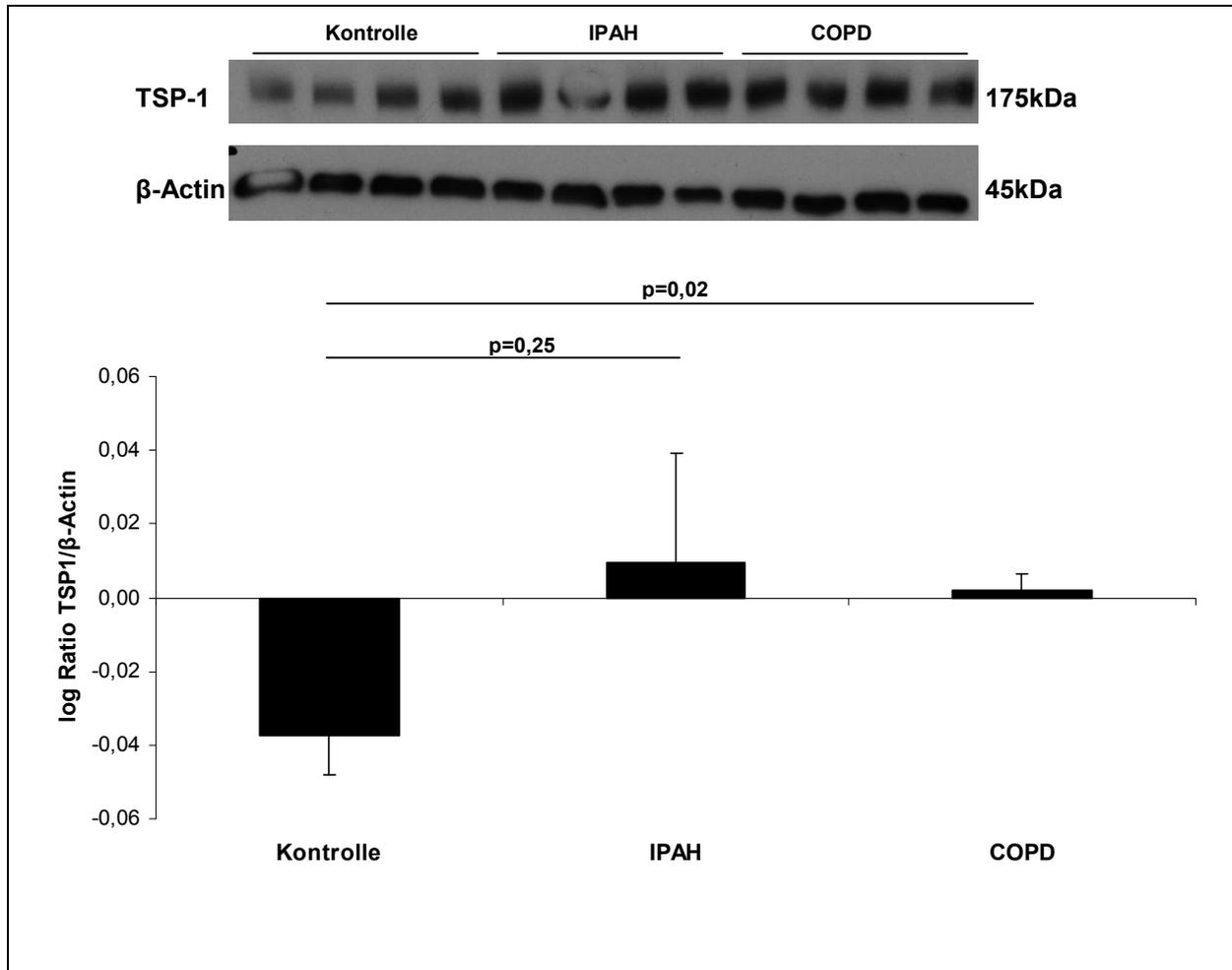


Abbildung 28: Western Blot Analyse von TSP-1 im Lungenhomogenat. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an ($n=4$).

3.5.3 TSP-1: Differentielle RNA-Expression in PASMIC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Unter Normoxie wurden bei den PASMIC keine RNA-Expressionunterschiede von Erkrankungsgruppe zur Kontrollgruppe gemessen (**Abbildung 29**). Bei den Fibroblasten fand sich in der COPD-Gruppe eine verminderte RNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,07$). Nach 24h Hypoxiestimulation wurde in PASMIC der Kontrollgruppe eine verminderte Expression gezeigt ($p=0,032$). Bei den Fibroblasten wurde sowohl in der IPAH- als auch in der COPD-Gruppe eine vermehrte RNA-Expression gemessen ($p_{\text{IPA}}=0,018$, $p_{\text{COPD}}=0,005$) Im Zellvergleich von PASMIC zu Fibroblasten zeigte sich unter Normoxie eine verminderte RNA-Expression in den Fibroblasten der COPD-Gruppe ($p=0,01$).

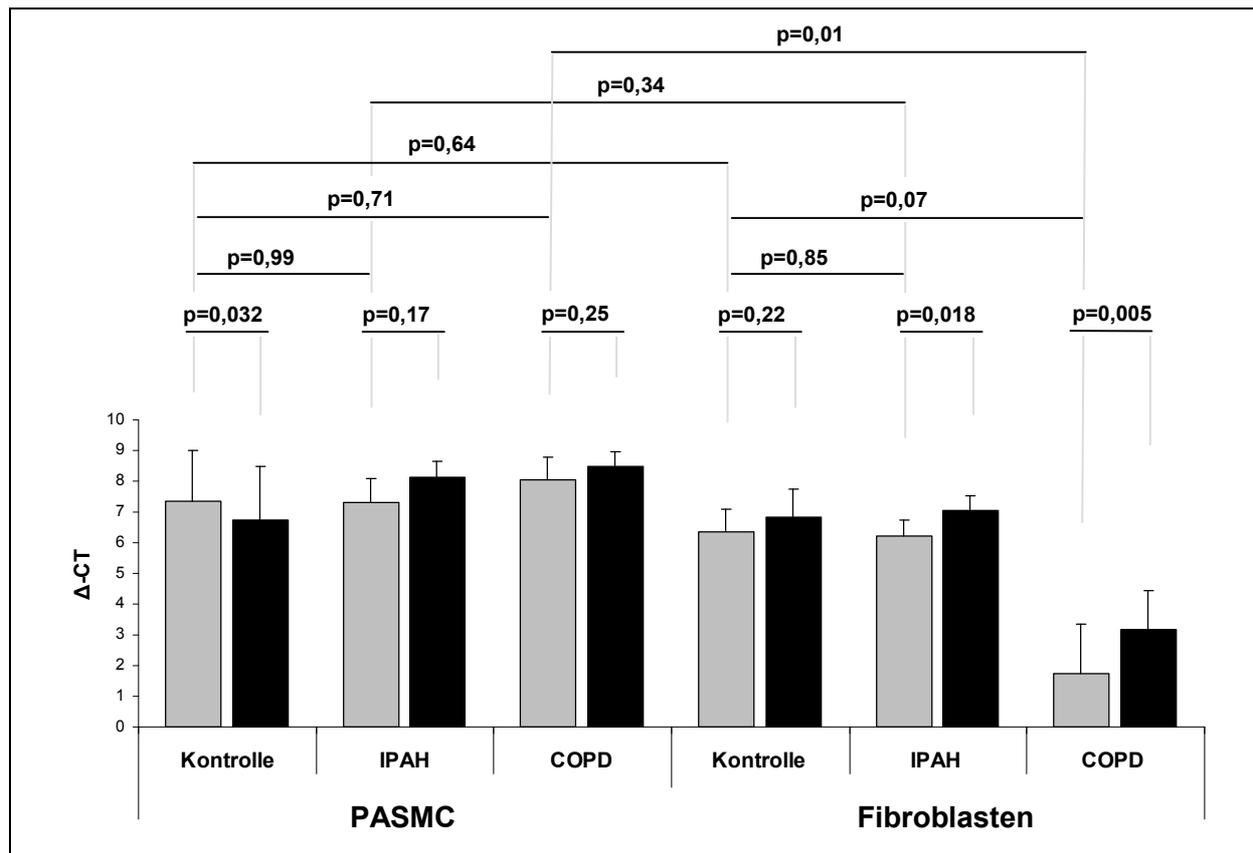


Abbildung 29: Vergleich der TSP-1 RNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen, unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz) sowie zwischen Zellarten. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der Δ -CT Werte an (n=5).

3.5.4 TSP-1: Lokalisation und Expression in PSMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Nur in den PSMC der Kontrollgruppe und den Fibroblasten der IPAH-Gruppe wurde eine zytoplasmatische Anfärbung gezeigt. Eine Änderung der Fluoreszenzintensität nach 24 h Hypoxiestimulation wurde nicht festgestellt (**Abbildung 30**). In den Zellen der COPD-Gruppe fand sich keine TSP-1-Expression.

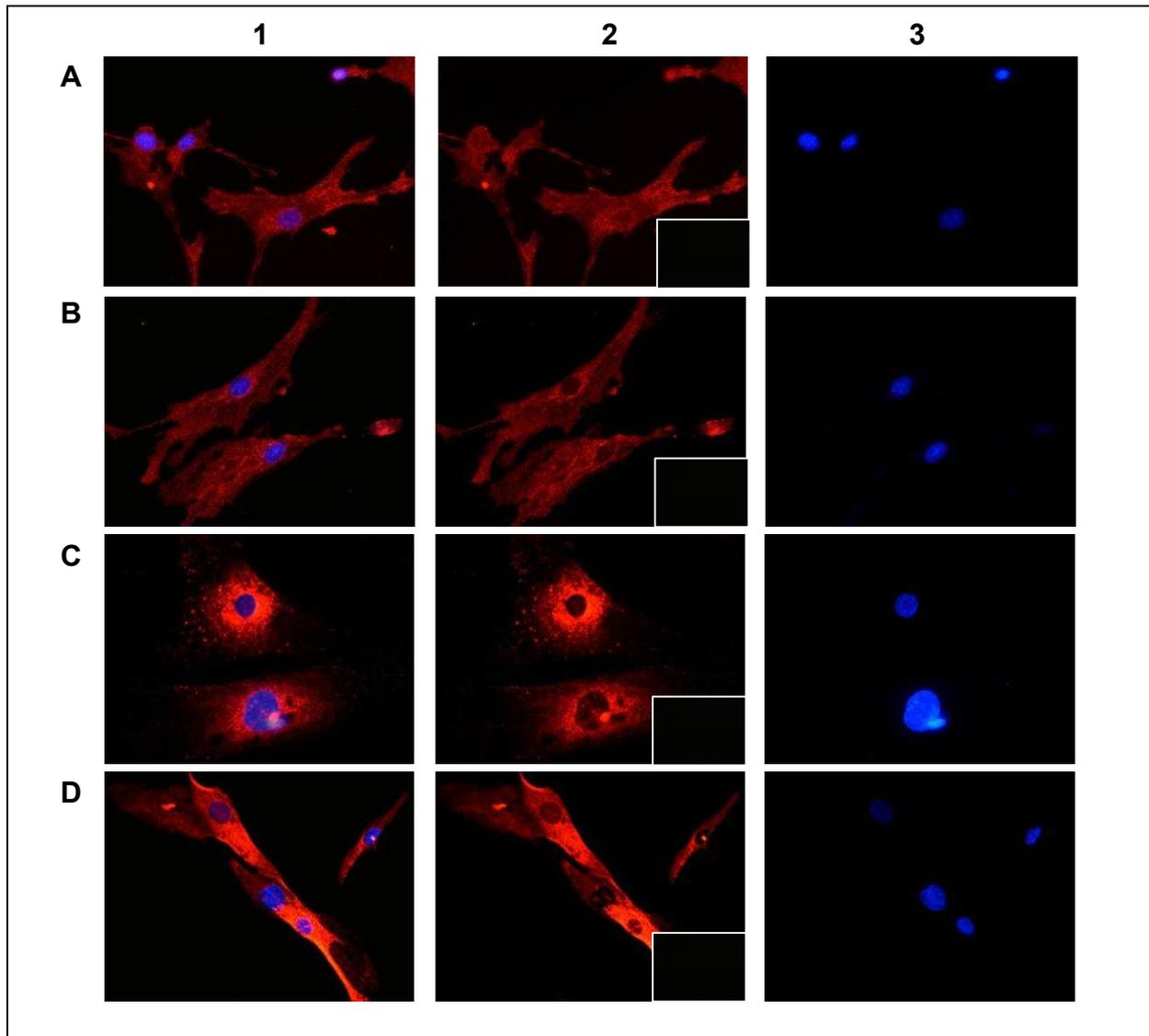


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung von PASC und Fibroblasten in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) PASC Kontrollspenderlunge Normoxie, (B) nach 24h Hypoxie. (C) Fibroblasten IPAHLunge Normoxie, (D) nach 24h Hypoxie.

3.5.5 TSP-1: Proteinexpression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Es zeigte sich eine deutliche individuelle Streuung der Messwerte in Fibroblasten der COPD-Gruppe zwischen Normoxie und 24h Hypoxie (**Abbildung 31**). In anderen Gruppen sowie in PASMC wurden keine Proteinexpressionen von TSP-1 mittels Western Blot gemessen.

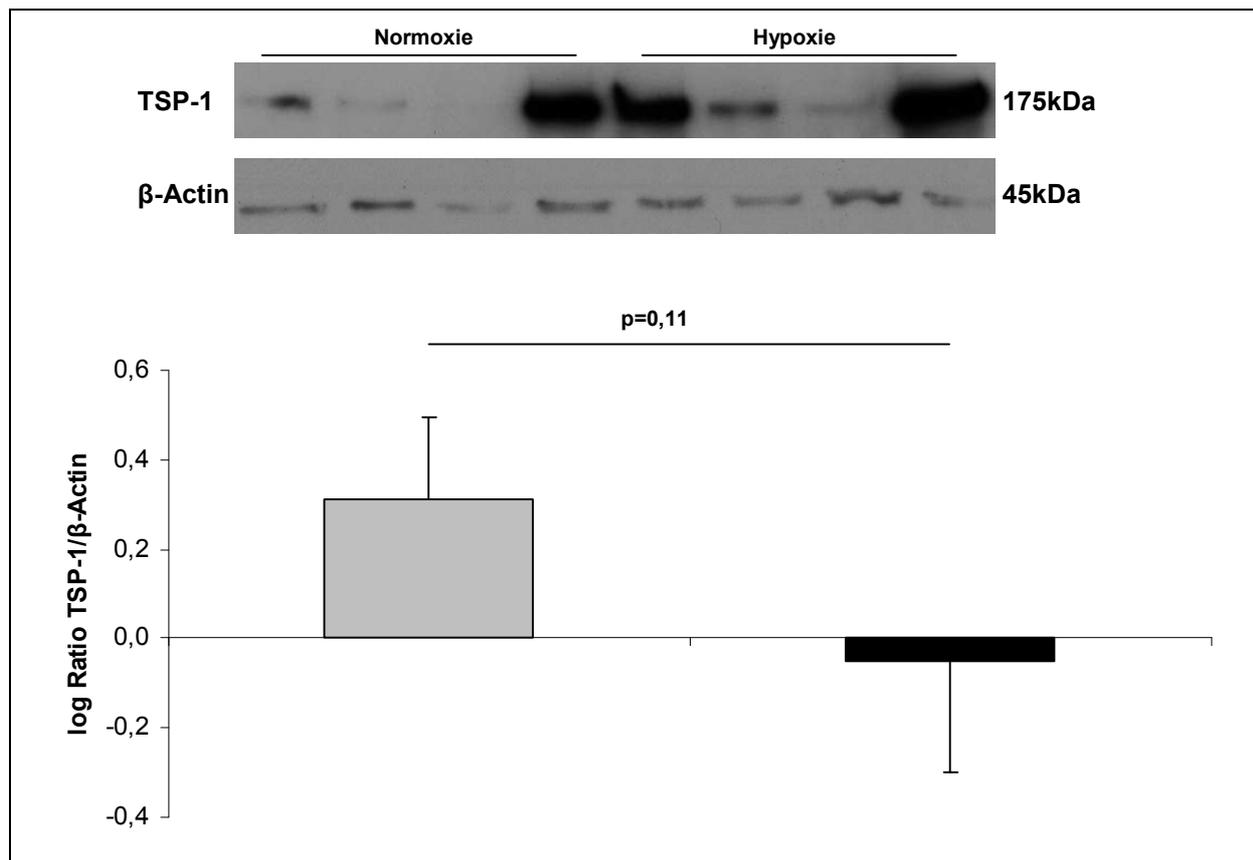


Abbildung 31: Vergleich der Proteinexpression von TSP-1 in Fibroblasten unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz). Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an (n=4).

3.6 CD36

3.6.1 CD36: RNA-Expression im Lungenhomogenat

Es wurden keine RNA-Expressionsunterschiede in der IPAH- und COPD-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen (**Abbildung 32**).

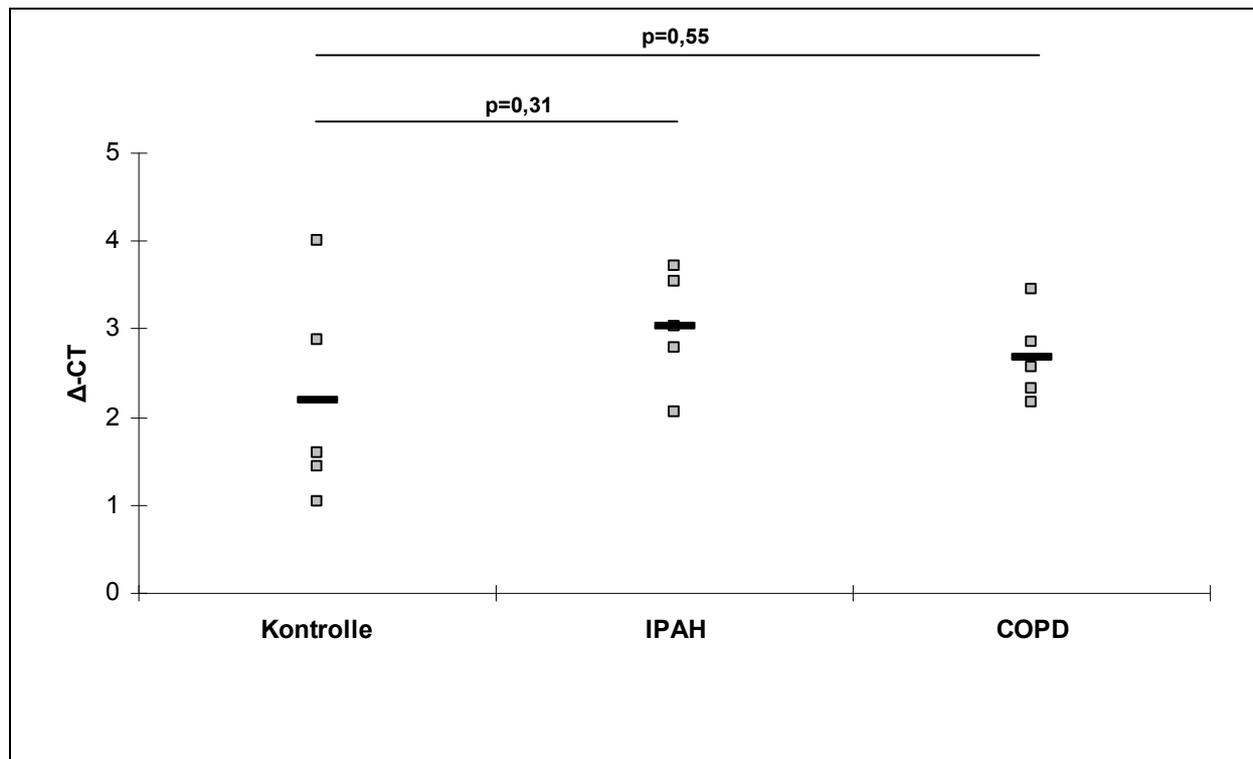


Abbildung 32: RNA-Expression von CD36 im Lungenhomogenat. Die Punkte geben die Einzelwerte der jeweiligen Gruppe an, der schwarze Balken den Mittelwert (n=5).

3.6.2 CD36: Proteinexpression im Lungenhomogenat

Im Vergleich von Kontrollgruppe zur COPD-Gruppe wurde kein Unterschied gezeigt. Die IPAH-Gruppe zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine vermehrte Proteinexpression ($p=0,02$; **Abbildung 33**).

3.6.3 CD36: Differentielle RNA-Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Unter Normoxie zeigte sich bei den PASMC im Vergleich von IPAH- zur Kontrollgruppe eine vermehrte RNA-Expression ($p=0,027$). Der restliche Vergleich von Erkrankungsgruppen zur Kontrollgruppe unter Normoxie zeigte weder in den PASMC noch in den Fibroblasten eine unterschiedliche RNA-Expression. Nach 24h Hypoxiestimulation zeigte sich nur bei den Fibroblasten der COPD-Gruppe eine

erhöhte Expression ($p=0,023$). Der Zellvergleich zwischen PASMC und Fibroblasten zeigte keine RNA-Expressionsunterschiede (**Abbildung 34**).

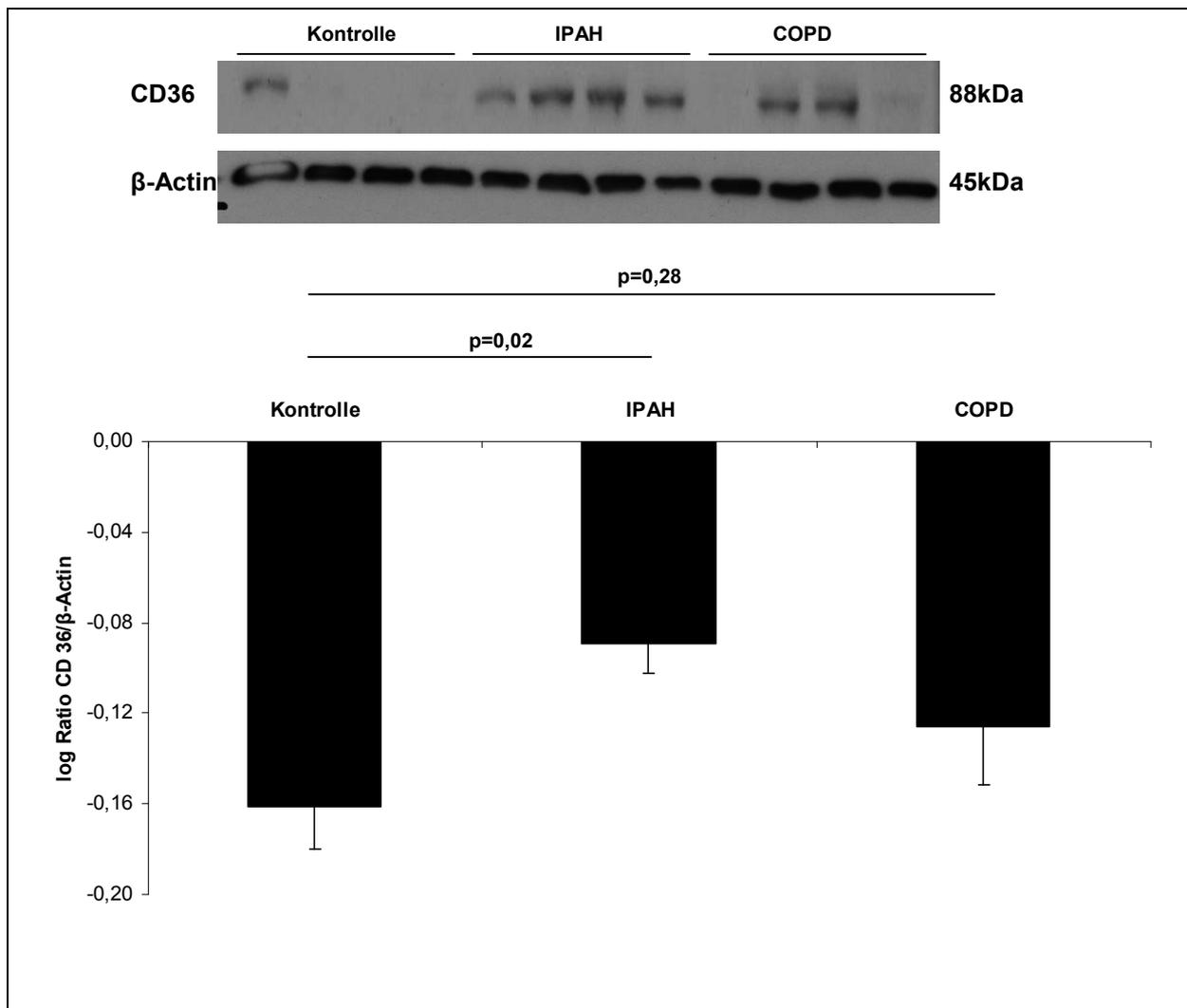


Abbildung 33: Western Blot Analyse von CD36 im Lungenhomogenat. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der log Ratios von untersuchtem Protein zu β -Actin an ($n=4$).

3.6.4 CD36: Lokalisation und Expression in PASMC und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

In allen untersuchten Gruppen wurden nur die Fibroblasten positiv gefärbt. Die PASMC der Kontroll-, der IPAH-, und der COPD-Gruppe waren auch nach mehrmaligem Versuchsansatz nicht markiert. Die Anfärbung der Zellen war auf das Zytoplasma lokalisiert, mit einer diffus fleckenförmigen Verteilung. Dies weist auf eine mögliche Lokalisation in der Zytoplasmamembran hin. In den Fibroblasten einer Kontrollspenderlunge wurde nach 24h Hypoxiestimulation zusätzlich eine Lokalisation im Nucleus nachgewiesen. In der COPD-Gruppe zeigte sich eine vermehrte CD36-Expression nach 24h Hypoxie (**Abbildung 35**).

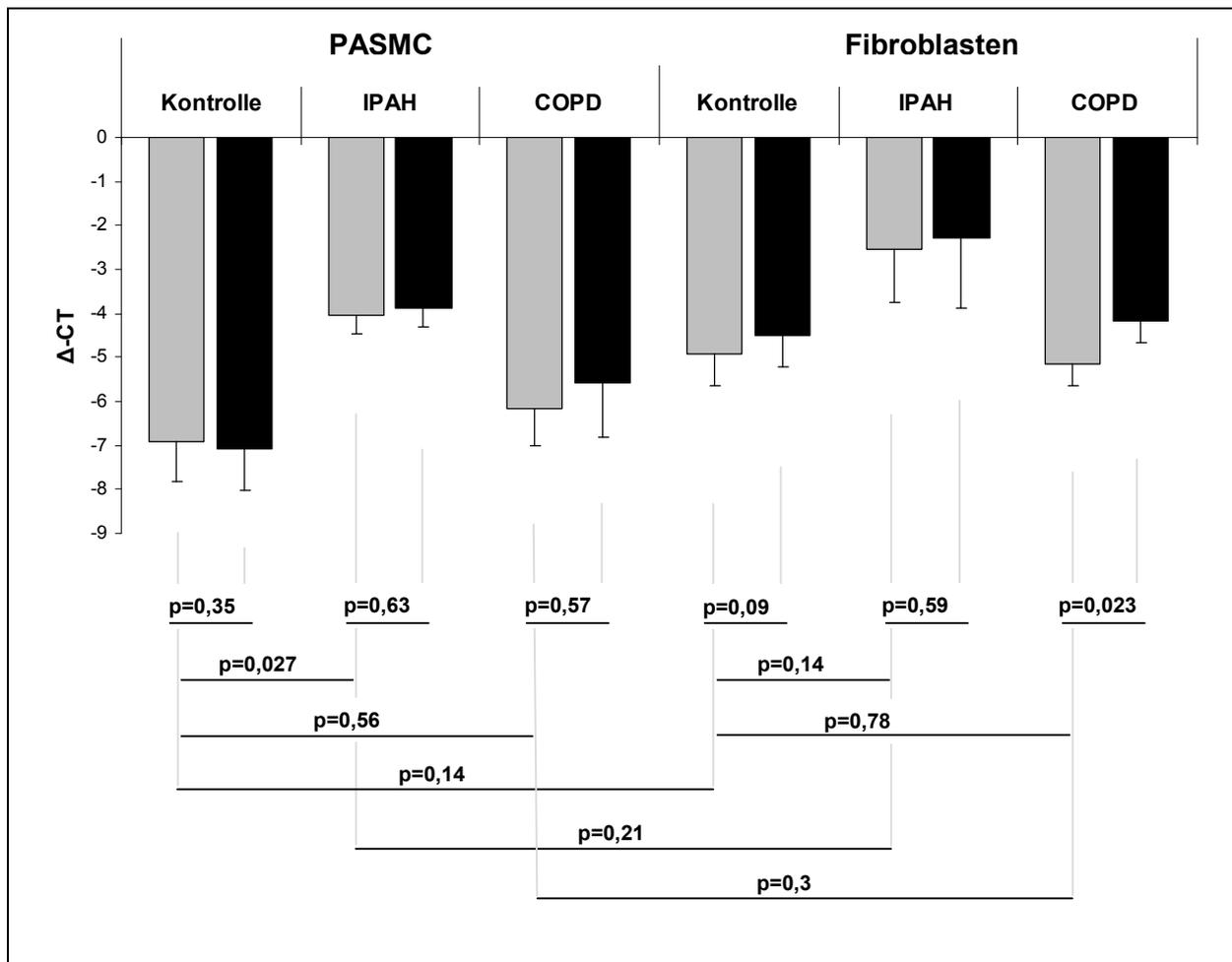


Abbildung 34: Vergleich der CD36 RNA-Expression bei verschiedenen Erkrankungen, unter Normoxie (grau) und nach 24h Hypoxiestimulation (schwarz) sowie zwischen Zellarten. Die Säulen geben die Mittelwerte \pm SEM der Δ -CT Werte an (n=5).

3.6.5 CD36: Proteinexpression in PASM und Fibroblasten unter Normoxie und nach 24h Hypoxiestimulation

Auch nach mehrmaligen Versuchsansätzen, unter Erhöhung der Antikörperkonzentration und Verlängerung der Expositionszeit, wurde keine CD36-Proteinexpression mittels WB in PASM und Fibroblasten gemessen. Eine Detektion derselben Membran mit Antikörpern gegen FHL-1, S100 A4, TrkB, TSP-1 und β -Actin verlief positiv.

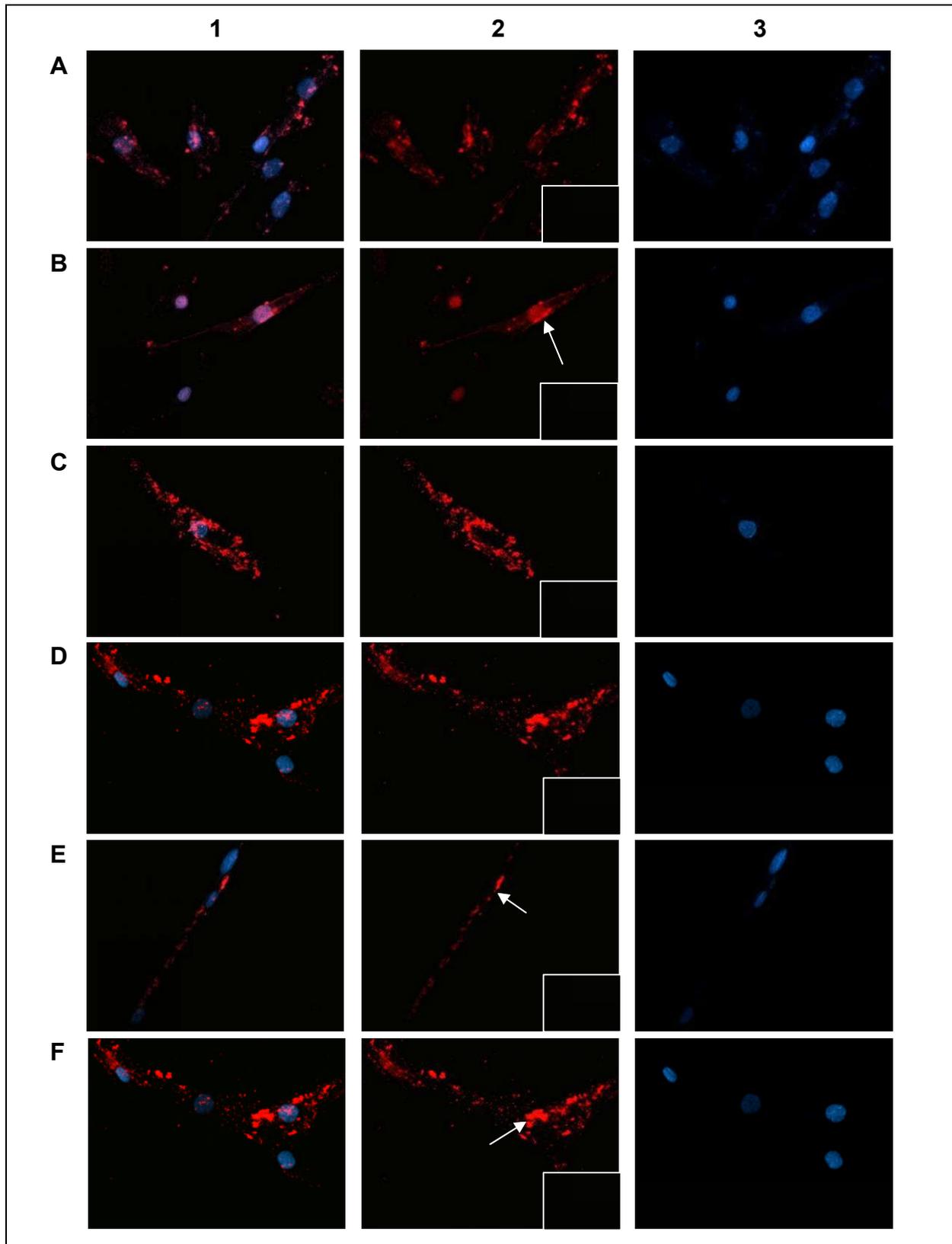


Abbildung 35: Immunfluoreszenzfärbung von Fibroblasten in 40x Vergrößerung. Additionsbild (1), spezifische Färbung (2), DAPI Kernfärbung (3), kleiner Kasten in (2) Negativkontrolle. (A) Fibroblasten Kontrollspenderlunge Normoxie, (B) nach 24h Hypoxie. (C) Fibroblasten IPAH-Lunge Normoxie, (D) nach 24h Hypoxie. (E) Fibroblasten COPD-Lunge Normoxie, (F) nach 24h Hypoxie. Die Anfärbung der Zellen zeigt eine fleckförmige Verteilung. In B2 ist zusätzlich eine Lokalisation im Nucleus erkennbar (Pfeil). Im Vergleich von E2 zu F2 (siehe Pfeile) zeigte sich eine vermehrte Expression in F.

4 Diskussion

4.1 Einführung

Die pulmonale Hypertonie kann idiopathisch oder im Rahmen verschiedener Erkrankungen auftreten (siehe 1.1.1). Abhängig davon zeigt sich eine unterschiedliche Prognose und Mortalität. Bei den verschiedenen Formen der PH finden sich –unterschiedlich ausgeprägt– charakteristische morphologische Veränderungen im Bereich der Pulmonalarterien und Widerstandsgefäße (Gefäßumbau). Zugrunde liegen diverse Expressionsveränderungen auf Gen- und Proteinebene im Bereich intrapulmonaler Arterien [8]. In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten im Mausmodell der Hypoxie-induzierten pulmonal-arteriellen Hypertonie mittels Microarray- und 2D-Page-Analysen Kandidatengene und -proteine in intrapulmonalen Arterien identifiziert werden [68]. Immunhistochemische Färbungen zeigten außerdem, dass die Kandidatenproteine in humanen Pulmonalarterien exprimiert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die idiopathische pulmonal-arterielle Hypertonie (IPAH) als primäre PH-Form und die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) als sekundäre PH-Form hinsichtlich ihrer Expressionsveränderungen beim Lungengefäßumbau untersucht. Es sollte ermittelt werden, wie ausgewählte Kandidatengene und -proteine in humanem Lungenhomogenat und speziell in PASMC und Fibroblasten humaner Pulmonalarterien differentiell exprimiert sind. Folgende Kandidatengene und -proteine wurden untersucht: FHL-1, S100 A4, BDNF, TrkB, TSP-1 und CD36. Zusätzlich wurde der Einfluss einer 24-stündigen Hypoxiestimulation ($FiO_2=0,01$) auf die Regulation der Gene und Proteine in PASMC und adventitiellen Fibroblasten untersucht.

Der Pathomechanismus für die IPAH ist nur ansatzweise verstanden, eine genetische Komponente mit Mutationen in dem BMPR2-Gen, welches zur TGF- β -Superfamilie gerechnet wird, wurde beschrieben [21]. In einer Arbeit von Fantozzi *et al.* wurden humane PASMC aus IPAH-Lungen mit BMP2 inkubiert und eine Microarrayanalyse durchgeführt. Die PASMC aus IPAH-Lungen zeigten ein unterschiedliches Expressionsprofil im Vergleich zu PASMC aus Spenderlungen, mit differentiell exprimierten Genen vor allem in den Bereichen Proliferation und Apoptosehemmung [122]. Außerdem wurde an gesunden humanen PASMC gezeigt, dass BMP über die Caspasen 8 und 9 eine Apoptose induzieren [123]. Es ist anzunehmen, dass in PASMC aus IPAH-Lungen, bei denen das BMPR2-Gen mutiert und/oder die Expression von BMP verändert ist, Apoptose-induzierende Mechanismen gehemmt sein können. In humanen pulmonal-arteriellen EC konnte dieser Apoptose-hemmende Effekt gezeigt werden, indem die Transkription des

BMPR2-Genes über siRNA blockiert wurde [124]. In einer weiteren Arbeit wurden in vivo an transgenen Mäuselungen, bei denen eine funktionslose Form des BMPR2 in PASMC exprimiert wird, eine im Vergleich zu Kontrollmäusen differentielle Genexpression gemessen. So konnte mittels Microarrayanalyse eine Expressionsabnahme in Genen, die in der SMC-Differenzierung und Angiogenese involviert sind, und eine Expressionzunahme in Genen, die an der Immunantwort beteiligt sind, gemessen werden [125]. Eine Expressionsabnahme angiogener Gene steht im Gegensatz zur deren Expressionszunahme beim Gefäßumbau unter hypoxischen Bedingungen [126]. In weiteren Untersuchungen ist zu klären, ob sich diese Gefäßveränderungen auch im Rahmen einer IPAH finden lassen.

In einem Rattenmodell der Hypoxie-induzierten PH fand sich bei Angiotensin-1-transfizierten Ratten, bei denen selektiv die distalen Lungenarteriolen transfiziert wurden und die Angiotensin-1 überexprimierten, ein signifikant verbesserter systolischer PAP. Es wurde eine mögliche Verbindung von Angiotensin-1 und der IPAH vermutet. In der gleichen Studie wurde jedoch gezeigt, dass im Lungenhomogenat von IPAH-Patienten keine Unterschiede der Angiotensin-1-Proteinexpression im Vergleich zu gesunden Lungen bestanden [127]. Weiterhin zeigte sich in PASMC aus IPAH-Lungen eine erhöhte Proteinexpression von Caveolin-1. Eine Erhöhung von Caveolin-1 in der Zelle führt zu einem erhöhten Calciumeinstrom in die Zelle, was zu Vasokonstriktion und Mediahypertrophie führen kann [128]. Hier wäre zu klären, zu welchem Zeitpunkt der Erkrankung die Caveolin-1-Expression verändert ist und ob Caveolin-1 ein möglicher Angriffspunkt einer Therapie sein könnte. Ein weiterer Ansatzpunkt zur Beschreibung des Gefäßumbaus im Rahmen der IPAH ist der planare Zellpolaritäts-Signalweg, einem nicht-kanonischen WNT-Signalweg (Wingless-related Integration Site). Dabei stellt WNT ein Signalprotein dar, welches als lokaler Mediator eine wichtige Rolle bei Zell-Zellkontakten einnimmt. Laumanns *et al.* zeigten in Laser-mikrodissezierten Pulmonalarterien aus IPAH-Lungen mittels Microarrayanalyse eine Hochregulation von Mediatoren, die in den planaren Zellpolaritäts-Signalweg involviert sind. Einige dieser hochregulierten Gene, wie z.B. die Rho-Kinase, konnten in real-time-PCR-Untersuchungen als hochreguliert bestätigt werden [129]. In der vorliegenden Studie sollte ermittelt werden, welche der genannten Kandidatengene und -proteine in IPAH im Gefäßumbau eine Rolle spielen.

Die Ursachen für die sekundäre Form der PH sind vielfältig. Im Verlauf der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) kommt es häufig zu einer sekundären pulmonalen Hypertonie, ausgelöst durch chronische Hypoxämie. Naeije *et al.* zeigten, dass der Gefäßumbau im Rahmen der COPD-assoziierten PH nicht nur die Media betrifft, sondern alle Gefäßabschnitte einschließt [130]. Diesen Veränderungen liegen Gen- und Proteinregulationen zugrunde. Welche Gene und

Proteine im Einzelnen reguliert sind, ist nicht ausreichend geklärt. Bekannt ist, dass durch chronische Entzündungsreaktionen und Proteinase/Antiproteinase Ungleichgewicht es zu einer Veränderung der Gasaustauschflächen und konsekutiv zu einer chronisch-alveolären Hypoxie kommen kann, was vor allem in schweren Formen der COPD zu einer pulmonalen Hypertonie führen kann [57, 58]. Im übrigen ist die COPD-assoziierte PH durch eine kurzfristige [131] oder langfristige [132] therapeutische Sauerstoffgabe meist nur partiell reversibel. Neben der chronischen Hypoxie können beim Gefäßumbau die toxischen Effekte des Zigarettenrauchs und chronische Infektionen eine Rolle spielen [45]. Auf molekularer Ebene konnte eine erhöhte Expression von VEGF und des Serotonintransporters (SERT) in fortgeschrittener COPD gefunden werden [133, 134]. Es besteht eine Verbindung des Serotonin-Signalweges mit dem BMPR2-Rezeptor, welcher in IPAH-Patienten mutiert sein kann [135]. In diesem Zusammenhang bedarf es weiteren Untersuchungen, um Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen COPD-assoziiierter PH und IPAH bezüglich des Gefäßumbaus zu bestimmen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, welche der zuvor genannten Kandidatengene und -proteine in COPD-assoziiierter PH, als Beispiel einer sekundären PH, im Gefäßumbau eine Rolle spielen.

HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor) ist der Haupttranskriptionsfaktor pulmonaler Prozesse auf Hypoxie [136]. Er aktiviert eine erhöhte Expression von Genen, die bei Hypoxie eine Rolle spielen. HIF-1 fungiert dabei als Hauptregulator auf die Sauerstoffhomöostase. Über 40 Kandidatengene sind als HIF-1 α reguliert identifiziert worden [28]. In plexiformen Läsionen von Patienten, die an einer schweren PH erkrankten, konnte immunhistochemisch eine HIF-1 α -Expression gezeigt werden. Es wurden hierzu sowohl IPAH-Patienten als auch Patienten mit schwerer sekundärer PH untersucht [137]. Eine Beteiligung von HIF-1 α in IPAH und schwerer COPD-assoziiierter PH ist somit denkbar. Interessant ist außerdem, dass in verschiedenen Karzinomen, wie im Bereich der Lunge, des Ösophagus oder der Ovarien, eine erhöhte Expression von HIF-1 α gemessen wurde. Die erhöhte Expression von HIF-1 α wurde dabei durch intratumoröse Hypoxie und/oder durch genetische Veränderungen im Rahmen der Karzinomentwicklung getriggert. Als Folge daraus steigt die VEGF-Konzentration und führt über parakrine Sekretion zu einer Proliferation in EC. Zusätzlich aktiviert HIF-1 autokrine Signalwege, die u.a. über den Wachstumsfaktor TGF- β , das Zellüberleben und -proliferation fördern [138]. Eine mögliche Verbindung von HIF-1 zum BMP, welches zur TGF- β Superfamilie gezählt wird und das entsprechende Gen in einem Teil der IPAH-Patienten als mutiert gefunden wird, sollte Anreiz für weitere Untersuchungen sein.

Das HIF-2 α -Protein besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem HIF-1 α und scheint insbesondere für das vaskuläre „remodelling“ wichtig zu sein [139]. Es wurde

gezeigt, dass Mäuse, die heterozygot für das HIF-2 α -Nullallel sind und dadurch HIF-2 α defizient sind, keine Hypoxie-bedingte PH entwickeln. In diesem Zusammenhang wird vermutet, dass die Hochregulation von Vasokonstriktoren durch HIF-2 α dazu beiträgt, die Entwicklung des Hypoxie-bedingten Gefäßumbaus zu fördern [140]. Eul *et al.* zeigten an humanen pulmonal-arteriellen Fibroblasten, dass eine Hypoxie-induzierte Proliferation dieser Zellen ausschließlich HIF-2 α abhängig ist. Hingegen zeigte sich eine Hypoxie-bedingte reduzierte Migration der Fibroblasten als HIF-1 α und HIF-2 α abhängig [141]. Zusammenfassend zeigt sich, dass HIF in allen Gefäßschichten der Pulmonalarterie eine Rolle in Hypoxie-bedingten Formen der PH spielt. Außerdem wird eine Rolle von HIF in Hypoxie-unabhängigen Formen der PH diskutiert [142].

4.2 Technische Aspekte

4.2.1 Lungenhomogenat und Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an humanem Lungenhomogenat durchgeführt, um Expressionsveränderungen in einem vitalen Gewebe zu messen. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass Gewebe aus verschiedenen, interagierenden Zelltypen zusammengesetzt sind, sodass die Verwendung der Homogenate in der Analyse nur ein „gemischtes“ Expressionsprofil auf Gen- und Proteinebene liefern kann. Da die interessierenden intrapulmonalen Arterien nur einen geringen Anteil am gesamten Gewebe ausmachen, stellt die zelluläre Heterogenität ein großes Problem bei molekularbiologischen Analysen von Homogenaten dar. Die Expressionsveränderung im Zielkompartiment kann leicht durch das restliche Gewebe maskiert werden, sodass sowohl das Ergebnis als auch die Interpretation der Analysen hierdurch beeinflusst werden können [143]. Es legt die Vermutung nahe, dass die erkrankungsspezifischen Expressionsveränderungen in intrapulmonalen Arterien bei Einsatz von Lungenhomogenat nicht oder nur unzulänglich zu ermitteln wären. Aus diesem Grund sollte das Zielkompartiment auch getrennt isoliert und analysiert werden. So wurden bereits in vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe intrapulmonale Arterien von Mäuselungen mittels Laser-assistierter Mikrodisektion isoliert und analysiert [68].

Um die Expressionsveränderungen im Bereich der intrapulmonalen Arterien näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit neben dem Lungenhomogenat auch die Zellkultur eingesetzt. Die untersuchten Zellen (PASMC und Fibroblasten der Adventitia) wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Weissmann zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden aus den Pulmonalarterien humaner Lungen entnommen und auf Petrischalen kultiviert. Im Gegensatz zur Laser-assistierten Mikrodisektion können in der Zellkultur einzelne Zellarten und zusätzlich funktionelle Prozesse in der

Zellart untersucht werden. Andererseits stellt die Zellkultur ein artifizielles System dar, bei dem die untersuchte Zellart aus ihrem Zellverband gelöst und isoliert analysiert werden kann. In dieser Arbeit wurden Expressionsveränderungen in isolierten primären PASMC und adventitiellen Fibroblasten gemessen. Ob die untersuchte Zellart im Zellverband in der Arterie gleiche oder ähnliche Expressionsveränderungen zeigt, kann nur unzulänglich ermittelt werden. Beispielweise beeinflussen Fibroblasten über parakrine Sekretion benachbarte SMC und verändern deren Tonus und Wachstum [144]. Dennoch kann die Zellkultur in Zusammenschau mit den Expressionsveränderungen im Lungenhomogenat und den mikrodisssezierten intrapulmonalen Arterien wichtige Ergebnisse liefern.

4.2.2 Vergleichbarkeit von Subpopulationen in PASMC und Fibroblasten

Die erhobenen Daten aus der Zellkultur zeigen große Streuungen, welches die Beurteilung von Unterschieden der mittleren Expression zwischen den Gruppen schwierig macht. Für die große Streuung kommen drei Gründe in Frage: (a) Die untersuchten Zellen wurden von verschiedenen Abschnitten der Pulmonalarterien entnommen, (b) es können unterschiedliche Subpopulationen von PASMC und Fibroblasten entnommen und kultiviert worden sein und (c) es gibt genetische Unterschiede der Spender. So haben Frid *et al.* mindestens vier verschiedene SMC-Phänotypen in den großen Pulmonalarterien von Rindern beschrieben. Diese unterschieden sich in der Lokalisation innerhalb der Media, der Morphologie und immunbiochemischen Charakteristika [145]. Weitere *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen bestätigten, dass die pulmonal-arterielle Media nicht aus einer phänotypisch homogenen SMC-Population, sondern aus heterogenen SMC-Subpopulationen aufgebaut ist. Es zeigten sich in den Subpopulationen unterschiedliche Fähigkeiten zur Proliferation und Produktion von ECM. Ein wichtiger Punkt ist außerdem, dass Hypoxieexposition ein unterschiedliches Proliferationsbestreben in diesen SMC-Subpopulationen auslöste. Ein entscheidender Faktor hinsichtlich der Antwortprozesse auf Hypoxie war in diesem Zusammenhang die Proteinkinase C [146].

In chronisch-hypoxischer PH wirken neben der Hypoxie lokal-produzierte Zytokine und mechanischer Stress als steuernde Faktoren auf die zelluläre Differenzierung von SMC. Diese beeinflussen über Tyrosinkinasen, Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAP-Kinasen), Phosphoinositidyl-3-Kinase, SMAD-Phosphorylierung und Rho-Kinasen intrazelluläre Signalkaskaden. Als Folge daraus werden neben der Differenzierung der SMC in Subpopulationen auch deren Kontraktilität, Zellwachstum und Synthese von ECM reguliert [41]. Schwere Formen der chronisch-hypoxischen PH zeigen andere strukturelle Veränderungen in den Pulmonalarterien als leichte

Formen (siehe **1.1.3**). Verschiedene Stadien der chronisch-hypoxischen PH lassen somit auf unterschiedliche Beteiligung der Subpopulationen von SMC schließen.

Fibroblasten der pulmonal-arteriellen Adventitia bestehen ebenfalls aus heterogenen Subpopulationen [147]. Nach Einfluss von Hypoxie reagieren nur spezifische Subpopulationen mit einer Proliferationssteigerung. Dies zeigte sich in isolierten adventitiellen Fibroblasten von neonatalen Kälbern nach chronischer Hypoxieexposition. An dieser hypoxie-induzierten Proliferation ist ein komplexes Netzwerk von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) beteiligt [148]. Zusätzlich induzierte Hypoxie in adventitiellen Fibroblasten von Kälbern eine Differenzierung von Fibroblasten in Myofibroblasten. Nachgewiesen wurde in diesem Zusammenhang eine Hochregulation der α -SMA-Proteinexpression [149].

Aus diesen Anhaltspunkten ergibt sich, dass die Beurteilung von Expressionsveränderungen in PASMC und Fibroblasten im Rahmen des Gefäßumbaus auch von Subpopulationen innerhalb der Zellart abhängig gemacht werden sollte. Weitere Untersuchungen sind dafür nötig.

4.2.3 Messfehler im Zusammenhang mit den Patientenproben

Bei den untersuchten Proben aus Wien handelte es sich um resezierte Anteile aus Lungentransplantationen. Es wurden Lungen von IPAH- und COPD-Patienten, sowie von Spendern in die Untersuchung aufgenommen. Soweit vorhanden, wurden das Alter und das Geschlecht mit angegeben. Der höhere Frauenanteil in der IPAH-Gruppe ist erklärbar, da doppelt so viele Frauen wie Männer an der IPAH erkranken (siehe **1.1.4**). In der COPD- bzw. Spendergruppe zeigte sich ein ausgeglichenes Geschlechterverhältnis.

Bedingt durch die Tatsache, dass die untersuchten Erkrankungen unterschiedliche Risikofaktoren haben, welche sich ebenfalls auf die Zielgrößen auswirken können, sind systematische Fehler nicht auszuschließen und sollten bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. So kann neben den oben genannten Unterschieden im Geschlechterverhältnis zwischen den Gruppen zum Beispiel auch der Raucherstatus einen wesentlichen systematischen Fehler verursachen:

COPD ist eine typische „Raucherkrankheit“ [150]. Obwohl keine Daten zum Raucherstatus der Patienten vorliegen, ist anzunehmen, dass der Anteil langjähriger und starker Raucher unter den COPD-Patienten in dieser Studie höher ist als in den anderen Gruppen. Es ist bekannt, dass Rauchen eine Entzündungsantwort in der Lunge provoziert [45] und die Expression verschiedener Gene und Proteine in der Lunge induziert [151]. Die Erkrankung lässt sich daher nicht mit Sicherheit als (alleinige) Ursache eventueller Unterschiede in der Gen- oder Proteinexpression angeben.

Patientenproben zeigen im Allgemeinen aufgrund unterschiedlicher genetischer Disposition und Lebensumständen eine große Variabilität hinsichtlich der Gen- bzw. Proteinexpression. Präzise Schätzungen von Mittelwerten wie sie zum Nachweis von Unterschieden zwischen den Gruppen notwendig sind, erfordern wegen dieser großen Varianz auch große Stichprobenumfänge. Die für diese Arbeit verfügbaren Stichprobenumfänge waren begrenzt und erlauben daher keine hohe statistische Sicherheit für die Beurteilung von Mittelwertunterschieden.

4.3 Differentielle Expression auf Gen- und Proteinebene

4.3.1 FHL-1

In vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigte sich im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH eine Hochregulation der FHL-1-Proteinexpression nach 24h Hypoxieexposition im Vergleich zu normoxisch gehaltenen Mäusen. Die Ergebnisse aus den 2D-Page-Analysen zeigten nach 24h Hypoxieexposition eine differentielle Expression einer Vielzahl von Proteinen, wobei FHL-1 eines der am stärksten hochregulierten Proteine war [69].

FHL-1 ist an der Muskelentwicklung beteiligt und wird während der Hypertrophieentwicklung von Herzmuskel- und Skelettmuskelzellen verstärkt exprimiert [74]. FHL-1 zählt zur Gruppe der LIM-Proteine, welche eine entscheidende Rolle in der Gewebedifferenzierung, Onkogenese und zytoskelettalen Umstrukturierung einnehmen [152-155]. Brown *et al.* zeigten eine Lokalisation von FHL-1 in den Kernen von Myoblasten und im Zytoplasma von Myotubuli. Weiterhin vermuteten sie, dass FHL-1 aufgrund der LIM-Domänen als Verbindungsprotein in einem größeren Funktionskomplex innerhalb der „focal adhesions“-Bereiche auftritt [71]. Im Mausmodell zur hypertrophen und dilatativen Kardiomyopathie fand sich eine veränderte FHL-1-Expression im Herzventrikel [152-155]. Zusätzlich konnte eine erhöhte Expression in dehnungsabhängiger Muskelhypertrophie gezeigt werden [156-158]. In diesem Zusammenhang nahmen wir an, dass FHL-1 auch in den pulmonalen Gefäßumbau involviert ist.

In den Untersuchungen von Kwapiszewska *et al.* konnte eine erhöhte FHL-1-Expression nicht nur nach 24h Hypoxieexposition, sondern auch nach 7 und 21d Hypoxieexposition gefunden werden. Nach diesen längeren Hypoxiephasen war die PH bereits evident und voll entwickelt [143]. Die Rolle von FHL-1 in Hypoxie-induzierter PH wird durch die Tatsache unterstützt, dass FHL-1 im Lungenkreislauf, jedoch nicht im systemischen Kreislauf als hochreguliert gefunden wurde. Diese Ergebnisse korrelieren mit den vielseitigen Effekten der Hypoxie. So bewirkt Hypoxie im pulmonalen Gefäßsystem eine Widerstandserhöhung, während es systemisch zur Vasodilatation kommt. Neben der erhöhten Expression von FHL-1 im Mausmodell

der Hypoxie-induzierten PH wurde eine erhöhte Expression in zwei verschiedenen Rattenmodellen zur PH beschrieben [69]. Sowohl im Rattenmodell zur Monocrotalin-induzierten PH, als auch in PH, die durch chronische Hypoxie und den VEGF-Rezeptorantagonisten SU5416 induziert wurde, konnte dies beobachtet werden.

Ob eine Assoziation von FHL-1 mit humanen Formen der PH besteht, war Bestandteil dieser Arbeit. So fand sich im Lungenhomogenat von IPAH-Patienten eine vermehrte RNA- und Proteinexpression (siehe **3.1.1** und **3.1.2**). Weiterhin wurde in Laser-mikrodissezierten Arterien von IPAH-Patienten eine Hochregulation von FHL-1 auf RNA-Ebene gezeigt [69]. Somit konnte die differentielle Expression von FHL-1 im Kompartiment der Pulmonalarterien lokalisiert werden. In der Immunfluoreszenz zeigte sich zudem, dass FHL-1 in PASMC und Fibroblasten der Adventitia von Pulmonalarterien exprimiert wird (siehe **3.1.4**). Auf RNA-Ebene bestätigte sich eine vermehrte FHL-1 Expression in PASMC aus IPAH-Lungen, auf Proteinebene zeigten sowohl PASMC als auch Fibroblasten vermehrte Expressionen. Eine Beteiligung von FHL-1 im Gefäßumbau von IPAH-Patienten kann angenommen werden.

Auch in COPD-assoziierte PH konnte sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine Hochregulation von FHL-1 im Lungenhomogenat gefunden werden. In PASMC zeigten sich zudem eine erhöhte RNA-Expression im Vergleich zu PASMC aus Spenderlungen. Eine positive Expression von FHL-1 in PASMC bestätigte sich in der Immunfluoreszenz (siehe **3.1.4**). Diese Daten unterstützen wiederum unsere Hypothese, dass die bereits im Tiermodell identifizierten Kandidatenproteine, die zur Entstehung der PH beigetragen haben, auch eine Rolle bei der Entwicklung einer primären (IPAH) und sekundären Form (COPD-assoziiert) von PH im Menschen spielen. Interessanterweise zeigten FHL-2 und FHL-3, in Übereinstimmung mit einem Mausmodell zur Herzhypertrophie und dilatativen Kardiomyopathie [156], in IPAH-Patienten keine Expressionsunterschiede [69].

In dieser Arbeit wurde zusätzlich die Wirkung einer 24h Hypoxiestimulation auf Gen- und Proteinexpressionen untersucht. Die Hypoxiestimulation zeigte eine vermehrte RNA-Expression von FHL-1 in PASMC von Spenderlungen, sowie in Fibroblasten von IPAH- und COPD-Patienten (siehe **3.1.3**). Im Mausmodell der Hypoxie-bedingten PH war FHL-1 ebenfalls nach 24h Hypoxie auf Proteinebene hochreguliert [69]. Eine Beteiligung von FHL-1 in der initialen Phase Hypoxie-bedingter sekundärer Formen von PH im Menschen ist somit denkbar.

Es wurde beschrieben, dass die Hypoxie-bedingte Expression von FHL-1 in humanen PASMC über HIF-1 α und HIF-2 α gesteuert wird. Dies ist interessant, da HIF in die Pathogenese von Hypoxie-assoziierten und Hypoxie-unabhängigen Formen der PH involviert ist [142]. Eine Verbindung von HIF mit dem ROS-Signalweg wird angenommen. Untersuchungen haben gezeigt, dass viele Zellen

nach Hypoxieexposition eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an ROS aufweisen [159]. Allerdings wird dies seit Jahren kontrovers diskutiert. Zudem erhöht nicht nur Hypoxie die intrazelluläre Konzentration an ROS, sondern auch Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β), Zytokine (TNF- α , IL-1 β), Hormone (Insulin, Angiotensin) und Koagulationsfaktoren (z.B. Thrombin) können unter Normoxie die ROS-Konzentration erhöhen. Die intrazelluläre Erhöhung von ROS wiederum führt zu einer Erhöhung der HIF-1 α -Proteinexpression und zur erhöhten Expression diverser Zielgene (VEGF, Erythropoietin) [160]. Zudem wird die Proteinsynthese von HIF-1 α über Signalwege der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und MAP-Kinase reguliert. Diese Signalwege wiederum werden über andere Signalkaskaden aktiviert, wie z.B. Signalkaskaden der Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk) oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [138]. Diese Überlegungen zur Beteiligung von HIF-1 an Hypoxie-unabhängigen Formen der PH werden durch die Tatsache gestützt, dass in humanen Lungenhomogenaten von IPAH-Lungen HIF-1 α in arteriellen Läsionen gefunden wurde [137]. Eine Beteiligung von HIF-1 im Rahmen der COPD-assoziierten PH, die eine chronische Hypoxie als Ursache hat, ist gut denkbar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Kwapiszewska *et al.* untersuchten zudem, ob FHL-1 eine funktionelle Rolle im Rahmen des Gefäßumbaus einnimmt. Über eine Inhibition der FHL-1-Expression mittels siRNA konnte eine herabgesetzte Migration- und Proliferationsrate in humanen PASMC gemessen werden. Eine Überexpression von FHL-1 bewirkte einen gegenteiligen Effekt. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in Skelettmuskelzellen gefunden, wo eine Überexpression von FHL-1 eine erhöhte Migration- und Proliferationsrate induzierte [69].

Weiterhin wurde die Rolle von FHL-1 in der Zellzykluskontrolle untersucht. Hierzu wurden die Cyclin-D1 Konzentrationen unter FHL-1-Inhibition bestimmt. In proliferierenden Zellen ist die Progression der G1-Phase abhängig von anhaltend hohen Konzentrationen an D-Typ Cyclin [161]. Zudem kontrolliert die Integrin-vermittelte Adhäsion, welche eine Rolle im Gefäßumbau im Rahmen einer PH spielen könnte, die Akkumulation von Cyclin-D1 [162]. Es zeigte sich unter Inhibition der FHL-1-Expression eine verminderte Proteinkonzentration von Cyclin-D1 und damit eine Hemmung der G1-Progression (und folglich eine verminderte Proliferation [69]).

In einem weiteren Schritt wurde versucht mögliche Interaktionspartner von FHL-1 zu identifizieren. Bisher war nur das Myosin-bindenden Protein C (MyBP-C) als Interaktionspartner von FHL-1 bekannt [163]. Die Annahme, dass die Zellaktivität von FHL-1 auf einer Protein-Protein-Interaktion beruht, wird wie folgt begründet: (a) FHL-1 besitzt mehrere Four-and-a-half-LIM Domänen, welche sowohl an intra- als auch an intermolekularen Prozessen beteiligt sind [164]. (b) LIM Domänen fungieren

als Plattform für die Synthese von Multiproteinkomplexen. (c) Eine Beteiligung von FHL-2 und FHL-3 an der Regulation von Umbauprozessen am Actinzytoskelett wurde belegt [152]. Basierend auf diesen Vorüberlegungen wurde Talin-1 mittels Immunpräzipitation und anschließender MALDI-TOF-Untersuchung als neuer Interaktionspartner von FHL-1 identifiziert [69]. Talin-1 besitzt ebenfalls eine LIM und Actin-bindende Domäne [165]. Dabei ist Talin-1 ein Hauptbestandteil im Zytoskelett und kolokalisiert mit aktivierten Domänen von Integrin- β [166]. Neben den Integrinen sind Bindungspartner wie die 'focal adhesion'-Kinase und das F-Actin für Talin-1 beschrieben [167, 168]. In undifferenzierten Stammzellen von Mäuseembryonen verhindern defekte Talin-1-Proteine den Aufbau von 'focal adhesions' und führen zu einer gestörten Zellausbreitung [169]. Außerdem wird über eine Inhibition von Talin-1 die Migration von Fibroblasten und T-Lymphozyten abgeschwächt [170, 171]. Kwapiszewska *et al.* zeigten an humanen PASMCS, bei denen die Expression von Talin-1 mittels siRNA blockiert wurde, eine verminderte Migrations- und Proliferationsrate. Dieses korreliert mit den Ergebnissen zu FHL-1. FHL-1 könnte wie Talin-1 an der Veränderung von zytoskelettalen Molekülen beteiligt sein. Eine Rolle in der Talin-vermittelten Regulation von Integrinsignalen und zytoskelettalen Organisationsvorgängen wäre denkbar, ebenso wie der Aufbau einer Talin-Actin Vernetzung. Die Identifikation von Talin-1 als Bindungspartner und seine Kolokalisation mit FHL-1 in humanen PASMCS deutet auf eine wichtige Rolle von FHL-1 in der Integrin-Actin Kommunikation und folglich in Migrations- und Proliferationsvorgängen hin.

4.3.2 S100 A4

Im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH konnte nach 7 und 21d Hypoxieexposition eine vermehrte RNA-Expression von S100 A4 gemessen werden. Zu diesen Zeitpunkten war die PH bereits evident und voll entwickelt [143]. Dies zeigte sich nach 7d sowohl im Lungenhomogenat als auch in mikrodissezierten Pulmonalarterien. Nach 21d Hypoxie fand sich nur in mikrodissezierten Pulmonalarterien eine vermehrte Expression. Untersuchungen zur Lokalisation von S100 A4 mittels Immunhistochemie bestätigten eine Mehrexpression in intrapulmonalen Arterien nach 7 und 21d Hypoxieexposition. Dabei war S100 A4 vornehmlich in den PASMCS lokalisiert. Außerdem wurde eine Expression in neomuskularisierten Widerstandsgefäßen beobachtet [68]. Diese Ergebnisse zeigten eine Beteiligung von S100 A4 im Gefäßumbau bei Hypoxie-induzierter PH im Mausmodell. Ziel dieser Arbeit war zu klären, ob S100 A4 eine Rolle im Gefäßumbau im Rahmen humaner Formen von PH (IPAH, COPD-assoziierte PH) einnimmt. S100 A4 ist Teil der S100 Proteinfamilie und besitzt zwei Ca^{2+} -bindende EF-Motive. Es ist bekannt, dass S100 A4 sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär in

sezernierter Form vorkommt. Intrazellulärer Angriffspunkt ist das nichtmuskuläre Myosin II, welches an der Zellmotilität beteiligt ist. Extrazelluläres S100 A4 kann auf parakrinem Wege in die Zellmotilität, -differenzierung und -überleben einwirken [76, 172]. S100 A4 steht in Verbindung mit der Invasion und Metastasierung von diversen malignen Zellarten. Durch direkte Interaktion und Regulation des Zytoskeletts beeinflusst S100 A4 die Motilität von Tumorzellen [173, 174]. Die Expression von S100 A4 kann durch parakrine Faktoren (z.B. TGF- β 1, Fibroblast-growth-factor-2) induziert werden, welche ebenso in epithelial-mesenchymaler Transition (EMT) und in der Progression von Malignomen involviert sind [175, 176]. Der EMT wird eine Schlüsselrolle in der Progression maligner Tumoren zugeschrieben und geht mit Verlust der Zelladhäsion, einer verminderten E-Cadherin-Expression und einer erhöhten Zellmobilität einher. Zudem findet während der EMT eine Phänotypkonvertierung von Epithelzellen zu Mesenchymzellen statt mit einem starken Bestreben zur Zellmigration [177] und der Expression von S100 A4 [178]. Dieses Bestreben zur Zellkonvertierung ist in invasiven Prozessen, wie z.B. in Malignomen, aber auch in diversen Organfibrosierungen erkennbar.

Darüber hinaus ist S100 A4 als Mediator an vielen nicht-malignen Prozessen beteiligt. Dazu zählen neben Fibrosierungen von Niere [176] und Leber [179] auch ZNS-Verletzungen [180], rheumatoide Arthritis [181], Herzhypertrophie [182] und auch Lungenerkrankungen [68, 183]. Wie oben beschrieben zählt TGF- β 1 zu den parakrinen Faktoren, welche eine veränderte Expression von S100 A4 induzieren und somit eine EMT initiieren können [175, 176]. In primärer biliärer Zirrhose wurde bestätigt, dass S100 A4 über TGF- β gesteuert wird und so in die EMT involviert ist. Spiekerkoetter *et al.* vermuten, dass die S100 A4-induzierte Erhöhung der Zellmigration von huPASMC mit dem BMPR2 Signalweg interagiert [184]. Interessanterweise ist in IPAH eine Mutation des BMPR2-Gens, welches zur TGF- β Superfamilie gezählt wird, beschrieben [21]. Zusätzlich wurde die Rolle von S100 A4 und BMPR2 im Rahmen von Entzündungsprozessen in der Pathogenese der IPAH vermutet. Hall *et al.* untersuchten IPAH-Lungen und Lungen mit sekundärer PH (kongenitale Herzerkrankung) von Kindern auf die Verteilung, Herkunft und Anzahl von Entzündungszellen. In den IPAH-Lungen zeigten sich umfangreiche periarterielle Infiltrate mit S100 A4- und BMPR2-positiven Makrophagen und T-Lymphozyten. Derartige periarteriellen Infiltrate fanden sich nicht in den Lungen mit sekundärer PH aufgrund von kongenitalen Herzerkrankungen [185]. Weitere Untersuchungen müssen klären, wie S100 A4 und BMPR2 miteinander interagieren und ob diese Interaktion eine Rolle in der Entwicklung der IPAH spielen könnte.

Neben der erhöhten Expression von S100 A4 in intrapulmonalen Arterien von Mäusen mit Hypoxie-induzierter PH [68], konnte der Einfluss von S100 A4 in weiteren Mausmodellen der PH gezeigt werden. So zeigten Merklinger *et al.* in

transgenen Mäusen, die S100 A4 überexprimierten, eine Verschlimmerung der Hypoxie-induzierten PH. Dabei wurden die rechtsventrikulären intrakardialen Drücke als Maßstab für die Schwere einer PH verwendet. Die transgenen Mäuse zeigten außerdem eine langsamere Genesung nach Beendigung der Hypoxieexposition. Dies beruhte auf einer anhaltenden Muskularisation der peripheren Pulmonalarterien. Ein beteiligter Faktor dabei war das Elastin-assoziierte Fibulin-5 Protein, welches nach parakriner Sekretion von S100 A4 hochreguliert war [186]. In einem anderen Mausmodell wurde S100 A4 mit der Entwicklung plexiformer Läsionen in Pulmonalarterien in Verbindung gebracht. Greenway *et al.* zeigten, dass 5% der transgenen Mäuse, die S100 A4 überexprimierten, eine intimale Hyperplasie entwickelten. Es wurde eine Assoziation mit plexiformen Läsionen von Patienten mit schwerer PH vermutet. In einem weiteren Schritt wurde die Expression von S100 A4 in Lungenhomogenaten von Kindern mit sekundärer PH (kongenitale Herzerkrankungen) untersucht. Mittels der Heath und Edwards Klassifikation wurde in leichte und schwere PH-Formen unterteilt. Immunhistochemisch zeigte sich in leichten Formen der PH keine Expression von S100 A4. In schweren Formen der PH, die mit plexiformen Läsionen einhergingen, konnte eine positive Expression in PASMC nachgewiesen werden. Zudem wurde in den schweren Formen der proapoptische Faktor BAX exprimiert. Eine Expression des angiogenetischen Faktors VEGF konnte sowohl in leichten als auch in schweren Formen der PH nachgewiesen werden [183].

Bestandteil dieser Arbeit war es zu ermitteln, ob S100 A4 in einer primären (IPAH) und sekundären (COPD-assoziiert) PH-Form des Menschen involviert ist. Im Lungenhomogenat von IPAH-Patienten wurde eine vermehrte RNA-Expression gemessen (siehe **3.2.1**). Auf Proteinebene wurde dies nicht bestätigt (siehe **3.2.4**). In der Immunfluoreszenz wurde eine Expression von S100 A4 in PASMC und adventitiellen Fibroblasten von IPAH-Patienten gezeigt. Unter gleichen Antikörperkonzentrationen und Belichtungszeiten wurde eine stärkere Expression in PASMC im Vergleich zu den Fibroblasten gefunden. Im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH [68] und in den humanen Lungenhomogenaten, welche in der Arbeit von Greenway *et al.* beschrieben wurden, war S100 A4 ebenfalls in den PASMC der Media lokalisiert. Mit Hilfe der real-time-PCR und Western Blot wurde in den PASMC und adventitiellen Fibroblasten von IPAH-Patienten aber keine veränderte Expression auf RNA- und Proteinebene gemessen (siehe **3.2.3** und **3.2.5**). In Zusammenschau kann eine Beteiligung von S100 A4 in IPAH vermutet werden. Möglicherweise ist ein größerer Stichprobenumfang notwendig, um Mittelwertsunterschiede auf RNA- und Proteinebene in den untersuchten Zellen messen zu können.

Auch in COPD-assoziiierter PH war S100 A4 in Lungenhomogenaten hochreguliert. Analog zur IPAH zeigte sich keine Mehrexpression auf Proteinebene. Auf Zellebene

zeigte sich weder in PASMC noch in Fibroblasten eine unterschiedliche S100 A4-Expression auf RNA- und Proteinebene. Diese Ergebnisse zeigen, dass S100 A4 in primären (IPAH) und sekundären Formen (COPD) der PH zumindest auf RNA-Ebene im Lungenhomogenat verstärkt exprimiert wird.

Ob eine Assoziation von S100 A4 mit dem Transkriptionsfaktor HIF besteht, sollte näher untersucht werden. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten potentielle 'hypoxia response elements (HRE)' im Bereich des S100 A4-Gens gefunden werden (persönliche Mitteilung, Dr. rer. nat. J. Wilhelm). Diese HRE befinden sich in diversen Hypoxie-induzierten Zielgenen und stellen Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor HIF dar [62]. Es hat sich gezeigt, dass diverse Gene, die eine Rolle in Hypoxie-induzierter PH spielen, diese HRE besitzen. So wiesen Semenza *et al.* nach, dass u.a. PDGF, VEGF, acidic/basic fibroblast growth factor (a/bFGF), TGF- β , insuline growth factor 2 (IGF-2), Erythropoietin (Epo), Endothelin 1 (ET-1) durch HIF-1 reguliert werden und ebenfalls HRE besitzen [28]. Unter der Annahme, dass HIF Bindungsstellen im Genlocus von S100 A4 aufweist, könnte S100 A4 unter hypoxischen Bedingungen durch HIF reguliert sein. Kwapiszewska *et al.* bestätigten eine Hochregulation von S100 A4 im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH. Nach 24h Hypoxiestimulation zeigte sich in PASMC von COPD-Patienten eine erhöhte RNA-Expression (siehe **3.2.3**). Zusätzlich zeigte sich in PASMC von Spenderlungen eine erhöhte Proteinexpression von S100 A4 nach 24h Hypoxiestimulation. Untersuchungen an adventitiellen Fibroblasten nach 24h Hypoxiestimulation zeigten eine vermehrte RNA-Expression in Spender-, IPAH- und COPD-Lungen. Dies bestätigte sich auf Proteinebene nur in den Spenderlungen (siehe **3.2.5**). In Pulmonalarterien von Mäuselungen konnte immunhistochemisch erst nach 7 und 21d Hypoxieexposition eine erhöhte Expression von S100 A4 gemessen werden [68]. Eine Beteiligung von S100 A4 in der initialen Phase (nach 24h) der Hypoxie-induzierten PH, aber auch in manifesten Formen primärer und sekundärer PH (IPAH, COPD-assoziiert) ist denkbar. Eine Regulation von S100 A4 durch HIF kann vermutet werden. Bekannt ist außerdem, dass die intrazelluläre Erhöhung von ROS zu einer Erhöhung der HIF-1 α -Proteinexpression führt und zur erhöhten Expression diverser Zielgene (VEGF, Erythropoietin) [160], möglicherweise auch S100 A4. So wäre auch eine S100 A4 Regulation ohne Hypoxie denkbar.

Auf Transkriptionsebene wird S100 A4 unter anderem durch den β -Catenin/T-Zellfaktor Komplex reguliert [187]. Dieser Komplex ist Bestandteil des kanonischen Signalweges, welcher zu den WNT-Signalwegen gezählt wird. In verschiedenen Erkrankungen wie z.B. die Osteoarthritis oder das Magenkarzinom wurde S100 A4 mit dem WNT-Signalweg in Verbindung gebracht [188, 189]. Alle drei WNT-Signalwege (kanonischer Signalweg, nicht-kanonischer Signalweg und der Calcium-Signalweg) verwenden Calcium-Signalkaskaden als 'second messenger'. Kiryushko

et al. zeigten, dass an axonalem Wachstum ein S100 A4-vermittelter Calcium-Signalweg beteiligt ist. Über diesen Signalweg werden u.a. G-Proteine und die Phosphoinositol-spezifische Phospholipase C aktiviert. Als Folge daraus steigt der Calciumeinstrom in die Zelle, was letztendlich zu axonalem Wachstum führt [190]. Eine Assoziation von S100 A4 mit dem WNT-Signalweg wäre somit denkbar. Ob S100 A4 über den WNT-Signalweg in die Pathogenese von PH involviert ist, müssen weitere Untersuchungen klären. Laumanns *et al.* haben bereits beschrieben, dass der nicht-kanonische WNT-Signalweg in die Pathogenese der IPAH involviert ist [129].

Ein weiterer Interaktionspartner von S100 A4 im Rahmen der PH ist Serotonin (5-Hydroxytryptamin; 5-HT). In Tiermodellen schwächte der Verlust des Serotonintransporters (SERT) oder des Serotoninrezeptors eine PH ab. So fand sich im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH ein stärkerer Gefäßumbau in Mäusen, die den SERT überexprimierten. Interessanterweise inhibierte Hypoxie die Expression des SERT [191, 192]. In einer anderen Arbeit wurde im gleichen Mausmodell der Serotoninrezeptor-2B in Mäusen sowohl pharmakologisch als auch genetisch inhibiert. Diese Mäuse zeigten keine Erhöhung des PAP und keinen Lungengefäßumbau unter der Einwirkung von Hypoxie [191]. Lawrie *et al.* zeigten, dass Serotonin die RNA- und Proteinexpression von S100 A4 in huPASMIC erhöhte. S100 A4 wiederum stimulierte die Migration und Proliferation von S100 A4 über den 'receptor for advanced glycation end-products' (RAGE) [184, 193]. Die Expression von RAGE ist in diversen vaskulären Erkrankungen, wie z.B. Arteriosklerose [194], arteriellen Restenosen [195] und diabetischer Vaskulopathie [196], hochreguliert. Über autokrine oder parakrine Sekretion gelangt das S100 A4 dabei an den RAGE von huPASMIC. Dabei wird S100 A4 über folgenden Serotonin-Signalweg bereitgestellt: Die Bindung von Serotonin an seinen Rezeptor vermittelt die Phosphorylierung der 'extracellular signal-regulated kinase 1/2' (pERK1/2), wobei die Translokation von pERK1/2 wiederum abhängig ist von SERT und ROS. Das pERK1/2 gelangt in den Nucleus und phosphoryliert wiederum den Transkriptionsfaktor GATA-4. Über pGATA-4 wird die Expression von S100 A4 hochreguliert. Eine Bindung an den RAGE erfolgt [193]. Da über den RAGE eine Migration und Proliferation von huPASMIC vermittelt wird und dieses zur Mediaverdickung führen kann, ist eine Beteiligung von S100 A4 und RAGE in der Pathogenese einer PH denkbar.

4.3.3 BDNF und TrkB

Wie in der Einleitung beschrieben, spielen Wachstumsfaktoren eine Rolle im Gefäßumbau im Rahmen der PH. Ein gut beschriebenes Beispiel ist PDGF und sein zugehöriger Rezeptor PDGFR. Schermuly *et al.* zeigten im Rattenmodell zur

Monocrotalin-induzierten PH und im Mausmodell zur Hypoxie-induzierten PH, dass der PDGF-Rezeptorantagonist Imatinib (STI571) eine manifeste PH abmilderte. Dazu wurden Parameter wie die Überlebenszeit, der rechtsventrikuläre Druck und das Ausmaß der Rechtsherzhypertrophie bestimmt. In derselben Studie wurden des Weiteren Patienten mit PAH (2 Patienten mit IPAH, 1 Patient mit Kollagenose-assoziiierter PAH und 1 Patient mit kongenitaler Herzerkrankung) auf die Expression des PDGFR untersucht. In den PAH-Patienten war die Expression des PDGFR signifikant erhöht [197].

BDNF gehört zur Gruppe der Neurotrophine (NTR), einer Polypeptidfamilie von Wachstumsfaktoren [84]. TrkB gehört zur Familie der Tyrosinrezeptorkinasen (Trk) und fungiert als Membranrezeptor für die Neurotrophine BDNF, NT-3 und NT-4/5 [96]. Im Mausmodell zur Hypoxie-induzierten PH konnte eine vermehrte RNA-Expression von TrkB sowohl nach 24h als auch nach 7 und 21d Hypoxieexposition gezeigt werden (persönliche Mitteilung; Dr. biol. hom. G. Kwapiszewska). Damit war TrkB sowohl in der frühen (24h), als auch in der frühen chronischen (7d) und der chronischen (21d) Phase der Hypoxie-induzierten PH hochreguliert. Weitere Untersuchungen müssen klären, inwiefern der Wachstumsfaktor BDNF und sein Rezeptor TrkB in den Gefäßumbau im Rahmen der PH involviert sind.

Es wurde gezeigt, dass diverse Tyrosinrezeptorkinasen in Hypoxie-induzierten und Hypoxie-unabhängigen Formen des Gefäßumbaus auf RNA-Ebene reguliert sind [197, 198]. Eine sauerstoffabhängige Regulation von TrkB konnte in Neuroblastom-abgeleiteten Kellyzellen gezeigt werden, bei denen die Transkription des NTrk2-Genes bei niedrigen Sauerstoffpartialdrücken stimuliert war. Vermittelt wurde dies durch einen HIF-1-abhängigen Mechanismus [199]. Die Familie der Tyrosinrezeptorkinasen (Trk) werden unter anderem durch folgende Wachstumsfaktoren aktiviert: NGF (nerve growth factor) aktiviert TrkA, BDNF (brain-derived neurotrophic factor) und NT-4/5 (Neurotrophin-4/5) aktivieren TrkB und NT-3 (Neurotrophin-3) aktiviert TrkC (siehe **Abbildung 36**). Dabei spielen TrkB und sein Ligand BDNF eine Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Überleben von Neuronen [200]. Zudem wurde gezeigt, dass BDNF und TrkB eine Rolle in nicht-neuronalen Zellen spielen, wie z.B. in VSMC von Ratte und Mensch. Im Gefäßsystem wurde BDNF in EC und VSMC von Herz, Skelettmuskel und den großen Gefäßen beginnend in der späten Gestation bis ins Erwachsenenalter exprimiert gefunden [95, 99]. In Voruntersuchungen konnten wir mittels immunhistochemischer Färbung zeigen, dass BDNF und TrkB in humanem Lungengewebe exprimiert wird. Die Epitope waren vor allem in den Epithelien der Bronchien und den PASMC lokalisiert.

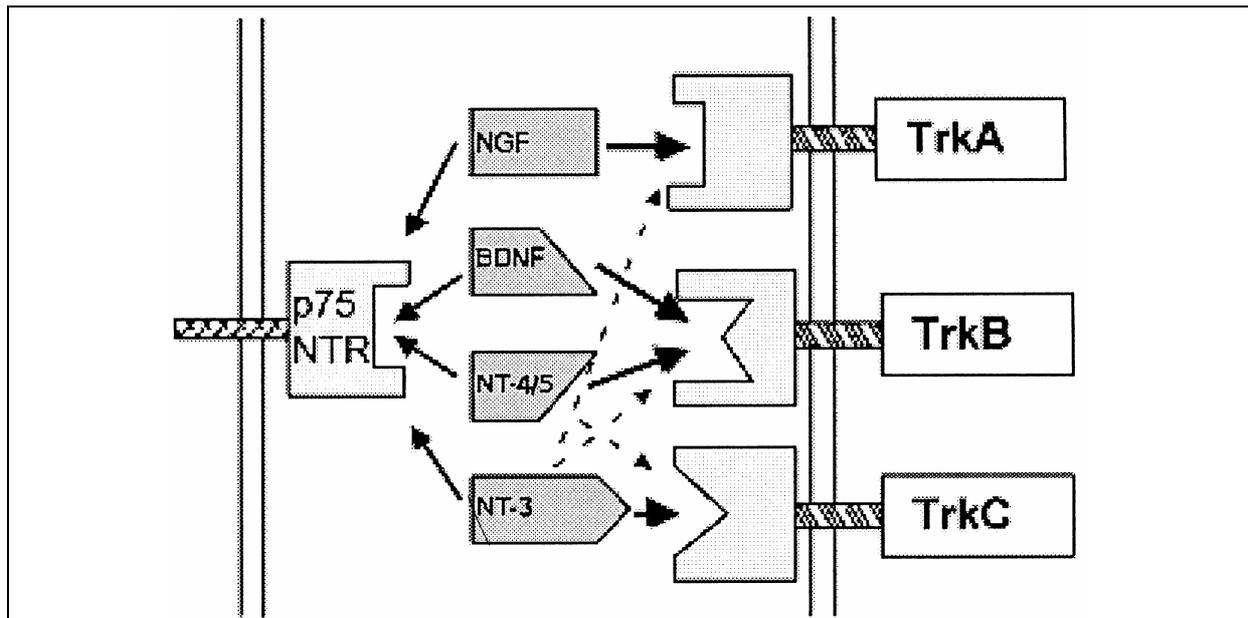


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Ligand-Rezeptor-Beziehung zwischen Neurotrophinen und der Trk-Familie der Tyrosinrezeptorkinasen. (modifiziert nach Wartiovaara [201]) Die dicken Pfeile markieren die primäre Ligand-Rezeptor-Verbindung. Sekundäre Beziehungen, wie sie in speziellen Zellkultursystemen entdeckt wurden, sind durch gestrichelte Pfeile markiert. Alle Neurotrophine interagieren mit p75.

In dieser Arbeit wurden die Expressionen von BDNF und TrkB in Lungenhomogenaten von IPAH- und COPD-Patienten untersucht. BDNF zeigte in IPAH- und COPD-Patienten eine vermehrte RNA-Expression. Auf Proteinebene wurde dies nicht bestätigt. TrkB war ebenfalls auf RNA-Ebene in IPAH- und COPD-Patienten hochreguliert. Auf Proteinebene wurde in IPAH- und COPD-Lungen die trunkierte Form des TrkB nachgewiesen. Es fand sich aber keine vermehrte Proteinexpression im Vergleich zu den Spenderlungen. Interessanterweise fand sich in allen untersuchten IPAH-Patienten auf Proteinebene eine zweite zusätzlich Proteinbande unterhalb der trunkierten Form des TrkB. Eine solche Bande wurde bis jetzt nicht beschrieben. Weitere Untersuchungen müssen klären, welche Rolle diese zusätzliche Proteinbande in IPAH einnimmt (siehe 3.4.2).

Zudem fand die Arbeitsgruppe an laser-mikrodissezierten Pulmonalarterien, dass die RNA-Expression von BDNF und TrkB in IPAH-Patienten hochreguliert war (persönliche Mitteilung; Dr. biol. hom. G. Kwapiszewska). Eine ähnliche Untersuchung zu COPD-Lungen fehlte. Um die Expressionen von BDNF und TrkB auf zellulärer Ebene zu bestimmen wurden isolierte primäre PASMC und adventitielle Fibroblasten aus humanen Pulmonalarterien kultiviert. BDNF zeigte weder in PASMC noch in adventitiellen Fibroblasten eine differentielle Expression auf RNA- und Proteinebene. TrkB zeigte in PASMC von IPAH-Lungen und Fibroblasten von COPD-Lungen eine vermehrte RNA-Expression (siehe 3.4.3). Auf Proteinebene zeigten sich keine differentiellen Expressionen. Dennoch konnte eine BDNF- und TrkB-Expression in huPASMC und adventitiellen Fibroblasten mittels indirekter

Immunfluoreszenz bestätigt werden (siehe **3.3.4** und **3.4.4**). Eine Anfärbung zeigte sich sowohl in Spenderlungen als auch in IPAH- und COPD-Lungen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss von BDNF und TrkB in IPAH und COPD auf zellulärer Ebene zu klären. Gegebenfalls ist ein größerer Stichprobenumfang notwendig, um Mittelwertsunterschiede in den Gruppen zu messen.

Es wird berichtet, dass BDNF und TrkB auf zellulärer Ebene in andere vaskuläre Erkrankungen involviert sind. So zeigten sich erhöhte BDNF-Konzentrationen in Makrophagen und VSMC von arteriosklerotisch-veränderten Koronararterien [95, 202]. Im Rattenmodell wurden nach Deendothelisation der Aorta signifikant erhöhte Expressionen von BDNF und TrkB beobachtet. Die erhöhten Expressionen zeigten sich innerhalb von drei Tagen nach Eingriff und dauerten bis zur Bildung einer Neointima an [95]. Eine lokale Produktion von Neurotrophenen in der sich entwickelnden Neointima könnte eine Akkumulation von VSMC oder sogar eine Arteriogenese initiieren [95, 203]. Eine Rolle von BDNF konnte in der Angiogenese in BDNF^{-/-} Mäusen beobachtet werden. In diesen Mäusen kam es zu Destabilisierung der Gefäßwände im Myokard, was zu intraventrikulären Hämorrhagien und frühem postnatalen Tod geführt hatte [99]. Ähnlich hierzu zeigte sich in TrkB^{-/-} Mäusen eine reduzierte Gefäßformation subepikardial [204]. Zusammengenommen weisen diese Ergebnisse auf eine Beteiligung von BDNF und TrkB in angiogenetischen Prozessen hin.

Da sich im Mausmodell zur Hypoxie-induzierten PH eine Regulation von BDNF und TrkB unter Hypoxieeinwirkung gezeigt hatte, stimulierten wir huPASMC und adventitielle Fibroblasten mit 24h Hypoxie. BDNF zeigte in Fibroblasten von Spender-, IPAH- und COPD-Lungen nach 24 Hypoxiestimulation eine vermehrte RNA-Expression (siehe **3.3.3**). Da BDNF im Lungenhomogenat von IPAH- und COPD-Lungen bereits hochreguliert war, kann nach kurzzeitiger Hypoxiestimulation von einer zusätzlichen Mehrexpression in den Fibroblasten ausgegangen werden. Eine differentielle Expression auf Proteinebene wurde nicht bestätigt. In den Fibroblasten der COPD-Lungen konnte aber nach 24h Hypoxiestimulation eine verstärkte Expression mittels Immunfluoreszenz beobachtet werden (siehe **3.3.4**). Die vermehrte RNA-Expression von BDNF in adventitiellen Fibroblasten von Spenderlungen könnte auf eine Beteiligung von BDNF in der frühen Phase der Hypoxie-induzierten PH deuten. Hier wäre interessant, wie sich längere Hypoxiephasen auf die Expression von BDNF auswirken würden. Hinweis könnte die vermehrte RNA-Expression in COPD-Patienten geben, da in COPD-assoziiierter PH die chronische Hypoxie eine wichtige Rolle spielt. Interessant wäre außerdem, wie BDNF im Verlauf einer Hypoxie-induzierten PH differentiell exprimiert wird. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob eine Verbindung von BDNF und dem

Transkriptionsfaktor HIF-1 in pulmonal-arteriellen Zellen von PH-Patienten besteht. Nakamura *et al.* zeigten eine Beteiligung von BDNF an der Regulation von VEGF und HIF-1 α in Neuroblastomzellen. Die durch BDNF stimulierte Mehrexpression von VEGF und HIF-1 α benötigte die Tyrosinkinaseaktivität des TrkB-Rezeptors. Eine erhöhte VEGF-Expression in Neuroblastomen korrelierte dabei mit einer schlechten Prognose [205].

Die Untersuchungen zur TrkB-Expression in PASMC und adventitiellen Fibroblasten nach 24h Hypoxiestimulation sahen wie folgt aus: In PASMC von COPD-Lungen war TrkB nach 24h Hypoxieexposition auf RNA- und Proteinebene hochreguliert. In Fibroblasten zeigte sich in IPAH-Lungen eine vermehrte RNA-Expression von TrkB (siehe 3.4.3). Martens *et al.* konnten zeigen, dass NTrk2 ein sauerstoffreguliertes Gen ist, welches für TrkB codiert und durch HIF-1 stimuliert wird. Nach Inkubation von Neuroblastomzellen in 24h Hypoxie (FiO₂=0,01) konnte eine erhöhte Migration der Zellen beobachtet werden. Eine erhöhte Konzentration von TrkB korrelierte mit einer schlechteren Prognose in Neuroblastomen [199]. Folglich könnten höhere Konzentrationen von BDNF und TrkB proliferativ und migrationssteigernd auf die PASMC wirken. Die Hochregulation der Zielgene, z.B. von VEGF kann zusätzlich den Gefäßumbau vorantreiben.

Weiterhin konnte in Neuroblastomen gezeigt werden, dass der BDNF-/TrkB-Signalweg einen anti-apoptotischen bzw. proliferativen Effekt besitzt [206]. Dieser proliferative Effekt war abhängig von der TrkB-Aktivierung und anschließender Phosphorylierung der 'extracellular signal-regulated kinase' (ERK). So dimerisiert der TrkB-Rezeptor nach Bindung durch einen Liganden und autophosphoryliert seine spezifischen Tyrosinreste. Über diesen Mechanismus wurden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst [90]. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die intrazellulären Signalkaskaden, welche von BDNF und TrkB ausgelöst werden, zu beschreiben. Die Ergebnisse dazu könnten wichtige Hinweise zu der Entstehung von Proliferation und Migration in PASMC im Rahmen einer PH liefern.

4.3.4 TSP-1 und CD36

CD36, auch Glykoprotein IV genannt, ist eines der Rezeptormoleküle, mit deren Hilfe Makrophagen apoptotische Zellen erkennen und phagozytieren können [207]. Über den CD36-Rezeptor werden apoptotische Zellen erkannt [208], ähnlich wie mittels des Vitronectin-Rezeptors [209]. Eines der wichtigsten Moleküle, das als „molekulare Brücke“ zwischen Makrophagen und apoptotischen Zellen funktioniert, ist das Glykoprotein TSP-1. CD36 steht in Verbindung mit sehr verschiedenen Funktionen des Organismus, wie Zelladhäsion und Zelldifferenzierung und auch mit diversen Erkrankungen (z. B. Atherosklerose, Myokardinfarkt) [119, 210]. Es wurde assoziiert mit Prozessen wie Oponierungsrezeptorfunktion, Fettmetabolismus,

Entzündungsgeschehen, Angiogenese und TGF- β -Aktivierung [211, 212]. Das Protein konnte auf vielen Zellen (z. B. EC, SMC) nachgewiesen werden und fungiert dort als Rezeptor für TSP-1 [213]. Die Thrombospondine bilden eine Familie aus fünf extrazellulären Matrixproteinen mit unterschiedlichen Effekten im Bereich der Zelladhäsion, -motilität, -proliferation und dem Überleben der Zellen [210, 214, 215]. TSP-1 scheint im Rahmen physiologischer und pathologischer Prozesse, die mit einer niedrigen Sauerstoffspannung einhergehen (Wundheilung, Invasion von Tumorzellen, Angiogenese), eine Rolle zu spielen [216]. Es lässt sich in großer Menge in Thrombozyten finden, wird bei der Thrombin-abhängigen Aktivierung von Blutplättchen sezerniert, bindet an die Plättchenoberfläche und bewirkt durch Interaktion mit Fibrinogen/Fibrin dessen Aggregation [215]. Des Weiteren wird es von EC und SMC synthetisiert [217, 218]. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von L-TGF- β 1 an aktivierten Alveolarmakrophagen neben Plasmin auch TSP-1 und CD36 benötigt [211]. Inaktives TGF- β 1 und TSP-1 bilden einen Komplex, der sich mit CD36 verbindet, wodurch die Freisetzung von aktivem TGF- β 1 ermöglicht wird. TGF- β ist für verschiedene durch Gefäßverletzungen hervorgerufene Prozesse (SMC- und Fibroblasten-Proliferation, Matrix-Synthese und -Ablagerung) verantwortlich. In der Einführung der Diskussion wurde die Beteiligung des BMPR2-Gen, welches zur TGF- β -Superfamilie gerechnet wird, im Rahmen der idiopathischen PAH (IPAH) beschrieben [21]. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Verbindung von TSP-1 und CD36 mit TGF- β im Rahmen der IPAH zu ermitteln und TSP-1 und CD36 in den Pathomechanismus der PH einzuordnen.

Kwapiszewska *et al.* zeigten im Mausmodell zur Hypoxie-induzierten PH, dass TSP-1 nach 24h und 7d Hypoxie auf RNA-Ebene hochreguliert war. TSP-1 war so in der frühen (24h) und frühen chronischen (7d) Phase der Hypoxieexposition auf RNA-Ebene verstärkt exprimiert. CD36 war nach 24h Hypoxieexposition hochreguliert, zeigte aber nach längerer Hypoxieeinwirkung (21d) eine Mindereexpression. Die Genregulationen zeigten sich jeweils in mikrodissezierten Pulmonalarterien. Eine Genregulation im Lungenhomogenat von Mäusen konnte nicht nachgewiesen werden. Die Lokalisation von CD36 wurde mittels Immunhistochemie in den Pulmonalarterien bestätigt [68]. Die Ergebnisse aus dem Mausmodell weisen auf eine spezifische Genregulation im Bereich der Pulmonalarterien und Widerstandsgefäßen im Rahmen der Hypoxie-induzierten PH hin.

In dieser Arbeit wurde keine differentielle RNA-Expression von TSP-1 im Lungenhomogenat von IPAH- und COPD-Patienten gemessen. Es zeigte sich aber eine vermehrte Proteinexpression von TSP-1 im Lungenhomogenat von COPD-Lungen (siehe **3.5.2**). In adventitiellen Fibroblasten von COPD-Lungen wurde eine verminderte RNA-Expression gemessen. Auf Proteinebene zeigte sich keine differentielle Expression. Die Hochregulation auf Proteinebene im Lungenhomogenat

zusammen mit der Herabregulation in Fibroblasten auf RNA-Ebene erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich. Möglicherweise ist TSP-1 in humanen PH-Formen nicht nur in den Pulmonalarterien reguliert, sondern auch in einem anderen Kompartiment. Eine Kompartiment-spezifische Untersuchung von Lungenhomogenaten aus PH-Patienten könnte diesen Sachverhalt klären. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass weder in PASMC noch in adventitiellen Fibroblasten von COPD-Lungen eine positive Anfärbung von TSP-1 mittels Immunfluoreszenz gezeigt wurde. Interessanterweise zeigten sich aber in den PASMC der Kontrollgruppe und den Fibroblasten der IPAH-Gruppe eine zytoplasmatische Expression von TSP-1 (siehe **3.5.4**). Offenbar gibt es Expressionsunterschiede zwischen kultivierten Fibroblasten und dem Lungengewebe bezüglich TSP-1.

CD36 zeigte keine differentielle RNA-Expression im Lungenhomogenat von COPD- und IPAH-Lungen. Auf Proteinebene zeigte CD36 aber eine vermehrte Expression in IPAH-Lungen (siehe **3.6.2**). Möglicherweise war auch hier eine differentielle RNA-Expression zu den Zeitpunkten der Messung nicht messbar gewesen. Im Mausmodell zur Hypoxie-induzierten PH wurde mittels Immunhistochemie eine Expression von CD 36 in Pulmonalarterien bestätigt [68]. In isolierten PASMC von IPAH-Lungen wurde eine vermehrte RNA-Expression von CD36 gemessen. Zusätzlich zeigte sich in der indirekten Immunfluoreszenz eine Expression von CD36 in adventitiellen Fibroblasten. So könnte in Pulmonalarterien von IPAH-Patienten die differentielle Expression von CD36 ebenfalls eine Rolle spielen. In der COPD-Gruppe wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz eine CD36-Expression in PASMC und Fibroblasten gezeigt. Ebenfalls zeigte sich eine CD36-Expression in Fibroblasten von Spenderlungen. Zumindest in PASMC der COPD-Gruppe kann von einer krankheitsspezifischen Expression ausgegangen werden. Auf RNA- und Proteinebene wurde dies nicht bestätigt. Zusätzlich konnte in allen positiv gefärbten Zellen eine diffus fleckförmige Verteilung von CD36 beobachtet werden (siehe Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.). In den Fibroblasten zeigte sich eine unspezifische Expression von CD36 in allen untersuchten Gruppen. Die gewonnenen Ergebnisse sollten in weiteren Experimenten überprüft werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit der Einfluss einer 24h Hypoxiestimulation auf die Expression von TSP-1 und CD36 in PASMC und adventitiellen Fibroblasten untersucht. So zeigte TSP-1 in PASMC von Spenderlungen eine verminderte RNA-Expression nach Hypoxiestimulation. Möglicherweise ist TSP-1 in die frühe hypoxische Adaptation von Pulmonalarterien aus Spendern involviert. Zudem wurde eine vermehrte Expression in Fibroblasten von IPAH- und COPD-Lungen beobachtet. Dies weist auf eine Regulation von TSP-1 in IPAH und COPD nach kurzzeitiger Hypoxiestimulation hin. Interessanterweise trägt chronische Hypoxie entscheidend zur Entwicklung der COPD-assoziiertes PH bei. Im Lungenhomogenat

von COPD-Lungen zeigte sich bereits eine Hochregulation auf Proteinebene (siehe **3.5.2**).

CD36 zeigte in Fibroblasten von COPD-Lungen eine vermehrte RNA-Expression nach 24h Hypoxiestimulation. In der Immunfluoreszenz zeigte sich ebenfalls eine vermehrte Expression von CD36 in Fibroblasten von COPD-Lungen nach der Hypoxiestimulation (siehe 3.6.5).

Eine Regulation von CD36 in pulmonal-arteriellen Fibroblasten im Rahmen einer COPD-assoziierten PH ist denkbar. Der zusätzliche Hypoxiestimulus könnte ein wichtiger Faktor in der Entstehung humaner Formen der PH sein. Weiterhin muss geklärt werden, ob eine Assoziation von TSP-1 und CD36 mit dem Transkriptionsfaktor HIF vorliegt, welcher in Hypoxie-assoziierten und Hypoxie-unabhängigen Formen der PH eine Rolle spielt [142]. Hierzu gibt es bisher keine Untersuchung. Osada-Oka *et al.* zeigten jedoch, dass TSP-1 unter Hypoxie die Migration von SMC in Koronararterien fördert. Dabei wurde die Expression von TSP-1 durch HIF-1 α reguliert [219]. Nach leichten Gefäßverletzungen konnte eine Aktivierung von VSMC durch TSP-1 nachgewiesen werden. TSP-1 induziert dabei eine Proliferation und Migration der VSMC mit Ausbildung einer Neointima [220]. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TSP-1 neben β 1-Integrin in die Thrombozyten-vermittelte Proliferation von VSMC involviert ist [221]. TSP-1 und sein Rezeptor CD36 können somit in die Pathogenese und den Gefäßumbau im Rahmen von IPAH und COPD-assoziiierter PH involviert sein.

Untersuchungen haben gezeigt, dass chronische Lungenischämie (z.B. Komplikation einer Endarterektomie oder Lungenembolie) eine Überexpression von proapoptotischen Faktoren fördert. Daraus resultierte eine endotheliale Dysfunktion mit signifikantem Anstieg des Endothelzelluntergangs. Einer der stärksten regulierten Gene war dabei TSP-1 [222]. Primo *et al.* zeigten, dass CD36, getriggert durch TSP-1, die Angiogenese über eine Stimulation von VEGF-A hemmt [223]. Im Umkehrschluss konnte eine Förderung der Angiogenese mit Proliferation und Migration der EC durch Immobilisierung von TSP-1 erreicht werden [214]. Es existieren verschiedene Mechanismen, welche den anti-angiogenetischen Effekt vermitteln (**Abbildung 37**): (a) In mikrovaskulären EC der Dermis konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von TSP-1 an CD36 eine Hochregulation des Fas-Liganden (Fas-L) vermittelt wird, was wiederum zu einer Aktivierung von Apoptose-Signalkaskaden führt. Die Bedeutung des Fas-L und TSP-1 konnte in weiteren Studien belegt werden. So konnte in Fas- bzw. Fas-L-defizienten Mäusen TSP-1 nicht die Neovaskularisation in der Kornea hemmen [224]. (b) Ein zweiter potentieller Mechanismus anti-angiogenetischer Effekte durch TSP-1 war die Inhibition der Proliferation mikrovaskulärer EC der Dermis. Es konnte gezeigt werden, dass TSP-1 über Caspase-unabhängige Signalkaskaden die Hemmung des Zellzyklus in der

G₀/G₁-Phase vermittelt. Ein zugehöriger Rezeptor für die Hemmung des Zellzyklus konnte nicht identifiziert werden [225]. (c) Die Interaktion mit den Metalloproteinasen-2 und -9 (MMP-2/9) stellt ebenfalls einen potentiellen Mechanismus anti-angiogentischer Effekte durch TSP-1 dar. Hier konnte TSP-1 die MMP-2/9-Aktivität über Komplexbildung hemmen [226]. Die Komplexbildung wiederum interagiert mit dem 'low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP)', welcher wie CD36 einen 'scavenger'-Rezeptor darstellt, und letztendlich in Lysosomen degradiert wird [227].

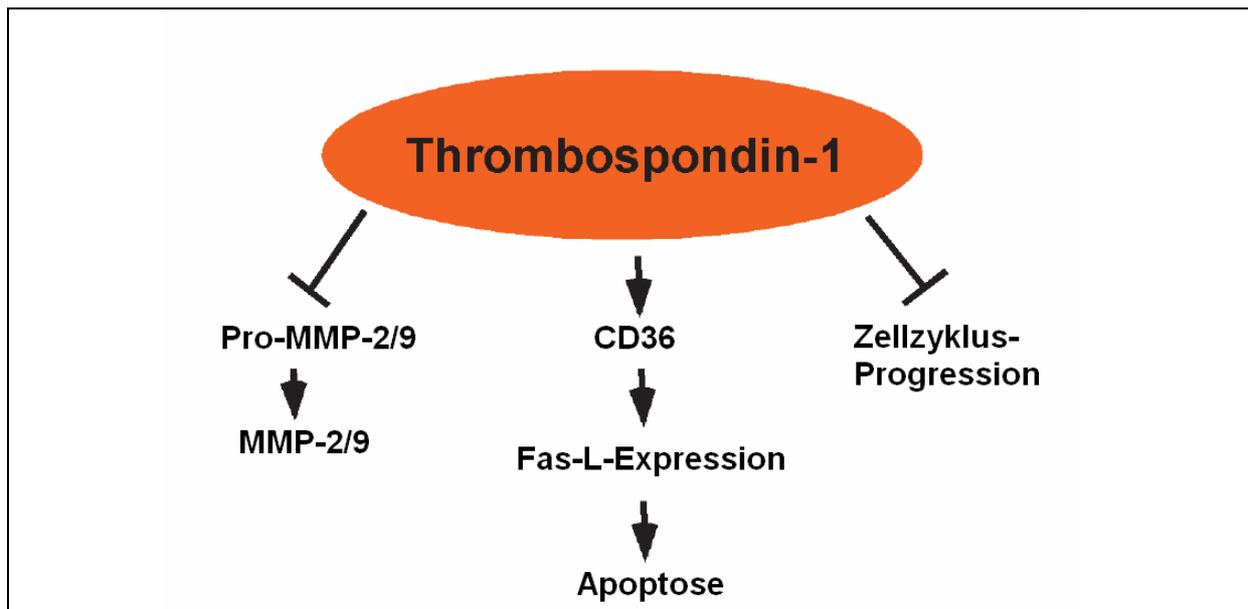


Abbildung 37: Inhibition der Angiogenese durch TSP-1. (entnommen aus [228]) (→) bedeutet Induktion, (⊥) bedeutet Inhibition, Metalloproteinasen (MMP).

Zusätzlich konnten Isenberg *et al.* zeigen, dass der Stickstoffmonoxid(NO)-Signalweg über TSP-1 inhibiert werden kann. In Tumoren vermittelt NO eine Neovaskularisation und besitzt zudem pro-angiogenetische Effekte durch Interaktion mit dem VEGF-A. Außerdem stellt NO einen potenten Vasodilatator im Gefäßsystem dar [229]. Intrazellulär wirkt NO auf das cyclische Guanosinmonophosphat (cGMP), welches in diversen Signalkaskaden im Rahmen von vaskulären Zellfunktionen involviert ist. TSP-1 ist ein potenter Inhibitor des NO-Signalweges in EC, VSMC und Thrombozyten [230-232]. Die Inhibition des NO-Signalweges durch TSP-1 wird in EC und VSMC über die Rezeptoren CD36 und CD47 vermittelt [233]. Es wird vermutet, dass die Angiogenese über die TSP-1/Rezeptorbindung auf der Stufe der cGMP-abhängigen Kinase gehemmt wird [234].

Weitere Untersuchungen zu intrazellulären Signalkaskaden müssen klären, wie TSP-1 und CD36 einen anti-angiogenetischen Effekt im Rahmen der PH vermitteln und über deren Inhibition möglicherweise eine Proliferation und letztendlich der Gefäßumbau induziert werden könnte. Hierzu könnten Untersuchungen an der Zellkultur von EC, PASMC und adventitiellen Fibroblasten aus Pulmonalarterien klären, ob TSP-1 und

CD36 eine funktionelle Rolle in diesen Zellarten einnehmen und gegebenenfalls eine Proliferation und/oder Migration induzieren können.

4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Ziel der Arbeit war es, ausgewählte Gene und Proteine, die im Mausmodell der Hypoxie-induzierten PH als reguliert identifiziert wurden, bezüglich ihrer Regulation bei primärer (IPAH) und sekundärer (COPD-assoziiert) PH zu untersuchen.

Eine Regulation auf RNA- oder Proteinebene konnte –unterschiedlich stark ausgeprägt– bei allen untersuchten Genen und Proteinen gezeigt werden. In welchem Ausmaß die untersuchten Gene und Proteine Einfluss auf den Gefäßumbau nehmen, sollte Gegenstand weiterer Nachforschungen sein. Es wurden die Expressionen der Gene und Proteine sowohl im Lungenhomogenat, als auch in isolierten primären PASMC und Fibroblasten der Pulmonalarterie untersucht. Dabei war das Zielkompartiment das arterielle Pulmonalgefäß, wo letztendlich der Gefäßumbau der PH stattfindet. Die Hypoxie-Inkubation der untersuchten Zellen war dabei als zusätzlicher Stimulus gedacht, welcher eine differentielle Expression der Gene und Proteine induzieren könnte. Unterschiedliche Expressionen konnten auf RNA- und Proteinebene, sowie in der Immunfluoreszenz beobachtet werden. Die gewonnen Erkenntnisse könnten sowohl pathologische, diagnostische als auch therapeutische Relevanz für die IPAH und COPD-assoziierte PH besitzen.

Die IPAH geht mit einer Erhöhung des pulmonal-arteriellen Druckes einher. Eine genaue Entschlüsselung des Pathomechanismus fehlt noch derzeit. Genetische Faktoren, wie Mutationen im BMPR2-Gen, sind bei einem Teil der Fälle nachgewiesen. Im fortgeschrittenen Stadium der COPD kann es ebenfalls zu einer PH kommen. Diese entsteht u.a. durch chronisch-alveoläre Hypoxie und Inflammation infolge von Zigarettenrauch.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal beschrieben, dass die Kandidatengene und -proteine in diesen Erkrankungen eine Rolle spielen. In weiteren Nachforschungen könnten Interaktionspartner, Signalkaskaden und -mechanismen der hier untersuchten Gene und Proteine exploriert werden. Dies könnte weiteren Aufschluss über die komplexen Pathomechanismen im Rahmen von IPAH und COPD geben und/oder neue Möglichkeiten therapeutischer Ansätze eröffnen.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale Hypertonie (PH) tritt idiopathisch (IPAH/FPAH) oder sekundär als Folge anderer Erkrankungen auf. Bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und nach chronischer Hypoxie kann sich eine PH über eine hypoxische Vasokonstriktion entwickeln. Allen Formen gemeinsam ist ein pulmonaler Widerstandshochdruck und ein Gefäßumbau der Pulmonalarterien (vascular remodelling). Die zugrunde liegenden Signalwege sind nur lückenhaft bekannt.

In dieser Arbeit sollten 6 Kandidatengene und -proteine (FHL-1, S100 A4, BDNF, TrkB, TSP-1 und CD36), die zuvor im Mausmodell der Hypoxie-bedingten PH als reguliert identifiziert wurden, bei idiopathischer und sekundärer PH charakterisiert werden. In einem ersten Schritt wurden Proben von Lungenhomogenat aus IPAH- und COPD-Patienten mit denen von Spendern verglichen. Dazu wurden quantitative PCR und Western Blot eingesetzt. FHL-1, S100 A4, BDNF und TrkB zeigten in IPAH- und COPD-Patienten eine veränderte mRNA-Expression im Vergleich zu den Spendern. Zudem zeigten sich Regulationen in IPAH- und COPD-Patienten auf Proteinebene (IPAH: FHL-1 und CD36; COPD: TSP-1). Um mögliche Expressionsveränderungen im vaskulären Kompartiment zu beurteilen, wurden primäre pulmonal-arterielle Gefäßmuskelzellen (PASMC) und Fibroblasten der Adventitia isoliert und unter normoxischen Bedingungen kultiviert ($FiO_2=0,21$). Expressionsveränderungen der Kandidatengene und -proteine (FHL-1, S100 A4, BDNF, TrkB, TSP-1 und CD36) in IPAH- und COPD-Patienten wurden mit denen von Spendern verglichen. Hierzu wurden die quantitative PCR, Western Blot und die indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Es bestätigte sich eine differentielle mRNA-Expression in isolierten Primärzellen aus IPAH- (PASMC: FHL-1, TrkB und CD36) und COPD-Lungen (PASMC: FHL-1; adventitielle Fibroblasten: BDNF und TSP-1). Zudem wurde FHL-1 in isolierten primären PASMC und adventitiellen Fibroblasten aus IPAH-Lungen auf Proteinebene als reguliert gefunden. In einem nächsten Schritt wurde die basale Expression der Kandidatengene und -proteine mit der Expression nach Hypoxiestimulation verglichen (24h; $FiO_2=0,01$). Auf mRNA-Ebene führte die Hypoxiestimulation zu einer differentiellen Expression in Zellen aus IPAH- (adventitielle Fibroblasten: FHL-1 und TSP-1) und COPD-Lungen (PASMC: S100 A4 und TrkB; adventitielle Fibroblasten: FHL-1, TSP-1 und CD36).

Weiterhin wurde die zelluläre Lokalisation der Kandidatenproteine in PASMC und adventitiellen Fibroblasten mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Es zeigte sich in erster Linie eine Lokalisation im Zytoplasma.

Die Ergebnisse belegen, dass die untersuchten Gene und Proteine im Gefäßumbau im Rahmen der IPAH und COPD-assoziierten PH reguliert sind. Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine Beteiligung zugrundeliegender Signalkaskaden in IPAH

und COPD-assoziiertes PH hin. Zudem könnten sie Ansatzpunkte für neue diagnostische und therapeutische Verfahren werden.

6 Summary

Pulmonary hypertension exists in an idiopathic form (IPAH/FPAH) as well as secondary to different diseases. In chronic obstructive lung disease (COPD) and chronic hypoxia, pulmonary hypertension may develop via hypoxic vasoconstriction. All forms of pulmonary hypertension are characterised by an increase of pulmonary resistance followed by vascular remodelling. The underlying signalling pathways are poorly understood.

In previous studies, using the mouse model of hypoxia-induced pulmonary hypertension, six candidate genes and proteins (FHL-1, S100 A4, BDNF, TrkB, TSP-1 and CD36) were identified to be regulated in vascular remodelling. The aim of this study was to characterise their role in vascular remodelling of idiopathic and secondary pulmonary hypertension in humans. At first, samples from lung homogenate of IPAH and COPD patients were compared to donors using quantitative PCR and Western Blot. The mRNA expression levels for FHL-1, S100 A4, BDNF and TrkB revealed higher regulation in IPAH and COPD patients as compared to donor lungs. In addition, protein levels were regulated in IPAH and COPD patients (IPAH: FHL-1 and CD36; COPD: TSP-1). Focussing on the vascular compartment of IPAH and COPD lungs, primary pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) and adventitial fibroblasts were isolated and cultivated under normoxic conditions ($FiO_2=0.21$). Expression levels of FHL-1, S100 A4, BDNF, TrkB, TSP-1 and CD36 in cells from IPAH and COPD patients were compared to donors using quantitative PCR, Western Blot and indirect immunofluorescence. Differential mRNA expression levels were confirmed to be regulated in isolated primary cells of IPAH (PASMC: FHL-1, TrkB and CD36) and COPD lungs (PASMC: FHL-1; adventitial fibroblasts: BDNF and TSP-1). In addition, FHL-1 showed pronounced protein levels in isolated primary PASMC and adventitial fibroblasts of IPAH lungs. Furthermore, basal expression levels were compared to those under hypoxic stimulation (24h; $FiO_2=0.01$). On mRNA level, hypoxic stimulation were leading to a differential expression in cells of IPAH (adventitial fibroblasts: FHL-1 and TSP-1) and COPD lungs (PASMC: S100 A4 and TrkB; adventitial fibroblasts: FHL-1, TSP-1 and CD36).

Using indirect immunofluorescence we checked for cellular localisation of the candidate proteins in PASMC and adventitial fibroblasts. Predominantly, most of the proteins were localising to the cytoplasm.

This report shows differential expression levels of the examined genes and proteins in vascular remodelling of IPAH and COPD-associated pulmonary hypertension. The results point to an involvement of the underlying signalling cascades in IPAH and

COPD-associated pulmonary hypertension and could be of interest for new diagnostic and therapeutic strategies.

7 Literaturverzeichnis

1. I, L. (2004): Neues über pulmonale Hypertension. *Journal für Kardiologie*
2. U.N. Riede, H. E. S. (1999): *Allgemeine und spezielle Pathologie* Vol. 4, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
3. Olschewski, H., and Seeger, W. (2000): [Treatment of pulmonary artery hypertension]. *Pneumologie* 54, 222-224
4. Christman BW, M. C., Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, and Loyd JE (1992): An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327, 70-75
5. Archer, S., and Rich, S. (2000): Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation* 102, 2781-2791
6. Barst, R. J., and Loyd, J. E. (1998): Genetics and immunogenetic aspects of primary pulmonary hypertension. *Chest* 114, 231S-236S
7. Weissmann, N., Gerigk, B., Kocer, O., Nollen, M., Hackemack, S., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Butrous, G., Schulz, A., Roth, M., Seeger, W., and Grimminger, F. (2007): Hypoxia-induced pulmonary hypertension: different impact of iloprost, sildenafil, and nitric oxide. *Respir Med* 101, 2125-2132
8. Strange, J. W., Wharton, J., Phillips, P. G., and Wilkins, M. R. (2002): Recent insights into the pathogenesis and therapeutics of pulmonary hypertension. *Clin Sci (Lond)* 102, 253-268
9. Durmowicz, A. G., and Stenmark, K. R. (1999): Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Pediatr Rev* 20, e91-e102
10. 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
11. Tuder, R. M., Groves, B., Badesch, D. B., and Voelkel, N. F. (1994): Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 144, 275-285
12. Wenger, R. H. (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16, 1151-1162
13. Meyrick, B., and Reid, L. (1980): Hypoxia-induced structural changes in the media and adventitia of the rat hilar pulmonary artery and their regression. *Am J Pathol* 100, 151-178
14. Kourembanas, S., Morita, T., Liu, Y., and Christou, H. (1997): Mechanisms by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int* 51, 438-443

15. Wagenvoort CA , M. M. (1993): Vascular Diseases. In *Pulmonary Pathology* (Dail DH, H. S., ed) pp. 985-1025, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
16. Zohlhofer, D., Klein, C. A., Richter, T., Brandl, R., Murr, A., Nuhrenberg, T., Schomig, A., Baeuerle, P. A., and Neumann, F. J. (2001): Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation* 103, 1396-1402
17. Gaine, S. P., and Rubin, L. J. (1998): Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 352, 719-725
18. Bjornsson, J., and Edwards, W. D. (1985): Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clin Proc* 60, 16-25
19. Geraci, M. W., Gao, B., Hoshikawa, Y., Yeager, M. E., Tuder, R. M., and Voelkel, N. F. (2001): Genomic approaches to research in pulmonary hypertension. *Respir Res* 2, 210-215
20. Newman, J. H., and Lane, K. B. (2000): Hypertensive pulmonary vascular disease: dawn of the age of prevention? *Am J Respir Crit Care Med* 162, 2020-2021
21. Machado, R. D., Pauciulo, M. W., Thomson, J. R., Lane, K. B., Morgan, N. V., Wheeler, L., Phillips, J. A., 3rd, Newman, J., Williams, D., Galie, N., Manes, A., McNeil, K., Yacoub, M., Mikhail, G., Rogers, P., Corris, P., Humbert, M., Donnai, D., Martensson, G., Tranebjaerg, L., Loyd, J. E., Trembath, R. C., and Nichols, W. C. (2001): BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* 68, 92-102
22. Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002): Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell* 13, 3055-3063
23. Palevsky, H. I., Schloo, B. L., Pietra, G. G., Weber, K. T., Janicki, J. S., Rubin, E., and Fishman, A. P. (1989): Primary pulmonary hypertension. Vascular structure, morphometry, and responsiveness to vasodilator agents. *Circulation* 80, 1207-1221
24. Yuan, J. X., and Rubin, L. J. (2005): Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. *Circulation* 111, 534-538
25. Acker, H. (1994): Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol* 95, 1-10
26. Boutilier, R. G., and J. St-Pierre (2000): Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 126:481
27. H, A. (1994): Mechanisms and meaning of cellular oxygen sensing in the organism. *Respir Physiol*

28. Semenza, G. (2002): Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 64, 993-998
29. Schmidt RF, T. G., Lang F (2000): In *Physiologie des Menschen*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
30. Liu, Q., Sham, J. S., Shimoda, L. A., and Sylvester, J. T. (2001): Hypoxic constriction of porcine distal pulmonary arteries: endothelium and endothelin dependence. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L856-865
31. Voelkel, N. F., and Tuder, R. M. (1995): Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 8, 2129-2138
32. Weissmann, N., Winterhalder, S., Nollen, M., Voswinckel, R., Quanz, K., Ghofrani, H. A., Schermuly, R. T., Seeger, W., and Grimminger, F. (2001): NO and reactive oxygen species are involved in biphasic hypoxic vasoconstriction of isolated rabbit lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L638-645
33. G, T. (1997): Euler-Liljestrand-Mechanismus. In *Physiologie des Menschen* (Schmidt RF, T. G., ed) p. 588, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
34. Lüllman-Rauch, R. (2003): *Histologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
35. Higenbottam, T., and Cremona, G. (1993): Acute and chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 6, 1207-1212
36. Jeffery, T. K., and Wanstall, J. C. (2001): Comparison of pulmonary vascular function and structure in early and established hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Can J Physiol Pharmacol* 79, 227-237
37. Faller, D. V. (1999): Endothelial cell responses to hypoxic stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 74-84
38. Quinlan, T. R., Li, D., Laubach, V. E., Shesely, E. G., Zhou, N., and Johns, R. A. (2000): eNOS-deficient mice show reduced pulmonary vascular proliferation and remodeling to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L641-650
39. Takahashi, H., Soma, S., Muramatsu, M., Oka, M., and Fukuchi, Y. (2001): Upregulation of ET-1 and its receptors and remodeling in small pulmonary veins under hypoxic conditions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280, L1104-1114
40. Botney, M. D., Liptay, M. J., Kaiser, L. R., Cooper, J. D., Parks, W. C., and Mecham, R. P. (1993): Active collagen synthesis by pulmonary arteries in human primary pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 143, 121-129
41. Stenmark, K. R., Fagan, K. A., and Frid, M. G. (2006): Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res* 99, 675-691

42. Botney, M. D., Bahadori, L., and Gold, L. I. (1994): Vascular remodeling in primary pulmonary hypertension. Potential role for transforming growth factor-beta. *Am J Pathol* 144, 286-295
43. Stenmark, K. R., and Mecham, R. P. (1997): Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling. *Annu Rev Physiol* 59, 89-144
44. Stenmark, K. R., Gerasimovskaya, E., Nemenoff, R. A., and Das, M. (2002): Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 122, 326S-334S
45. Rabe, K. F., Hurd, S., Anzueto, A., Barnes, P. J., Buist, S. A., Calverley, P., Fukuchi, Y., Jenkins, C., Rodriguez-Roisin, R., van Weel, C., and Zielinski, J. (2007): Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 532-555
46. Halbert, R. J., Isonaka, S., George, D., and Iqbal, A. (2003): Interpreting COPD prevalence estimates: what is the true burden of disease? *Chest* 123, 1684-1692
47. (2003): *European Respiratory Society. European lung white book. Huddersfield, UK: European Respiratory Society Journals*
48. Hogg, J. C. (2004): Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 364, 709-721
49. Birring, S. S., Brightling, C. E., Bradding, P., Entwisle, J. J., Vara, D. D., Grigg, J., Wardlaw, A. J., and Pavord, I. D. (2002): Clinical, radiologic, and induced sputum features of chronic obstructive pulmonary disease in nonsmokers: a descriptive study. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 1078-1083
50. Owen, C. A. (2008): Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 3, 253-268
51. Stoller, J. K., and Aboussouan, L. S. (2005): Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 365, 2225-2236
52. Blanco, I., de Serres, F. J., Fernandez-Bustillo, E., Lara, B., and Miravittles, M. (2006): Estimated numbers and prevalence of PI*S and PI*Z alleles of alpha1-antitrypsin deficiency in European countries. *Eur Respir J* 27, 77-84
53. Soriano, J. B., Visick, G. T., Muelleroval, H., Payvandi, N., and Hansell, A. L. (2005): Patterns of comorbidities in newly diagnosed COPD and asthma in primary care. *Chest* 128, 2099-2107
54. Wouters, E. F. (2003): Introduction: systemic effects in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 46, 1s
55. Emery, C. J. (1994): Vascular remodelling in the lung. *Eur Respir J* 7, 217-219
56. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary

- disease: NHLBI/WHO workshop report, updated 2005. Bethesda, MD: National Heart, Lung and Blood Institute, 2005. GOLDWkshp05Clean.pdf.
57. Scharf, S. M., Iqbal, M., Keller, C., Criner, G., Lee, S., and Fessler, H. E. (2002): Hemodynamic characterization of patients with severe emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 314-322
 58. Oswald-Mammosser, M., Apprill, M., Bachez, P., Ehrhart, M., and Weitzenblum, E. (1991): Pulmonary hemodynamics in chronic obstructive pulmonary disease of the emphysematous type. *Respiration* 58, 304-310
 59. Barbera, J. A., Peinado, V. I., and Santos, S. (2003): Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21, 892-905
 60. Chaouat, A., Bugnet, A. S., Kadaoui, N., Schott, R., Enache, I., Ducolone, A., Ehrhart, M., Kessler, R., and Weitzenblum, E. (2005): Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 172, 189-194
 61. Weitzenblum, E., Sautegeau, A., Ehrhart, M., Mammosser, M., and Pelletier, A. (1985): Long-term oxygen therapy can reverse the progression of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 131, 493-498
 62. Semenza, G. L., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B. H., Leung, S., Roe, R., Wiener, C., and Yu, A. (1997): Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1. *Kidney Int* 51, 553-555
 63. Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M., and Michiels, C. (2001): Transduction pathways involved in Hypoxia-Inducible Factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radic Biol Med* 31, 847-855
 64. Barazzone, C., and White, C. W. (2000): Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia: role of cytokines and Bcl-2 family proteins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22, 517-519
 65. Tuder, R. M., and Voelkel, N. F. (1998): Pulmonary hypertension and inflammation. *J Lab Clin Med* 132, 16-24
 66. Demiryurek, A. T., and Wadsworth, R. M. (1999): Superoxide in the pulmonary circulation. *Pharmacol Ther* 84, 355-365
 67. Raj, U., and Shimoda, L. (2002): Oxygen-dependent signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L671-677
 68. Kwapiszewska, G., Wilhelm, J., Wolff, S., Laumanns, I., Koenig, I. R., Ziegler, A., Seeger, W., Bohle, R. M., Weissmann, N., and Fink, L. (2005): Expression profiling of laser-microdissected intrapulmonary arteries in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir Res* 6, 109
 69. Kwapiszewska, G., Wygrecka, M., Marsh, L. M., Schmitt, S., Trösser, R., Wilhelm, J., Helmus, K., Eul, B., Zakrzewicz, A., Ghofrani, H. A., Schermuly,

- R. T., Bohle, R. M., Grimminger, F., Seeger, W., Eickelberg, O., Fink, L., and Weissmann, N. (2008): Fhl-1, a new key protein in pulmonary hypertension. *Circulation* 118, 1183-1194
70. Morgan, M. J., and Madgwick, A. J. (1996): Slim defines a novel family of LIM-proteins expressed in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 225, 632-638
71. Brown, S., McGrath, M. J., Ooms, L. M., Gurung, R., Maimone, M. M., and Mitchell, C. A. (1999): Characterization of two isoforms of the skeletal muscle LIM protein 1, SLIM1. Localization of SLIM1 at focal adhesions and the isoform slimmer in the nucleus of myoblasts and cytoplasm of myotubes suggests distinct roles in the cytoskeleton and in nuclear-cytoplasmic communication. *J Biol Chem* 274, 27083-27091
72. Lee, S. M., Tsui, S. K., Chan, K. K., Garcia-Barcelo, M., Wayne, M. M., Fung, K. P., Liew, C. C., and Lee, C. Y. (1998): Chromosomal mapping, tissue distribution and cDNA sequence of four-and-a-half LIM domain protein 1 (FHL1). *Gene* 216, 163-170
73. Petit, V., and Thiery, J. P. (2000): Focal adhesions: structure and dynamics. *Biol Cell* 92, 477-494
74. Robinson, P. A., Brown, S., McGrath, M. J., Coghill, I. D., Gurung, R., and Mitchell, C. A. (2003): Skeletal muscle LIM protein 1 regulates integrin-mediated myoblast adhesion, spreading, and migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 284, C681-695
75. Boettiger, D., Enomoto-Iwamoto, M., Yoon, H. Y., Hofer, U., Menko, A. S., and Chiquet-Ehrismann, R. (1995): Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol* 169, 261-272
76. Heizmann, C. W. (2002): The multifunctional S100 protein family. *Methods Mol Biol* 172, 69-80
77. Ilg, E. C., Schafer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996): Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 68, 325-332
78. Garrett, S. C., Varney, K. M., Weber, D. J., and Bresnick, A. R. (2006): S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 281, 677-680
79. Grigorian, M., Andresen, S., Tulchinsky, E., Kriajevska, M., Carlberg, C., Kruse, C., Cohn, M., Ambartsumian, N., Christensen, A., Selivanova, G., and Lukanidin, E. (2001): Tumor suppressor p53 protein is a new target for the metastasis-associated Mts1/S100A4 protein: functional consequences of their interaction. *J Biol Chem* 276, 22699-22708
80. Schmidt-Hansen, B., Klingelhofer, J., Grum-Schwensen, B., Christensen, A., Andresen, S., Kruse, C., Hansen, T., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., and

- Grigorian, M. (2004): Functional significance of metastasis-inducing S100A4(Mts1) in tumor-stroma interplay. *J Biol Chem* 279, 24498-24504
81. Stary, M., Schneider, M., Sheikh, S. P., and Weitzer, G. (2006): Parietal endoderm secreted S100A4 promotes early cardiomyogenesis in embryoid bodies. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 555-563
82. Semov, A., Moreno, M. J., Onichtchenko, A., Abulrob, A., Ball, M., Ekiel, I., Pietrzynski, G., Stanimirovic, D., and Alakhov, V. (2005): Metastasis-associated protein S100A4 induces angiogenesis through interaction with Annexin II and accelerated plasmin formation. *J Biol Chem* 280, 20833-20841
83. Novitskaya, V., Grigorian, M., Kriajevskaja, M., Tarabykina, S., Bronstein, I., Berezin, V., Bock, E., and Lukanidin, E. (2000): Oligomeric forms of the metastasis-related Mts1 (S100A4) protein stimulate neuronal differentiation in cultures of rat hippocampal neurons. *J Biol Chem* 275, 41278-41286
84. Lewin, G. R., and Barde, Y. A. (1996): Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 19, 289-317
85. Kaplan, D. R., and Miller, F. D. (2000): Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10, 381-391
86. Coppola, V., Barrick, C. A., Southon, E. A., Celeste, A., Wang, K., Chen, B., Haddad el, B., Yin, J., Nussenzweig, A., Subramaniam, A., and Tessarollo, L. (2004): Ablation of TrkA function in the immune system causes B cell abnormalities. *Development* 131, 5185-5195
87. Nemoto, K., Fukamachi, K., Nemoto, F., Miyata, S., Hamada, M., Nakamura, Y., Senba, E., and Ueyama, T. (1998): Gene expression of neurotrophins and their receptors in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 245, 284-288
88. Botchkarev, V. A., Metz, M., Botchkareva, N. V., Welker, P., Lommatzsch, M., Renz, H., and Paus, R. (1999): Brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4 act as "epitheliotrophins" in murine skin. *Lab Invest* 79, 557-572
89. Lee, R., Kermani, P., Teng, K. K., and Hempstead, B. L. (2001): Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science* 294, 1945-1948
90. Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003): Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642
91. Hempstead, B. L. (2002): The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 12, 260-267
92. Hiltunen, J. O., Arumae, U., Moshnyakov, M., and Saarma, M. (1996): Expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors in developing rat heart. *Circ Res* 79, 930-939

93. Ricci, A., Greco, S., Amenta, F., Bronzetti, E., Felici, L., Rossodivita, I., Sabbatini, M., and Mariotta, S. (2000): Neurotrophins and neurotrophin receptors in human pulmonary arteries. *J Vasc Res* 37, 355-363
94. Braun, A., Lommatzsch, M., Lewin, G. R., Virchow, J. C., and Renz, H. (1999): Neurotrophins: a link between airway inflammation and airway smooth muscle contractility in asthma? *Int Arch Allergy Immunol* 118, 163-165
95. Donovan, M. J., Miranda, R. C., Kraemer, R., McCaffrey, T. A., Tessarollo, L., Mahadeo, D., Sharif, S., Kaplan, D. R., Tsoulfas, P., Parada, L., and et al. (1995): Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol* 147, 309-324
96. Klein, R., Nanduri, V., Jing, S. A., Lamballe, F., Tapley, P., Bryant, S., Cordon-Cardo, C., Jones, K. R., Reichardt, L. F., and Barbacid, M. (1991): The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66, 395-403
97. Bibel, M., and Barde, Y. A. (2000): Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev* 14, 2919-2937
98. Patterson, S. L., Grover, L. M., Schwartzkroin, P. A., and Bothwell, M. (1992): Neurotrophin expression in rat hippocampal slices: a stimulus paradigm inducing LTP in CA1 evokes increases in BDNF and NT-3 mRNAs. *Neuron* 9, 1081-1088
99. Donovan, M. J., Lin, M. I., Wiegand, P., Ringstedt, T., Kraemer, R., Hahn, R., Wang, S., Ibanez, C. F., Rafii, S., and Hempstead, B. L. (2000): Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development* 127, 4531-4540
100. Aoyama, M., Asai, K., Shishikura, T., Kawamoto, T., Miyachi, T., Yokoi, T., Togari, H., Wada, Y., Kato, T., and Nakagawara, A. (2001): Human neuroblastomas with unfavorable biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a variety of its variants. *Cancer Lett* 164, 51-60
101. Arevalo, J. C., and Wu, S. H. (2006): Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63, 1523-1537
102. Klein, R., Conway, D., Parada, L. F., and Barbacid, M. (1990): The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61, 647-656
103. Narumiya, S., Ohno, M., Tanaka, N., Yamano, T., and Shimada, M. (1998): Enhanced expression of full-length TrkB receptors in young rat brain with hypoxic/ischemic injury. *Brain Res* 797, 278-286

104. Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D., and Barde, Y. A. (1995): Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121, 2461-2470
105. Eide, F. F., Vining, E. R., Eide, B. L., Zang, K., Wang, X. Y., and Reichardt, L. F. (1996): Naturally occurring truncated trkB receptors have dominant inhibitory effects on brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci* 16, 3123-3129
106. Cheng, A., Coksaygan, T., Tang, H., Khatri, R., Balice-Gordon, R. J., Rao, M. S., and Mattson, M. P. (2007): Truncated tyrosine kinase B brain-derived neurotrophic factor receptor directs cortical neural stem cells to a glial cell fate by a novel signaling mechanism. *J Neurochem* 100, 1515-1530
107. Adams, J. C., R.P. Tucker, and J. Lawler. (1995): The thrombospondin gene family. R.G. Landes, Austin, TX. 188 pp.
108. Wight, T. N., Raugi, G. J., Mumby, S. M., and Bornstein, P. (1985): Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues. *J Histochem Cytochem* 33, 295-302
109. Iruela-Arispe, M. L., Liska, D. J., Sage, E. H., and Bornstein, P. (1993): Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development. *Dev Dyn* 197, 40-56
110. Majack, R. A., Goodman, L. V., and Dixit, V. M. (1988): Cell surface thrombospondin is functionally essential for vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cell Biol* 106, 415-422
111. Bagavandoss, P., and Wilks, J. W. (1990): Specific inhibition of endothelial cell proliferation by thrombospondin. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 867-872
112. Silverstein, R. L. (2002): The face of TSR revealed: an extracellular signaling domain is exposed. *J Cell Biol* 159, 203-206
113. Schultz-Cherry, S., Ribeiro, S., Gentry, L., and Murphy-Ullrich, J. E. (1994): Thrombospondin binds and activates the small and large forms of latent transforming growth factor-beta in a chemically defined system. *J Biol Chem* 269, 26775-26782
114. Mosher, D. F., Misenheimer, T. M., Stenflo, J., and Hogg, P. J. (1992): Modulation of fibrinolysis by thrombospondin. *Ann N Y Acad Sci* 667, 64-69
115. Adams, J. C. (1995): Formation of stable microspikes containing actin and the 55 kDa actin bundling protein, fascin, is a consequence of cell adhesion to thrombospondin-1: implications for the anti-adhesive activities of thrombospondin-1. *J Cell Sci* 108 (Pt 5), 1977-1990
116. Tolsma, S. S., Volpert, O. V., Good, D. J., Frazier, W. A., Polverini, P. J., and Bouck, N. (1993): Peptides derived from two separate domains of the matrix

- protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol* 122, 497-511
117. Asch, A. S., Barnwell, J., Silverstein, R. L., and Nachman, R. L. (1987): Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 79, 1054-1061
118. Flad, H. D., Grage-Griebenow, E., Petersen, F., Scheuerer, B., Brandt, E., Baran, J., Pryjma, J., and Ernst, M. (1999): The role of cytokines in monocyte apoptosis. *Pathobiology* 67, 291-293
119. Greenwalt, D. E., Lipsky, R. H., Ockenhouse, C. F., Ikeda, H., Tandon, N. N., and Jamieson, G. A. (1992): Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood* 80, 1105-1115
120. Ricci, A., Felici, L., Mariotta, S., Mannino, F., Schmid, G., Terzano, C., Cardillo, G., Amenta, F., and Bronzetti, E. (2004): Neurotrophin and neurotrophin receptor protein expression in the human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30, 12-19
121. Wharton, J., Davie, N., Upton, P. D., Yacoub, M. H., Polak, J. M., and Morrell, N. W. (2000): Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation* 102, 3130-3136
122. Fantozzi, I., Huang, W., Zhang, J., Zhang, S., Platoshyn, O., Remillard, C. V., Thistlethwaite, P. A., and Yuan, J. X. (2005): Divergent effects of BMP-2 on gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Exp Lung Res* 31, 783-806
123. Lagna, G., Nguyen, P. H., Ni, W., and Hata, A. (2006): BMP-dependent activation of caspase-9 and caspase-8 mediates apoptosis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L1059-1067
124. Teichert-Kuliszewska, K., Kutryk, M. J., Kuliszewski, M. A., Karoubi, G., Courtman, D. W., Zucco, L., Granton, J., and Stewart, D. J. (2006): Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 98, 209-217
125. Tada, Y., Majka, S., Carr, M., Harral, J., Crona, D., Kuriyama, T., and West, J. (2007): Molecular effects of loss of BMP2 signaling in smooth muscle in a transgenic mouse model of PAH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1556-1563

126. Frelin, C., Ladoux, A., and D'Angelo, G. (2000): Vascular endothelial growth factors and angiogenesis. *Ann Endocrinol (Paris)* 61, 70-74
127. Kugathasan, L., Dutly, A. E., Zhao, Y. D., Deng, Y., Robb, M. J., Keshavjee, S., and Stewart, D. J. (2005): Role of angiopoietin-1 in experimental and human pulmonary arterial hypertension. *Chest* 128, 633S-642S
128. Patel, H. H., Zhang, S., Murray, F., Suda, R. Y., Head, B. P., Yokoyama, U., Swaney, J. S., Niesman, I. R., Schermuly, R. T., Pullamsetti, S. S., Thistlethwaite, P. A., Miyanochara, A., Farquhar, M. G., Yuan, J. X., and Insel, P. A. (2007): Increased smooth muscle cell expression of caveolin-1 and caveolae contribute to the pathophysiology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Faseb J* 21, 2970-2979
129. Laumanns, I. P., Fink, L., Wilhelm, J., Wolff, J. C., Mitnacht-Kraus, R., Graef-Hoechst, S., Stein, M. M., Bohle, R. M., Klepetko, W., Hoda, M. A., Schermuly, R. T., Grimminger, F., Seeger, W., and Voswinckel, R. (2009): The noncanonical WNT pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 683-691
130. Naeije, R., and Barbera, J. A. (2001): Pulmonary hypertension associated with COPD. *Crit Care* 5, 286-289
131. Lejeune, P., Mols, P., Naeije, R., Hallemans, R., and Melot, C. (1984): Acute hemodynamic effects of controlled oxygen therapy in decompensated chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care Med* 12, 1032-1035
132. Timms, R. M., Khaja, F. U., and Williams, G. W. (1985): Hemodynamic response to oxygen therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Intern Med* 102, 29-36
133. Dinh-Xuan, A. T., Higenbottam, T. W., Clelland, C. A., Pepke-Zaba, J., Cremona, G., Butt, A. Y., Large, S. R., Wells, F. C., and Wallwork, J. (1991): Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 324, 1539-1547
134. Peinado, V. I., Barbera, J. A., Ramirez, J., Gomez, F. P., Roca, J., Jover, L., Gimferrer, J. M., and Rodriguez-Roisin, R. (1998): Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol* 274, L908-913
135. Long, L., MacLean, M. R., Jeffery, T. K., Morecroft, I., Yang, X., Rudarakanchara, N., Southwood, M., James, V., Trembath, R. C., and Morrell, N. W. (2006): Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res* 98, 818-827
136. Stolze, I. P., Tian, Y. M., Appelhoff, R. J., Turley, H., Wykoff, C. C., Gleadle, J. M., and Ratcliffe, P. J. (2004): Genetic analysis of the role of the asparaginyl hydroxylase factor inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) in regulating HIF transcriptional target genes. *J Biol Chem* 279, 42719-42725

137. Tuder, R. M., Chacon, M., Alger, L., Wang, J., Taraseviciene-Stewart, L., Kasahara, Y., Cool, C. D., Bishop, A. E., Geraci, M., Semenza, G. L., Yacoub, M., Polak, J. M., and Voelkel, N. F. (2001): Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol* 195, 367-374
138. Semenza, G. L. (2003): Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732
139. Wenger, R. (2002): Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 16, 1151-1162
140. Brusselmans, K., Compernelle, V., Tjwa, M., Wiesener, M. S., Maxwell, P. H., Collen, D., and Carmeliet, P. (2003): Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2alpha protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J Clin Invest* 111, 1519-1527
141. Eul, B., Rose, F., Krick, S., Savai, R., Goyal, P., Klepetko, W., Grimminger, F., Weissmann, N., Seeger, W., and Hanze, J. (2006): Impact of HIF-1alpha and HIF-2alpha on proliferation and migration of human pulmonary artery fibroblasts in hypoxia. *Faseb J* 20, 163-165
142. Semenza, G. L. (2005): Pulmonary vascular responses to chronic hypoxia mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Proc Am Thorac Soc* 2, 68-70
143. Fink, L., Kohlhoff, S., Stein, M. M., Hanze, J., Weissmann, N., Rose, F., Akkayagil, E., Manz, D., Grimminger, F., Seeger, W., and Bohle, R. M. (2002): cDNA array hybridization after laser-assisted microdissection from nonneoplastic tissue. *Am J Pathol* 160, 81-90
144. Stenmark, K. R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E., and Das, M. (2006): Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda)* 21, 134-145
145. Frid, M. G., Moiseeva, E. P., and Stenmark, K. R. (1994): Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circ Res* 75, 669-681
146. Frid, M. G., Dempsey, E. C., Durmowicz, A. G., and Stenmark, K. R. (1997): Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1203-1209
147. Das, M., Dempsey, E. C., Reeves, J. T., and Stenmark, K. R. (2002): Selective expansion of fibroblast subpopulations from pulmonary artery adventitia in response to hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L976-986
148. Das, M., Bouchey, D. M., Moore, M. J., Hopkins, D. C., Nemenoff, R. A., and Stenmark, K. R. (2001): Hypoxia-induced proliferative response of vascular

- adventitial fibroblasts is dependent on g protein-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 276, 15631-15640
149. Short, M., Nemenoff, R. A., Zawada, W. M., Stenmark, K. R., and Das, M. (2004): Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C416-425
150. Stang, P., Lydick, E., Silberman, C., Kempel, A., and Keating, E. T. (2000): The prevalence of COPD: using smoking rates to estimate disease frequency in the general population. *Chest* 117, 354S-359S
151. Spira, A., Beane, J., Shah, V., Liu, G., Schembri, F., Yang, X., Palma, J., and Brody, J. S. (2004): Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10143-10148
152. Arber, S., Halder, G., and Caroni, P. (1994): Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell* 79, 221-231
153. Brown, M. C., Perrotta, J. A., and Turner, C. E. (1996): Identification of LIM3 as the principal determinant of paxillin focal adhesion localization and characterization of a novel motif on paxillin directing vinculin and focal adhesion kinase binding. *J Cell Biol* 135, 1109-1123
154. Fisch, P., Boehm, T., Lavenir, I., Larson, T., Arno, J., Forster, A., and Rabbitts, T. H. (1992): T-cell acute lymphoblastic lymphoma induced in transgenic mice by the RBTN1 and RBTN2 LIM-domain genes. *Oncogene* 7, 2389-2397
155. Sattler, M., Pisick, E., Morrison, P. T., and Salgia, R. (2000): Role of the cytoskeletal protein paxillin in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 11, 63-76
156. Chu, P. H., Ruiz-Lozano, P., Zhou, Q., Cai, C., and Chen, J. (2000): Expression patterns of FHL/SLIM family members suggest important functional roles in skeletal muscle and cardiovascular system. *Mech Dev* 95, 259-265
157. Lim, D. S., Roberts, R., and Marian, A. J. (2001): Expression profiling of cardiac genes in human hypertrophic cardiomyopathy: insight into the pathogenesis of phenotypes. *J Am Coll Cardiol* 38, 1175-1180
158. Hwang, D. M., Dempsey, A. A., Wang, R. X., Rezvani, M., Barrans, J. D., Dai, K. S., Wang, H. Y., Ma, H., Cukerman, E., Liu, Y. Q., Gu, J. R., Zhang, J. H., Tsui, S. K., Waye, M. M., Fung, K. P., Lee, C. Y., and Liew, C. C. (1997): A genome-based resource for molecular cardiovascular medicine: toward a compendium of cardiovascular genes. *Circulation* 96, 4146-4203
159. Waypa, G. B., Marks, J. D., Mack, M. M., Boriboun, C., Mungai, P. T., and Schumacker, P. T. (2002): Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res* 91, 719-726

160. Richard, D. E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000): Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275, 26765-26771
161. Ekholm, S. V., and Reed, S. I. (2000): Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12, 676-684
162. Zhu, X., Ohtsubo, M., Bohmer, R. M., Roberts, J. M., and Assoian, R. K. (1996): Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. *J Cell Biol* 133, 391-403
163. McGrath, M. J., Cottle, D. L., Nguyen, M. A., Dyson, J. M., Coghill, I. D., Robinson, P. A., Holdsworth, M., Cowling, B. S., Hardeman, E. C., Mitchell, C. A., and Brown, S. (2006): Four and a half LIM protein 1 binds myosin-binding protein C and regulates myosin filament formation and sarcomere assembly. *J Biol Chem* 281, 7666-7683
164. Feuerstein, R., Wang, X., Song, D., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1994): The LIM/double zinc-finger motif functions as a protein dimerization domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10655-10659
165. Muguruma, M., Matsumura, S., and Fukazawa, T. (1990): Direct interactions between talin and actin. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 1217-1223
166. Ratnikov, B. I., Partridge, A. W., and Ginsberg, M. H. (2005): Integrin activation by talin. *J Thromb Haemost* 3, 1783-1790
167. Buck, C. A., and Horwitz, A. F. (1987): Integrin, a transmembrane glycoprotein complex mediating cell-substratum adhesion. *J Cell Sci Suppl* 8, 231-250
168. Burridge, K., and Mangeat, P. (1984): An interaction between vinculin and talin. *Nature* 308, 744-746
169. Priddle, H., Hemmings, L., Monkley, S., Woods, A., Patel, B., Sutton, D., Dunn, G. A., Zicha, D., and Critchley, D. R. (1998): Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells. *J Cell Biol* 142, 1121-1133
170. Nuckolls, G. H., Romer, L. H., and Burridge, K. (1992): Microinjection of antibodies against talin inhibits the spreading and migration of fibroblasts. *J Cell Sci* 102 (Pt 4), 753-762
171. Smith, A., Carrasco, Y. R., Stanley, P., Kieffer, N., Batista, F. D., and Hogg, N. (2005): A talin-dependent LFA-1 focal zone is formed by rapidly migrating T lymphocytes. *J Cell Biol* 170, 141-151
172. Donato, R. (2001): S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 637-668

173. Mazzucchelli, L. (2002): Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 160, 7-13
174. Helfman, D. M., Kim, E. J., Lukanidin, E., and Grigorian, M. (2005): The metastasis associated protein S100A4: role in tumour progression and metastasis. *Br J Cancer* 92, 1955-1958
175. Strutz, F., Zeisberg, M., Ziyadeh, F. N., Yang, C. Q., Kalluri, R., Muller, G. A., and Neilson, E. G. (2002): Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 61, 1714-1728
176. Zeisberg, M., Hanai, J., Sugimoto, H., Mammoto, T., Charytan, D., Strutz, F., and Kalluri, R. (2003): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 964-968
177. Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., and Thompson, E. W. (2006): The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172, 973-981
178. Okada, H., Danoff, T. M., Kalluri, R., and Neilson, E. G. (1997): Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* 273, F563-574
179. Zeisberg, M., Yang, C., Martino, M., Duncan, M. B., Rieder, F., Tanjore, H., and Kalluri, R. (2007): Fibroblasts derive from hepatocytes in liver fibrosis via epithelial to mesenchymal transition. *J Biol Chem* 282, 23337-23347
180. Kozlova, E. N., and Lukanidin, E. (2002): Mts1 protein expression in the central nervous system after injury. *Glia* 37, 337-348
181. Klingelhofer, J., Senolt, L., Baslund, B., Nielsen, G. H., Skibshoj, I., Pavelka, K., Neidhart, M., Gay, S., Ambartsumian, N., Hansen, B. S., Petersen, J., Lukanidin, E., and Grigorian, M. (2007): Up-regulation of metastasis-promoting S100A4 (Mts-1) in rheumatoid arthritis: putative involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 779-789
182. Schneider, M., Kostin, S., Strom, C. C., Aplin, M., Lyngbaek, S., Theilade, J., Grigorian, M., Andersen, C. B., Lukanidin, E., Lerche Hansen, J., and Sheikh, S. P. (2007): S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 75, 40-50
183. Greenway, S., van Suylen, R. J., Du Marchie Sarvaas, G., Kwan, E., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., and Rabinovitch, M. (2004): S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am J Pathol* 164, 253-262
184. Spiekerkoetter, E., Lawrie, A., Merklinger, S., Ambartsumian, N., Lukanidin, E., Schmidt, A. M., and Rabinovitch, M. (2005): Mts1/S100A4 stimulates human pulmonary artery smooth muscle cell migration through multiple signaling pathways. *Chest* 128, 577S

185. Hall, S. M., Brogan, P., Haworth, S. G., and Klein, N. (2009): Contribution of inflammation to the pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension in children. *Thorax*
186. Merklinger, S. L., Wagner, R. A., Spiekerkoetter, E., Hinek, A., Knutsen, R. H., Kabir, M. G., Desai, K., Hacker, S., Wang, L., Cann, G. M., Ambartsumian, N. S., Lukanidin, E., Bernstein, D., Husain, M., Mecham, R. P., Starcher, B., Yanagisawa, H., and Rabinovitch, M. (2005): Increased fibulin-5 and elastin in S100A4/Mts1 mice with pulmonary hypertension. *Circ Res* 97, 596-604
187. Stein, U., Arlt, F., Walther, W., Smith, J., Waldman, T., Harris, E. D., Mertins, S. D., Heizmann, C. W., Allard, D., Birchmeier, W., Schlag, P. M., and Shoemaker, R. H. (2006): The metastasis-associated gene S100A4 is a novel target of beta-catenin/T-cell factor signaling in colon cancer. *Gastroenterology* 131, 1486-1500
188. Hopwood, B., Tsykin, A., Findlay, D. M., and Fazzalari, N. L. (2007): Microarray gene expression profiling of osteoarthritic bone suggests altered bone remodelling, WNT and transforming growth factor-beta/bone morphogenic protein signalling. *Arthritis Res Ther* 9, R100
189. Li, Y., Zhang, K. L., Sun, Y., Yang, Y., Chen, X. Y., Kong, Q. Y., Wu, M. L., Liu, J., and Li, H. (2008): Frequent S100A4 Expression with Unique Splicing Pattern in Gastric Cancers: A Hypomethylation Event Paralleled with E-cadherin Reduction and Wnt Activation. *Transl Oncol* 1, 165-176
190. Kiryushko, D., Novitskaya, V., Soroka, V., Klingelhofer, J., Lukanidin, E., Berezin, V., and Bock, E. (2006): Molecular mechanisms of Ca(2+) signaling in neurons induced by the S100A4 protein. *Mol Cell Biol* 26, 3625-3638
191. Launay, J. M., Herve, P., Peoc'h, K., Tournois, C., Callebert, J., Nebigil, C. G., Etienne, N., Drouet, L., Humbert, M., Simonneau, G., and Maroteaux, L. (2002): Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 8, 1129-1135
192. MacLean, M. R., Deuchar, G. A., Hicks, M. N., Morecroft, I., Shen, S., Sheward, J., Colston, J., Loughlin, L., Nilsen, M., Dempsie, Y., and Harmar, A. (2004): Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 109, 2150-2155
193. Lawrie, A., Spiekerkoetter, E., Martinez, E. C., Ambartsumian, N., Sheward, W. J., MacLean, M. R., Harmar, A. J., Schmidt, A. M., Lukanidin, E., and Rabinovitch, M. (2005): Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res* 97, 227-235

194. Bucciarelli, L. G., Wendt, T., Qu, W., Lu, Y., Lalla, E., Rong, L. L., Goova, M. T., Moser, B., Kislinger, T., Lee, D. C., Kashyap, Y., Stern, D. M., and Schmidt, A. M. (2002): RAGE blockade stabilizes established atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 106, 2827-2835
195. Sakaguchi, T., Yan, S. F., Yan, S. D., Belov, D., Rong, L. L., Sousa, M., Andrassy, M., Marso, S. P., Duda, S., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P. P., Stern, D. M., Schmidt, A. M., and Naka, Y. (2003): Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J Clin Invest* 111, 959-972
196. Schmidt, A. M., and Stern, D. (2000): Atherosclerosis and diabetes: the RAGE connection. *Curr Atheroscler Rep* 2, 430-436
197. Schermuly, R. T., Dony, E., Ghofrani, H. A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y. J., Weissmann, N., Seeger, W., and Grimminger, F. (2005): Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 115, 2811-2821
198. Merklinger, S. L., Jones, P. L., Martinez, E. C., and Rabinovitch, M. (2005): Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* 112, 423-431
199. Martens, L. K., Kirschner, K. M., Warnecke, C., and Scholz, H. (2007): Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is a transcriptional activator of the TrkB neurotrophin receptor gene. *J Biol Chem* 282, 14379-14388
200. Barbacid, M. (1994): The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25, 1386-1403
201. Wartiovaara, K., Paavola, P., Suvanto, P., Paulin, L., Saarma, M., Peltonen, L., and Sariola, H. (1997): Exclusion of the p75 neurotrophin receptor gene as a candidate gene for Meckel syndrome. *Clin Dysmorphol* 6, 213-217
202. Ejiri, J., Inoue, N., Kobayashi, S., Shiraki, R., Otsui, K., Honjo, T., Takahashi, M., Ohashi, Y., Ichikawa, S., Terashima, M., Mori, T., Awano, K., Shinke, T., Shite, J., Hirata, K., Yokozaki, H., Kawashima, S., and Yokoyama, M. (2005): Possible role of brain-derived neurotrophic factor in the pathogenesis of coronary artery disease. *Circulation* 112, 2114-2120
203. Kraemer, R., Nguyen, H., March, K. L., and Hempstead, B. (1999): NGF activates similar intracellular signaling pathways in vascular smooth muscle cells as PDGF-BB but elicits different biological responses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 1041-1050
204. Wagner, N., Wagner, K. D., Theres, H., Englert, C., Schedl, A., and Scholz, H. (2005): Coronary vessel development requires activation of the TrkB

- neurotrophin receptor by the Wilms' tumor transcription factor Wt1. *Genes Dev* 19, 2631-2642
205. Nakamura, K., Martin, K. C., Jackson, J. K., Beppu, K., Woo, C. W., and Thiele, C. J. (2006): Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB induces vascular endothelial growth factor expression via hypoxia-inducible factor-1alpha in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 66, 4249-4255
206. Schramm, A., Schulte, J. H., Astrahantseff, K., Apostolov, O., Limpt, V., Sieverts, H., Kuhfittig-Kulle, S., Pfeiffer, P., Versteeg, R., and Eggert, A. (2005): Biological effects of TrkA and TrkB receptor signaling in neuroblastoma. *Cancer Lett* 228, 143-153
207. Savill, J. (1997): Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull* 53, 491-508
208. Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., and Savill, J. (1995): CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med* 181, 1857-1862
209. Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. (1990): Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343, 170-173
210. Silverstein, R. L., and Nachman, R. L. (1999): Angiogenesis and atherosclerosis. The mandate broadens. *Circulation* 100, 783-785
211. Yehualaeshet, T., O'Connor, R., Green-Johnson, J., Mai, S., Silverstein, R., Murphy-Ullrich, J. E., and Khalil, N. (1999): Activation of rat alveolar macrophage-derived latent transforming growth factor beta-1 by plasmin requires interaction with thrombospondin-1 and its cell surface receptor, CD36. *Am J Pathol* 155, 841-851
212. Febbraio, M., Hajjar, D. P., and Silverstein, R. L. (2001): CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108, 785-791
213. Dawson, D. W., Pearce, S. F., Zhong, R., Silverstein, R. L., Frazier, W. A., and Bouck, N. P. (1997): CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138, 707-717
214. Chandrasekaran, L., He, C. Z., Al-Barazi, H., Krutzsch, H. C., Iruela-Arispe, M. L., and Roberts, D. D. (2000): Cell contact-dependent activation of alpha3beta1 integrin modulates endothelial cell responses to thrombospondin-1. *Mol Biol Cell* 11, 2885-2900
215. Bornstein, P. (1992): Thrombospondins: structure and regulation of expression. *Faseb J* 6, 3290-3299
216. Phelan, M. W., Forman, L. W., Perrine, S. P., and Faller, D. V. (1998): Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells. *J Lab Clin Med* 132, 519-529

217. Reed, M. J., Iruela-Arispe, L., O'Brien, E. R., Truong, T., LaBell, T., Bornstein, P., and Sage, E. H. (1995): Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am J Pathol* 147, 1068-1080
218. Majack, R. A., Mildbrandt, J., and Dixit, V. M. (1987): Induction of thrombospondin messenger RNA levels occurs as an immediate primary response to platelet-derived growth factor. *J Biol Chem* 262, 8821-8825
219. Osada-Oka, M., Ikeda, T., Akiba, S., and Sato, T. (2008): Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem* 104, 1918-1926
220. Moura, R., Tjwa, M., Vandervoort, P., Cludts, K., and Hoylaerts, M. F. (2007): Thrombospondin-1 activates medial smooth muscle cells and triggers neointima formation upon mouse carotid artery ligation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2163-2169
221. Ichii, T., Koyama, H., Tanaka, S., Shioi, A., Okuno, Y., Otani, S., and Nishizawa, Y. (2002): Thrombospondin-1 mediates smooth muscle cell proliferation induced by interaction with human platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 1286-1292
222. Sage, E., Mercier, O., Van den Eyden, F., de Perrot, M., Barlier-Mur, A. M., Dartevielle, P., Eddahibi, S., Herve, P., and Fadel, E. (2008): Endothelial cell apoptosis in chronically obstructed and reperfused pulmonary artery. *Respir Res* 9, 19
223. Primo, L., Ferrandi, C., Roca, C., Marchio, S., di Blasio, L., Alessio, M., and Bussolino, F. (2005): Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity. *Faseb J* 19, 1713-1715
224. Volpert, O. V., Zaichuk, T., Zhou, W., Reiher, F., Ferguson, T. A., Stuart, P. M., Amin, M., and Bouck, N. P. (2002): Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 8, 349-357
225. Armstrong, L. C., Bjorkblom, B., Hankenson, K. D., Siadak, A. W., Stiles, C. E., and Bornstein, P. (2002): Thrombospondin 2 inhibits microvascular endothelial cell proliferation by a caspase-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 13, 1893-1905
226. Bein, K., and Simons, M. (2000): Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* 275, 32167-32173
227. Emonard, H., Bellon, G., Troeberg, L., Berton, A., Robinet, A., Henriot, P., Marbaix, E., Kirkegaard, K., Patthy, L., Eeckhout, Y., Nagase, H., Hornebeck, W., and Courtoy, P. J. (2004): Low density lipoprotein receptor-related protein

- mediates endocytic clearance of pro-MMP-2.TIMP-2 complex through a thrombospondin-independent mechanism. *J Biol Chem* 279, 54944-54951
228. Rege, T. A., Fears, C. Y., and Gladson, C. L. (2005): Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol* 7, 106-121
229. Yang, R., Thomas, G. R., Bunting, S., Ko, A., Ferrara, N., Keyt, B., Ross, J., and Jin, H. (1996): Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J Cardiovasc Pharmacol* 27, 838-844
230. Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A., and Giavazzi, R. (1990): Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor. *J Cell Biol* 111, 765-772
231. Isenberg, J. S., Wink, D. A., and Roberts, D. D. (2006): Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses. *Cardiovasc Res* 71, 785-793
232. Isenberg, J. S., Romeo, M. J., Yu, C., Yu, C. K., Nghiem, K., Monsale, J., Rick, M. E., Wink, D. A., Frazier, W. A., and Roberts, D. D. (2008): Thrombospondin-1 stimulates platelet aggregation by blocking the antithrombotic activity of nitric oxide/cGMP signaling. *Blood* 111, 613-623
233. Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., Dimitry, J., Frazier, W. A., Wink, D. A., and Roberts, D. D. (2006): CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 281, 26069-26080
234. Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., Perruccio, E. M., Espey, M. G., Wink, D. A., and Roberts, D. D. (2005): Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13141-13146

8 Publikationen

Originalarbeit

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

Poster und Abstracts

Kwapiszewska, G., Wygrecka, M., Marsh, L., Schmitt, S., Trösser, R., Zakrzewicz, A., Seeger, W., Eickelberg, O., Fink, L., Weissmann, N.: Hypoxia-dependent Fhl-1 regulation leads to proproliferative effects in PASMC. *European Respiratory Society*, Berlin, (4.-8. Oktober 2008)

Kwapiszewska, G., Wygrecka, M., Marsh, L., Schmitt, S., Trösser, R., Zakrzewicz, A., Seeger, W., Eickelberg, O., Fink, L., Weissmann, N.: Fhl-1 as a mediator of pulmonary arterial hypertension. *4th World Symposium on Pulmonary Hypertension*, Dana Point, California, U.S.A., (11.-14. Februar 2008)

Kwapiszewska, G., Chwalek, K., Marsh, L., Wilhelm, J., Trösser, R., Wygrecka, M., Best, J., Schermuly, R., Seeger, W., Weissmann, N., Eickelberg, O., Fink, L.: TrkB expression is altered in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *European Respiratory Society*, Stockholm, Sweden, (15.-19. September 2007)

Kwapiszewska, G., Trösser, R., Schmitt, S., Stärk, W., Seeger, W., Fink, L., Bohle, R.M., and Weissmann, N.: Involvement of FHL1 in vascular remodelling. *European Respiratory Society*, München, (2.-6. September 2006)

Kwapiszewska, G., Trösser, R., Schmitt, S., Stärk, W., Weissmann, N., Seeger, W., Fink, L., Bohle, R.M.: FHL1 a novel gene involved in vascular remodeling from mouse model to human. *American Thoracic Society*, San Diego, (19.-24. Mai 2006)

Trösser, R., Schmitt, S., Stärk, W., Weissmann, N., Seeger, W., Fink, L., Bohle, R.M., Kwapiszewska, G.: Fhl-1, ein neuartiges Gen, welches in den Gefäßumbau involviert ist (vom Mausmodell zum Menschen). *Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin*, Wiesbaden, (22.-26. April 2006)

9 Patientendatentabelle

Lungenhomogenat

Nummer	Eingang am	Initialien des Spenders	Alter	Geschlecht	Erkrankung	Heath/Edwards Klassifikation	klinisch relevante Diagnosen
12	?	?	?	?	Spender aus Homburg	unauffällige Gefäße	
36	17.03.2004	?	?	?	Spender	unauffällige Gefäße	
38	21.03.2004	?	?	?	Spender	unauffällige Gefäße	
58	14.06.2004	?	53	männlich	Spender	unauffällige Gefäße	
keine Nr.	27.06.2005	?	?	?	Spender	unauffällige Gefäße	
15	06.04.2003	P.P.	42	weiblich	IPAH	Grad IV	NYHA III
17	13.05.2003	S.DiR.	42	weiblich	IPAH	Grad IV	NYHA III
25	22.10.2003	C.P.	52	weiblich	IPAH	Grad IV	
63 A	01.08.2004	T.P.	28	weiblich	IPAH	Grad IV	
94	18.02.2005	W.I.	26	weiblich	IPAH	Grad IV	
33	11.03.2004	S.A.	60	weiblich	COPD	Grad II	Lungenemphysem
34	16.03.2004	R.P.	53	männlich	COPD	Grad II	interstitielle Fibrose
44	06.04.2004	L.J.	60	männlich	COPD	Grad II	Nikotinabusus
51	13.05.2004	P.P.	63	männlich	COPD	Grad III	Hypoxämie, Colitis ulcerosa
55	30.05.2004	B.M.	43	weiblich	COPD	Grad III	Epitheloidzellgranulomatose

Zellkultur

Nummer	Eingang am	Initialien des Spenders	Alter	Geschlecht	Erkrankung	Heath/Edwards Klassifikation	klinisch relevante Diagnosen
1189	18.05.2005	?	?	?	Spender	unauffällige Gefäße	
99	10.03.2005	?	?	?	Spender	unauffällige Gefäße	
120	29.06.2005	N.F.	63	weiblich	Spender	unauffällige Gefäße	Bronchitis, Lungenemphysem, Anthrakose
126	22.09.2005	?	?	?	Spender	unauffällige Gefäße	Emphysem, rez. Lugenembolien
141	16.12.2005	?	?	weiblich	Spender	unauffällige Gefäße	
74	27.10.2004	C.M.	27	weiblich	IPAH	Grad IV	portale Hypertonie, NYHA I
94	18.02.2005	W.I.	26	weiblich	IPAH	Grad IV	
113	08.06.2005	F.S.	20	weiblich	IPAH	Grad IV	NYHA III
19\11	20.09.2005	?	?	?	IPAH	Grad II	
165	10.04.2006	J.K.	23	männlich	IPAH	Grad IV	
9	20.11.2002	T.C.	27	männlich	IPAH	Grad II, fragl. veno-okklusive Komponente	hochgradige Pulmonalsklerose, PAP bei 100 mmHg, Trikuspidalinsuffizienz IV
85	13.01.2005	A.G.	59	weiblich	COPD	Grad I	
90	04.02.2005	K.P.	57	männlich	COPD	Grad I-II	
96	21.02.2005	M.N.	56	männlich	COPD	Grad II-III	α 1-Antitrypsinmangel, Nikotinabstinenz seit '79
110	11.05.2005	B.M.	53	männlich	COPD	Grad II	Anthrakose
114	15.06.2005	M.J.	50	weiblich	COPD	Grad III	
115	21.06.2005	J.S.	56	männlich	COPD	Grad III	latente Hypothyreose

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die 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.“

11 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. Ludger Fink für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Durch seine nette und geduldige Art und seine Bemühungen hat er die Arbeit vorangetrieben und hatte stets ein offenes Ohr für anfallende Probleme.

Weiterhin danke ich recht herzlich meiner Betreuerin Dr. biol. hom. Grazyna Kwapiszewska. Ihre kollegiale Art, die Gespräche und Anregungen, das Einarbeiten in die Techniken haben mich motiviert und die Arbeit im Labor angenehm gestaltet. Danke dir, Grazyna, für die schöne und interessante Zeit im Labor.

Danken möchte ich außerdem Dr. rer. nat Jochen Wilhelm für die Unterstützung in Sachen Statistik und Software. Mit seiner Hilfe habe ich die Tücken, aber auch die Möglichkeiten von Statistik kennen und schätzen gelernt.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Maria M. Stein und Dr. med. Jens Wolff für die große Hilfsbereitschaft und Unterstützung rund um die Versuchsabläufe und Gerätschaften im Labor. Danke dem ganzen Laborteam der Pathologie für die harmonische Atmosphäre.

Prof. Dr. rer. nat. N. Weissmann, sowie der Med.-technischen Assistentin Sabine Gräf-Höchst für die großzügige Bereitstellung des Untersuchungsgutes.

Einen großen Dank an meine Eltern und meinen Bruder Peter, die mich in der ganzen Zeit unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben.

Zum Schluss danke ich allen meinen Freunden, die mich in manch frustrierenden Momenten abgelenkt und mir so neuen Mut für die Bearbeitung der Arbeit gegeben haben.

Gießen, Januar 2010

Roger Trösser