

Zellzyklusinhibition zur Therapie der pulmonalen arteriellen Hypertonie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Moritz Christian Neubauer
aus Göttingen

Gießen 2021

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Medizinische Klinik und Poliklinik II,
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Werner Seeger,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph T. Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. med. Richard Schulz

Tag der Disputation: 11.12.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung	1
1.2	Definition und Klassifikation	1
1.3	Pathogenese der pulmonalen arteriellen Hypertonie	4
1.3.1	Einführung.....	4
1.3.2	Histopathologie	5
1.3.3	Der rechte Ventrikel bei pulmonaler arterieller Hypertonie	6
1.3.4	Molekulare Ursachen des Querschnittverlustes	7
1.4	Proliferation bei pulmonaler arterieller Hypertonie	9
1.4.1	Proliferationsfördernde Faktoren	9
1.4.2	Pulmonale arterielle Hypertonie und Tumorerkrankungen.....	10
1.4.3	Der Zellzyklus und Inhibitoren von Zyklin-abhängigen-Kinasen	12
1.5	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	19
2.1.2	Geräte	20
2.1.3	Kits und gebrauchsfertige Reagenzien.....	21
2.1.4	Antikörper und Markerproteine	21
2.1.5	Primer	22
2.1.6	Zellkultur.....	22
2.1.7	Software	23
2.1.8	Verbrauchsgegenstände.....	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Humane Lungenhomogenisate und Zelllinien	24

2.2.2	Zellkultur	24
2.2.3	Zellphysiologische Untersuchungen.....	26
2.2.4	Molekularbiologische Untersuchungen	27
2.2.5	Statistische Auswertung und graphische Darstellung.....	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Überblick.....	33
3.2	Screening in Lungenhomogenisaten	34
3.2.1	Hintergrund.....	34
3.2.2	Resultate der Screenings.....	34
3.3	Zellkulturversuche mit Dinaciclib und Palbociclib.....	39
3.3.1	Hintergrund.....	39
3.3.2	Lichtmikroskopische Dokumentation von behandelten Zellen	39
3.3.3	Quantitative Messung der Proliferation.....	40
3.3.4	Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie und Propidiumiodid.....	42
3.3.5	Molekularer Wirkmechanismus von Dinaciclib und Palbociclib.....	44
3.3.6	Transkriptionelle Folgen der Zellzyklusinhibition	46
4	Diskussion.....	50
4.1	Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext.....	50
4.2	Ergebnisse der Arbeit.....	52
4.2.1	Erster Teil: Screening in Lungenhomogenisaten.....	52
4.2.2	Zweiter Teil: Zellkulturversuche mit Dinaciclib und Palbociclib	54
4.3	Limitationen der Arbeit.....	59
4.4	Ausblick	61
5	Zusammenfassung	63
6	Summary.....	64
7	Abkürzungsverzeichnis.....	65
8	Abbildungsverzeichnis.....	67

9	Tabellenverzeichnis.....	68
10	Literaturangaben.....	69
11	Ehrenwörtliche Erklärung	77
12	Veröffentlichungen der Arbeit	78
	Publikation	78
	Kongressbeiträge	78
	Preise	78
13	Danksagungen	79
14	Tabellarischer Lebenslauf	80

1 Einleitung

1.1 Einführung

Pulmonale Hypertonie (PH) bezeichnet als Oberbegriff eine Gruppe an Erkrankungen, denen eine Erhöhung des pulmonalen arteriellen Druckes gemeinsam ist. Im Zuge der konsekutiven Rechtsherzbelastung kann diese zu einem Rechtsherzversagen führen und letztendlich tödlich enden. Die Evaluation eines möglichen antiproliferativen Therapieansatzes in der Behandlung der seltenen Untergruppe der pulmonalen arteriellen Hypertonie (PAH) soll Gegenstand dieser Arbeit sein.

1.2 Definition und Klassifikation

Im Gesunden liegt, unabhängig vom Geschlecht, der mittlere pulmonal-arterielle Druck (PAP) bei $14,0 \pm 3,3$ mmHg in Ruhe, wie Kovacs et al. zeigen konnten¹. Allgemein ist jede Einzelform der PH definiert als eine Erhöhung des PAP in Ruhe über 25 mmHg, gemessen durch einen Rechtsherzkatheter². Ausgehend von dieser generellen Definition können die verschiedenen Krankheitsformen der PH, betreffend ihre Lokalisation in der pulmonalen Strombahn, weiter unterteilt werden. Anhand von hämodynamischen Kriterien kann zwischen prä- und post-kapillärer PH unterschieden werden. Hierzu werden der pulmonal-kapilläre Verschlussdruck (PAWP, auch Wedge-Druck genannt) und der pulmonale Gefäßwiderstand (PVR) verwendet. Prä-kapilläre PH wird für Patienten mit einem PAWP ≤ 15 mmHg und einem PVR ≥ 3 Wood-Einheiten (WU) definiert, während man bei einem PAWP ≥ 15 mmHg von post-kapillärer PH spricht². Auf dem Weltkongress 2019 der PH wurde empfohlen, die prä-kapilläre PH bereits ab einem PAP von >20 mmHg zu definieren, sollte der PVR ≥ 3 WU sein³. Die post-kapilläre Form kann mithilfe des diastolischen pulmonalen Druckgradienten (DPG = mittlerer PAP - diastolischer PAP) weiter in eine isoliert post-kapilläre (Ipc-PH) oder kombiniert prä- und post-kapilläre Form (Cpc-PH) unterteilt werden⁴.

Während den Weltkongressen zur PH, welcher seit 1973 und zuletzt in Nizza (Frankreich) im Jahre 2019 stattfand, wurden fünf klinische Klassifikationsgruppen (siehe Tabelle 1) etabliert, um Patienten mit vergleichbaren klinischen und hämodynamischen Charakteristiken, sowie ähnlichen histopathologischen Befunden, zusammenzufassen. Ziel ist es hierbei, Diagnostik und Therapie dem entsprechenden Krankheitssubtyp zielgerichtet anpassen und verbessern zu können. **Gruppe 1** dieser

Klassifikation, die PAH, ist definiert als prä-kapilläre PH, entsprechend den o.g. hämodynamischen Kriterien, jedoch ohne Vorhandensein anderer bekannter Ursachen für eine prä-kapilläre PH. Andere Ursachen wären hier die PH bei chronischen Lungenerkrankungen (siehe Gruppe 3), die Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH, siehe Gruppe 4) oder andere seltenen Erkrankungen (siehe Gruppe 5). Diese sich daraus ableitenden, verbleibenden Formen der PAH ähneln sich in ihren pathohistologischen Kennzeichen, in ihrer klinischen Symptomatik und in ihrer Prognose⁵. Zu diesen Formen zählen u.a. die seltene idiopathische Form (IPAH), sowie die erbliche Form, die häufig durch Mutationen in Genen der TGF- β (Transforming growth factor β) Rezeptor-Familie bedingt ist. Eine weitere Ursache der PAH stellt u.a. die medikamentös bedingte PAH dar, die am Beispiel der Nebenwirkung des Wirkstoffs Aminorex in den 1960er Jahren große Aufmerksamkeit erlangte. Aminorex war als Appetitzügler unter dem Handelsnamen Menocil in den 1960er Jahren im deutschsprachigen Raum zugelassen und musste aufgrund des gehäuften Auftretens der pulmonalen Hypertonie wenig später vom Markt genommen werden⁶. **Gruppe 2** umfasst Patienten, die eine PH aufgrund einer Erkrankung des linken Herzens entwickeln, welche zu einer Steigerung des linksatrialen Druckes führt. Der erhöhte Druck setzt sich in die venöse pulmonale Strombahn fort und bedingt sekundär eine PH. **Gruppe 3** subsummiert Patienten mit PH aufgrund von chronischen Lungenerkrankungen oder Hypoxie. Im Vordergrund der Genese der PH steht die alveolare Hypoxie, die bedingt sein kann durch chronische Erkrankungen (wie z.B. der Chronischen obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder interstitieller Lungenfibrose), fehlerhafter Atmung oder Aufenthalt in großer Höhe. **Gruppe 4** umfasst PH aufgrund von pulmonaler arterieller Gefäßobstruktion, wie z.B. im Falle der Chronischen thromboembolischen pulmonalen Hypertonie (CTEPH) oder bedingt durch andere Ursachen des arteriellen Verschlusses, wie z.B. Tumoren, Entzündungen, Parasiten oder angeborenen Gefäßstenosen. **Gruppe 5** fasst verschiedene Formen der PH zusammen, die mit einer Grunderkrankung assoziiert sind, wobei die genaue Ursache der PH unklar und/oder multifaktoriell bedingt sein kann. So können hämatologische (z.B. Chronisch Myeloische Leukämie (CML)), systemische Erkrankungen (z.B. Sarkoidose) oder metabolische Erkrankungen mit einem Anstieg des pulmonalen Gefäßdruckes einhergehen.

1. Pulmonale arterielle Hypertonie (PAH)
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. Idiopathisch (IPAH) 1.2. Hereditär 1.3. Medikamentös/toxisch 1.4. Assoziiert mit: <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Bindegeweberkrankungen 1.4.2. HIV-Infektion* 1.4.3. Portaler Hypertension 1.4.4. Kongenitalen Herzerkrankungen 1.4.5. Schistosomiasis 1.5. PAH mit langfristigem Ansprechen auf Kalzium-Kanal-Blocker 1.6. Pulmonale venookklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapilläre Hämangiomatose 1.7. Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
2. Pulmonale Hypertonie durch Linksherzerkrankungen
<ul style="list-style-type: none"> 2.1. Linksherzversagen mit erhaltener linksventrikulärer Ejektionsfraktion 2.2. Linksherzversagen mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion 2.3. Klappenvitien 2.4. Kongenitale/erworbene kardiovaskuläre Bedingungen, die zu post-kapillärer PH führen
3. Pulmonale Hypertonie durch Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
<ul style="list-style-type: none"> 3.1. Obstruktive Lungenerkrankungen 3.2. Restriktive Lungenerkrankungen 3.3. Andere Lungenerkrankungen mit gemischten restriktiven und obstruktiven Mustern 3.4. Hypoxie ohne Lungenerkrankung 3.5. Anlagebedingte Lungenerkrankungen
4. Pulmonale Hypertonie durch pulmonale arterielle Obstruktionen
<ul style="list-style-type: none"> 4.1. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) 4.2. Andere pulmonal-arterielle Obstruktionen
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen
<ul style="list-style-type: none"> 5.1. Hämatologische Erkrankungen 5.2. Systemische Erkrankungen 5.3. Andere 5.4. Komplexe angeborene Herzfehler

Tabelle 1: Klassifikation der PH. Entnommen der erneuerten Version des Weltkongresses 2019 in Nizza, Frankreich³.

* HIV = Human immunodeficiency virus

1.3 Pathogenese der pulmonalen arteriellen Hypertonie

1.3.1 Einführung

Ein besonderer Anspruch an die Lunge ist der Umstand, dass sie mit ihrem Gefäßsystem, bestehend aus Pulmonalarterien, präkapillären Arteriolen, Kapillaren und Venen, das alleinige Organ ist, das das gesamte Auswurfvolumen des rechten Herzens nach jeder Herzaktion aufnehmen muss. Um diese hohe Volumenbelastung zu kompensieren, zeichnet sich das pulmonale Gefäßsystem unter physiologischen Umständen durch einen niedrigen Gefäßwiderstand mit geringen intraluminalen Drücken im Vergleich zum Systemkreislauf aus. Generell ist der PAP vom Herzzeitvolumen (Cardiac output, CO) und dem Gefäßwiderstand PVR abhängig, während der PVR sich wiederum in vierfacher Potenz umgekehrt proportional zum Gefäßradius verhält:

$$(1) \text{ PAP} = \text{CO} \cdot \text{PVR} \qquad (2) \text{ PVR} \propto \frac{1}{r^4}$$

Einzelnen betrachtet führt eine Halbierung des Gefäßradius damit zu einer 16-fachen Erhöhung des Gefäßwiderstandes innerhalb des betroffenen Gefäßes. Damit können bereits kleinere Gefäßobstruktionen den Widerstand im pulmonalen Gefäßbett signifikant erhöhen und somit zu einem Anstieg der Gefäßdrücke im pulmonalen Kreislauf führen, wie es beispielweise bei der PAH der Fall ist. Die PAH, als seltene jedoch schwere Form der PH, ist grundlegend durch einen Querschnittsverlust bis hin zur Okklusion der distalen Pulmonalarterien mit einem Durchmesser unter 500 µm charakterisiert⁷. Diese Verminderung des Gefäßradius führt zu einer Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes, erhöht folglich die rechtsventrikuläre Nachlast und führt letztendlich langfristig zu einem Rechtsherzversagen. Die klinischen Symptome sind eher unspezifisch und leiten sich hauptsächlich aus der rechtsventrikulären Dysfunktion ab. Sie äußern sich häufig als Belastungsdyspnoe, Müdigkeit, Schwäche bis hin zu Ruhedyspnoe, Agina und Synkope⁸. Die geringe Überlebensdauer unbehandelter Patienten von durchschnittlich 2,8 Jahren nach Diagnosestellung und das initial häufig junge Alter demonstrieren die Tragweite dieser Diagnose für den Patienten⁹. Auch unter adäquater Behandlung verbleibt den Patienten lediglich eine mittlere mediane Überlebenszeit von 7 Jahren, wie eine US-amerikanische Studie aus dem Jahre 2011 zeigte¹⁰. Damit bleibt die PAH weiterhin eine Erkrankung mit schlechter Prognose und eingeschränkten Therapiemöglichkeiten für die Betroffenen.

1.3.2 Histopathologie

Drei pathologische Veränderungen führen im Wesentlichen zum Querschnittsverlust der arteriellen Gefäße: Eine übermäßige Vasokonstriktion, ein pathologischer vaskulärer Gefäßumbau („Remodeling“) und die Ausbildung vaskulärer Läsionen¹¹. Im histologischen Bild imponiert v.a. der Umbauprozess, der dabei häufig alle drei Gefäßschichten (Intima, Media und Adventitia) betrifft und prominentes Merkmal bei vielen Formen der PH ist (siehe Abbildung 1). Klassisch ist dabei die Hypertrophie der Media in pulmonalen Arteriolen, die in allen Subtypen der PH zu beobachten ist. Den Subtyp der PAH zeichnet zusätzlich das Auftreten von komplexen Intimaläsionen, den plexiformen Läsionen, aus. Sie gelten als spezifisches histopathologisches Merkmal der PAH und sind Indikatoren für einen bereits irreversiblen Krankheitsprogress. Fokale Verdickungen der Intima führen hierbei zu dünnen, sinusoidalen Kanälen innerhalb des nativen Gefäßlumens, die das Gefäßlumen obstruieren und damit den Widerstand im pulmonalen Gefäßsystem erhöhen können. Während in größeren Arteriolen (100-500 μm) lediglich die Mediahypertrophie und Intimaproliferation vorherrscht, so sind in kleineren Gefäßen (<100 μm) typischerweise die vaskulären Läsionen in Form von z.B. plexiformen Läsionen anzutreffen^{5,12}. Neben weiteren Auffälligkeiten, wie z.B. thrombotische Läsionen und verschiedene Formen der Intimafibrose, sind perivaskuläre und interstitielle entzündliche Infiltrate ein wesentliches Merkmal der PAH¹³.

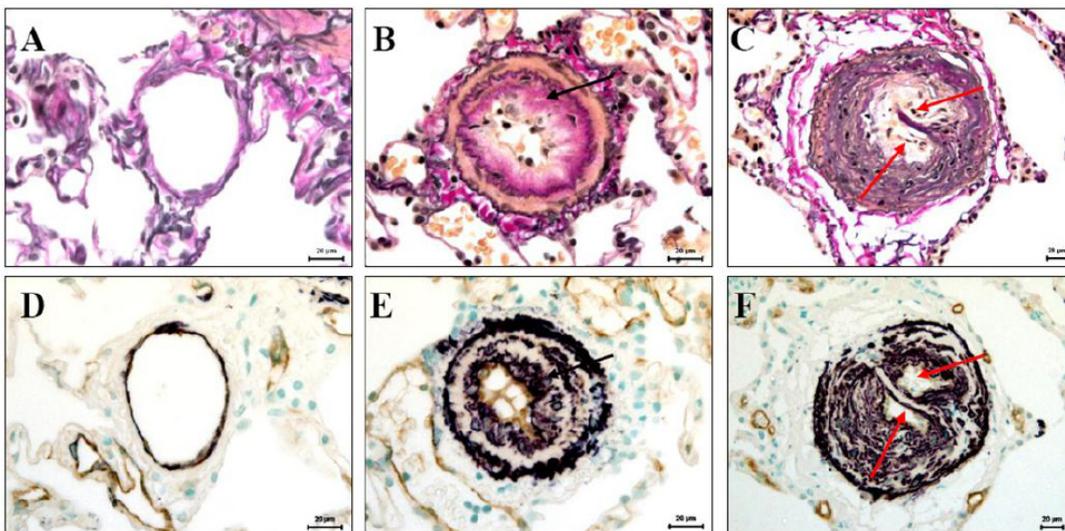


Abbildung 1: Histomorphologische Merkmale der PAH. Normale Lungengefäße (A, D) im Vergleich zu Gefäßen bei PAH mit Mediahypertrophie und Bildung einer Neointima (B, E; schwarze Pfeile), sowie plexiformen Läsionen (C, F; rote Pfeile). A, B, C: Elastica van Gieson Färbung; D, E, F: immunohistochemische Färbung (α -smooth muscle actin (violett) und von Willebrand Faktor (braun)). Angegebener Maßstab = 20 μm . (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Djuro Kosanovic, aus dessen Dissertation im Jahre 2011).

1.3.3 Der rechte Ventrikel bei pulmonaler arterieller Hypertonie

Obwohl die führenden pathologischen Prozesse der PAH das pulmonale Gefäßsystem betreffen, so hat der PAP alleine nur eine moderate prognostische Aussagekraft¹⁴. Vielmehr bestimmt die Anpassungsfähigkeit des rechten Ventrikels den Schweregrad der Symptome und die Überlebensdauer. Der rechte Ventrikel und das pulmonale Gefäßsystem werden daher nicht als zwei eigenständige Entitäten betrachtet, sondern als zusammenhängendes kardiopulmonales System¹⁵. Beim Gesunden befördert der rechte Ventrikel trotz seiner muskelschwachen dünnen Wand das gleiche Schlagvolumen wie der linke Ventrikel, mit nur einem Sechstel dessen Muskelmasse bzw. einem Viertel dessen Auswurfleistung¹⁶. Möglich ist dies dem rechten Ventrikel, als Teil des Niederdrucksystems, durch den geringen Gefäßwiderstand innerhalb der Lungenstrombahn. Während Volumenschwankungen für den rechten Ventrikel relativ gut toleriert werden, stellt die Nachlasterhöhung eine kritische Situation dar: Erhöht sich der Widerstand akut, z.B. durch eine Lungenarterienembolie, verringert sich das Schlagvolumen nahezu linear zur Widerstandserhöhung und führt bei entsprechend hoher Widerstandserhöhung zum kardiogenen Schock¹⁴. Verläuft die Widerstandserhöhung chronisch, wie im Fall der PAH, kann der Ventrikel sich in einem morphologischen Umbauprozess den erhöhten Widerstandsverhältnissen anpassen. Dieser Umbauprozess lässt sich in zwei Formen unterteilen: Die adaptive und die maladaptive Phase¹⁵. Beim adaptiven Zustand garantieren u.a. eine vermehrte Kapillarisation, konzentrische Hypertrophie und erhöhte Kontraktilität des rechten Ventrikels den Erhalt der Auswurfleistung. Bei der maladaptiven Form führen Rarifizierung (Schwund) der Kapillaren, Proliferationsabbruch der Kardiomyozyten, Inflammation und Fibrose des rechten Ventrikels zur Verschlechterung der hämodynamischen Funktion^{17,18}. Im Zuge dessen führt die maladaptive Form zusammen mit einer fortschreitenden Dilatation und konsekutiver Trikuspidalklappeninsuffizienz zur Reduktion des Schlagvolumens. Myokardiale Minderperfusion aufgrund von einerseits erniedrigtem Perfusionsdruck und andererseits erhöhten Sauerstoffbedarf führt zur weiteren Reduktion der Kontraktilität und, gemäß eines *circulus vitiosus*, zum Versagen der rechtsventrikulären Pumpleistung^{14,19}. Die genauen Auslöser sowie der Zeitpunkt des Überganges von adaptiver zu maladaptiver Form bis hin zum Rechtsherzversagen sind noch nicht vollends geklärt, was die Vorhersehbarkeit des Krankheitsverlaufs erschwert.

1.3.4 Molekulare Ursachen des Querschnittverlustes

PAH ist eine komplexe und multifaktorielle Erkrankung, bei der im Laufe der Forschung fortwährend neue Pathomechanismen bekannt wurden. Trotz der Heterogenität der Erkrankung können drei grundlegende pathologischen Prozesse abgegrenzt werden, die im unterschiedlichen Maße einen Verlust der Querschnittsfläche bedingen und untereinander in Verbindung stehen: Eine übermäßige Vasokonstriktion (1), ein vaskulärer Umbauprozess (2), sowie vaskuläre Läsionen (3) führen zur einer Obstruktion der Pulmonalarterien und somit zum Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes (siehe Abbildung 2)¹¹.

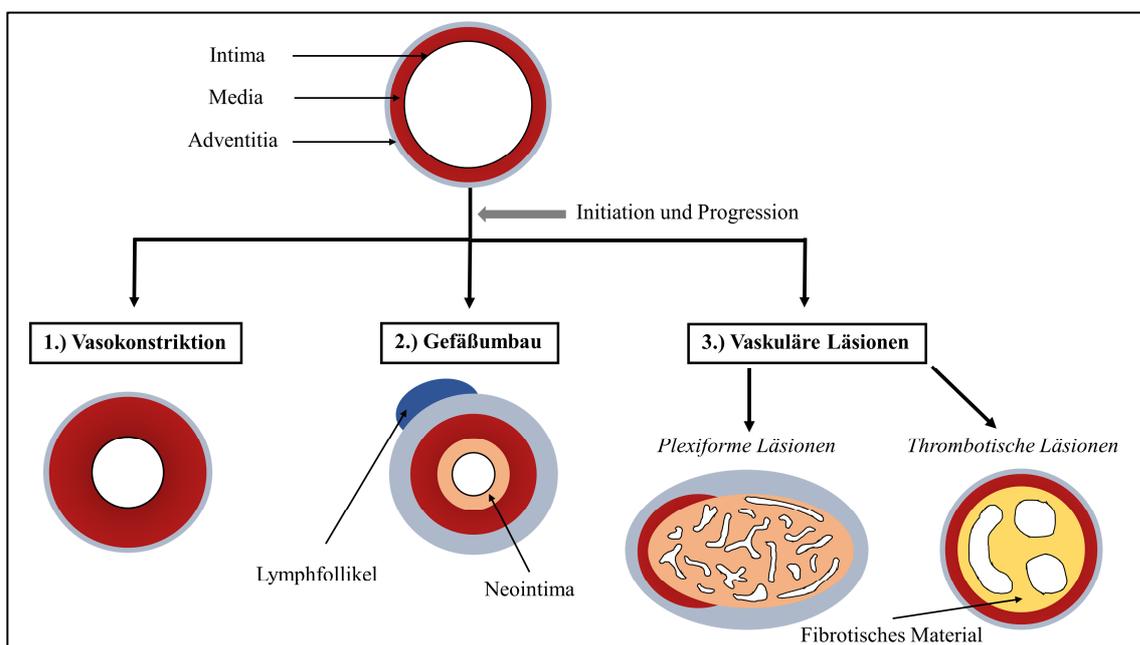


Abbildung 2: Pathogenese der PAH. Entworfen in Anlehnung nach McLaughlin et al¹¹. Drei wesentliche Prozesse kennzeichnen die sukzessive Gefäßobstruktion in PAH: Nach einer Initiation kommt es zur **Vasokonstriktion** des Gefäßes durch eine Dysbalance an tonusmodulierenden Mediatoren, sowie u.a. durch eine abnormale Expression oder Funktion von Ionenkanälen. Weiter führen u.a. vermehrte Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz von ortsständigen Zellen in allen Wandschichten zu einem **Gefäßumbau** mit ausgeprägten perivaskulären inflammatorischen Infiltraten. Bedingt durch diesen dysfunktionalen Wachstumsprozess und einem prokoagulativem Milieus, können **vaskuläre Läsionen** das Gefäßlumen weiter obstruieren. Dabei stehen u.a. die prominenten plexiformen sowie thrombotische Läsionen im Vordergrund.

Im folgenden Abschnitt sollen die drei pathologischen Prozesse genauer erläutert werden:

(1) Beim Gesunden sorgt u.a. das Endothel durch ein Gleichgewicht an vasokonstriktiven und vasodilatativen Substanzen für den physiologischen Vagustonus im pulmonalen Gefäßbett. Verantwortlich für die exzessive Vasokonstriktion ist bei der PAH in erster

Linie eine endotheliale Dysfunktion, die zu einem Ungleichgewicht an vasoaktiven Mediatoren führt. Einem Mangel an vasodilatierenden Substanzen, wie Prostaglandin I₂ (PGI₂) oder Stickstoffmonoxid (NO), steht ein Überangebot an vasokonstriktiven Substanzen, wie Thromboxan, Endothelin 1 (ET-1) oder 5-Hydroxytryptamin (5-HT) gegenüber. Des Weiteren wird eine veränderte Expression von Ionenkanälen, v.a. Kalium- und Kalziumkanäle, in Verbindung mit der erhöhten Vasokonstriktion gebracht. Beispielsweise wurde bei der IPAH eine verminderte Expression und Aktivität von spannungsabhängigen Kaliumkanälen in glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (PASMOC) beschrieben, was folglich durch eine elektrophysiologische Membran-Depolarisation mit Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, eine gesteigerte Kontraktion der Gefäßmuskelzellen zur Folge hat²⁰.

(2) Das vaskuläre „Remodeling“ ist ein aktiver und bei der PAH im Vergleich zu anderen PH-Formen besonders ausgeprägter Umbauprozess, der zu strukturellen Veränderungen aller drei Gefäßschichten führt. Während im physiologischen Zustand ein proliferativer Gleichgewichtszustand vorliegt, ist der Umbauprozess gekennzeichnet durch eine exzessive Zellproliferation, gestörte Apoptose-Insensitivität, vermehrte Zellmigration und Differenzierung, sowie Synthese und Degradierung von extrazellulären Matrixkomponenten. Im Bereich der Intima stellt sich dies als gesteigerte Endothelproliferation dar; hinzukommen hier Endothelschädigungen und eine Invasion mit Myofibroblasten und Fibrose der Intima. Im Bereich der Media ist dieser proliferative und Apoptose-resistente Zustand bei den PASMOCs besonders stark und zeigt sich als Mediahypertrophie, was als charakteristisches Merkmal der PAH und weiterer PH-Formen gilt. Die Adventitia nimmt im Zuge des proliferativen Umbauprozesses im Umfang zu und ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Fibrosierung und durch das Auftreten perivaskulärer, inflammatorischer Infiltrate^{20,21}.

(3) Als Ausdruck dieses pathologischen Wachstumsverhaltens werden im Bereich der Intima die histologisch prominenten, plexiformen Läsionen beobachtet, die das Gefäßlumen noch weiter reduzieren. Auch thrombotische Zusammenschlüsse in den Pulmonalarterien finden sich häufig bei Patienten mit PAH. Sie zeigen einen gerinnungsfördernden Phänotyp, bei denen pro-koagulatorische Faktoren, wie der Von-Willebrandt-Faktor und Thromboxan vermehrt aktiv sind. Gleichzeitig scheint die Fibrinolyse über eine erhöhte Expression an antifibrinolytischen Substanzen gestört zu sein. Durch Organisation und Revaskularisierung des Thrombus können ausgeprägte

fibrotische, sinusoidale Läsionen (sogenannte thrombotische Läsionen) entstehen (siehe Abbildung 2)^{5,20}.

1.4 Proliferation bei pulmonaler arterieller Hypertonie

1.4.1 Proliferationsfördernde Faktoren

Die ungehemmte Proliferation, v.a. der PASMCs der Media, ist zentraler Teilaspekt des „Remodelings“ der pulmonalen Arterien bei PAH und Ansatzpunkt dieser Arbeit. Die Ursachen für dieses Phänomen sind vielschichtig; ein wesentlicher Faktor können dabei genetische Varianten spielen. So wurde beispielsweise ein Defekt im Gen der Rezeptorkinase BMPR2 (Bone morphogenetic protein receptor type 2) identifiziert, der in ca. 75% aller Patienten mit PAH und positiver Familienanamnese nachzuweisen ist^{5,22}. BMPR2 ist ein wichtiges Protein des TGF- β -Signalwegs von dem multiple Zellfunktionen, wie Proliferation, Zelldifferenzierung oder Apoptose beeinflusst werden. Mutationen in diesem Gen führen zu einem Funktionsverlust des resultierenden BMPR2-Proteins und können somit wachstumsfördernd wirken und den vaskulären Umbauprozess begünstigen. Einen wichtigen Punkt stellen ebenfalls Wachstumsfaktoren dar, wie beispielsweise der „Platelet-derived-growth factor“ (PDGF), der für vermehrte Proliferation, Migration und Apoptose-Resistenz verantwortlich gemacht wird. Eine entscheidende Rolle wird hierbei der endothelialen Dysfunktion zugesprochen, die in Form von übermäßiger parakriner Synthese von Wachstumsfaktoren und mitogenen Zytokinen das physiologische Verhältnis („Cross-talk“) der Gefäßschichten untereinander stört. Ebenfalls können Signale, die Vasokonstriktion auslösen, auch proliferationsfördernd wirken. So können sowohl Vasokonstriktoren wie ET-1 oder 5-HT, als auch die gestörte Homöostase an Kalzium- bzw. Kaliumionen, stimulierend auf die PASMC-Proliferation wirken. Abnormale Expressionen von bestimmten Transkriptionsfaktoren, epigenetische Veränderungen, sowie vermehrte Expression an Proteasen und Elastasen fördern die Proliferation von v.a. ECs und PASMCs und erweitern das ätiologische Bild^{20,23}. Unklar bleibt jedoch, welche genaue Rolle Inflammationsprozesse, welche schon seit langem ein prominentes pathologisches Merkmal sind, bei PAH einnehmen und inwiefern diese die Proliferation beeinflussen und/oder sogar auslösen. Die Entzündung in Form von perivaskulären Infiltraten, hauptsächlich bestehend aus Lymphozyten, beginnt früh und persistiert im Laufe der Erkrankung. V.a. plexiforme Läsionen und andere vaskuläre Läsionen zeigen ausgeprägte

Entzündungsanzeichen in Form von vermehrten Entzündungszellen, Zytokinen und Chemokinen. Dabei soll die Entzündung als Zeichen einer defekten, lokalen Mikroumgebung innerhalb der Gefäßwand zur Initiation und Progression der Erkrankung beitragen. So ist bekannt, dass bestimmte Zytokine bei Patienten mit PAH (z.B. Interleukin-1 β) eine proliferationsfördernde Wirkung auf die PASMCs haben können^{7,20,24}.

1.4.2 Pulmonale arterielle Hypertonie und Tumorerkrankungen

Die Ähnlichkeiten im Wachstumsverhalten vaskulärer Zellen bei PAH zu Tumorzellen hat in den letzten Jahren immer mehr zu einem neuen tumorähnlichen Erklärungs- und Therapiekonzept geführt^{7,24-26}. Im Zuge dessen wurden grundlegende molekularbiologische Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede im Phänotyp von Tumorzellen zu vaskulären Zellen bei PAH untersucht (siehe Tabelle 2).

Charakteristische Merkmale von Tumoren	Tumor	PAH
• Aufrechterhaltung proliferativer Signale	✓	✓
• Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen	✓	✓
• Umgehen der Apoptose	✓	✓
• Deregulierter zellulärer Metabolismus	✓	✓
• Induktion von Angiogenese	✓	(✓)
• Unbegrenzt Potential zur Zellteilung	✓	?
• Tumorfördernde Entzündungsreaktion	✓	?
• Vermeidung immunogener Zerstörung	✓	?
• Invasion und Metastasierung	✓	X
• Mutationen / Instabilität des Genoms	✓	X

Tabelle 2: Vergleich charakteristischer Merkmale von Tumoren zur PAH. Entworfen nach Guignabert et al⁷. Die charakteristischen Merkmale des Tumorwachstums („Hallmarks of cancer“) wurde erstmal von Hanahan und Weinberg im Jahre 2000 publiziert und im Jahre 2011 erweitert. Die PAH zeigt wesentliche Überschneidungen zu diesen Merkmalen, v.a. das zelluläre Proliferationsverhalten betreffend. Weitere Merkmale, wie die prominente Entzündungsreaktion bei Tumoren, kann bei der PAH deskriptiv beschrieben werden, dessen Rolle ist jedoch noch nicht vollends geklärt. Jedoch unterscheidet sich das Tumorwachstums von der PAH in wichtigen Aspekten, wie der Invasion und Metastasierung, die bei der PAH nicht beobachtet werden.

Zu den wesentlichen Gemeinsamkeiten der PAH und onkologischen Erkrankungen zählt die gestörte zelluläre Integrität des betroffenen Gewebes. Bei beiden Erkrankungsformen imponiert eine fortwährende Aktivierung von proliferativen Signalwegen, sowie eine inaktive Wachstumshemmung und defekte Apoptose-Induktion. Zusätzlich ist das exzessive Wachstum gekennzeichnet durch einen veränderten Energiestoffwechsel,

welcher als Warburg-Effekt bekannt ist. Analog zu Tumorzellen wechseln die Gefäßzellen bei der PAH von einer mitochondrialen Verstoffwechslung zur gesteigerten Glykolyse, die, als Teil eines anaeroben Energiestoffwechsels, trotz ausreichend zur Verfügung stehenden Sauerstoffes, hierdurch essentielle Substrate für den Prozess der Zellteilung generiert²⁰. Die Stimulation der Angiogenese (Neubildung von Blutgefäßen) als weiteres Merkmal von Tumorerkrankungen kann in beiden Krankheitsentitäten beobachtet werden - allerdings in unterschiedlicher Ausprägung. Tumoren nutzen die vermehrte Expression des „Vascular endothelial growth factor“ (VEGF), ein wichtiger Induktor der Angiogenese, um ihren erhöhten nutritiven Bedarf zu decken. Auch in Lungen von PAH-Patienten sind VEGF und dessen Rezeptor (vor allem in plexiformen Läsionen) in ihrer Konzentration erhöht und scheinen so eine Rolle in der Gefäßobstruktion zu spielen, während im Vergleich zu Tumoren statt einer Neubildung eher eine Rarefizierung der Lungengefäße zu beobachten ist²⁷. Im Weiteren wurde bei Tumorerkrankungen und bei PAH ein begleitender inflammatorischer Prozess beobachtet, dessen Rolle in beiden Krankheitsentitäten noch nicht abschließend geklärt werden konnte. Es gibt aber auch wesentliche Unterschiede: Beispielweise fehlt bei der PAH sowohl das aggressive und invasive Wachstum als auch die Metastasierung, was für maligne Tumore charakteristisch ist. Das Wachstumsverhalten bei PAH ähnelt eher einem benignen Tumor, der lokal begrenzt wächst, und weder umgebendes Gewebe infiltriert noch Metastasen ausbildet. Auch ist die Heterogenität der Proliferation bei PAH ausgeprägter, da hier Zelltypen aus allen Gefäßschichten betroffen sind, während bei malignen Tumoren oftmals ein rein monoklonales Wachstum, ausgehend von einem einzelnen zellulären Ursprung, beobachtet wird. Ferner werden bei Tumorerkrankungen häufig eine angeborene oder erworbene Schädigung der DNA, z.B. von Tumorsuppressorgenen, beobachtet. Zwar wird die PAH ebenfalls mit genetischen Variationen (z.B. BMRP-2) in Verbindung gebracht, so konnte dies zum jetzigen Stand nur für ein Teil der Patienten, die an PAH erkrankten, beschrieben werden⁷. Klar ist, dass dieser Erklärungsansatz, der die PAH als tumorähnliche Erkrankung betrachtet, nicht allein die Pathogenese der PAH erklären kann. Dennoch ermöglicht dieser Ansatz neue Angriffspunkte für therapeutische Interventionen aus dem Bereich der Onkologie. Im Zuge dessen wurden bereits antiproliferative Medikamente, die für Tumorerkrankungen entwickelt wurden, auf eine therapeutische Wirksamkeit für Patienten mit PAH untersucht. So zeigte Schermuly et al. für den Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib, der zur Therapie der CML zugelassen ist, eine Rückbildung der PAH in mehreren

Tiermodellen²⁸. Auch im Zuge von klinischen Studien konnte Imatinib hämodynamische Parameter sowie die Belastbarkeit verbessern, wurde aber aufgrund schwerer Nebenwirkungen während der Phase-III-Studie als medikamentöse Therapie verworfen^{29,30}. Vergleichbar mit diesen Erkenntnissen verhinderte der Multikinaseninhibitor Sorafenib, der u.a. zur Behandlung des Leberzellkarzinoms zugelassen ist, in einem Tiermodell den pathologischen Umbauprozess der Pulmonalarterien und verbesserte die kardiale und pulmonale Funktionsleistung³¹. Diese Ergebnisse geben Anlass, dass antiproliferative Therapiestrategien in der Behandlung der PAH einen neuen Therapieansatz bieten können.

1.4.3 Der Zellzyklus und Inhibitoren von Zyklin-abhängigen-Kinasen

Die Proliferation kann durch Aktivierung einer Vielzahl von unterschiedlichen zellulären Signalwegen ausgelöst werden. Ihnen allen gemeinsam ist die Aktivierung des Zellzykluses, der zusätzlich auch wichtige genomische Überwachungsfunktionen erfüllt. Durch eine gesteigerte Proteinbiosynthese und die Verdopplung des genetischen Materials wird die Zelle auf die Zellteilung vorbereitet, im Zuge der Mitose die Kernteilung vollzogen und mit der Zytokinese die Zellteilung abgeschlossen. Dieser Prozess ist eng reguliert durch die Aktivität unterschiedlicher Serin/Threonin-Proteinkinasen, den Zyklin-abhängigen-Kinasen (im Englischen „Cyclin-Dependent-Kinases“, fortführend als CDKs abgekürzt), und deren korrespondierenden Zyklinen. Während die CDKs im Laufe des Zellzykluses konstant exprimiert werden, unterliegt die Expression der Zyklone phasenspezifischen Schwankungen. Da die CDKs nur durch Bindung ihres jeweiligen regulatorischen Zyklins aktiv sind (d.h. eine Phosphorylierung ihres Substrat-Proteins bewirken), reguliert die Expression der Zyklone deren Aktivität und erlaubt somit einen koordinierten Ablauf des Zellzykluses und der Zellteilung. Der Zellzyklus selbst gliedert sich in eine Ruhephase und vier aktive Phasen: G₀-Phase, G₁-Phase, S-Phase, G₂-Phase und Mitose (siehe Abbildung 3). Es wurde eine Vielzahl von unterschiedlichen CDKs identifiziert, von denen CDK 1, CDK 2, CDK 4 und CDK 6 eine tragende Rolle beim Zellzyklus spielen. Die durch Zyklin-Bindung aktivierten CDKs phosphorylieren und inaktivieren das Retinoblastom-Protein (RB), welches als Tumorsuppressor-Protein fungiert. RB unterdrückt in seinem aktiven Zustand durch Bindung und damit Inhibition des Transkriptionsfaktors E2F die Transkription von Genen, die für die Zellteilung notwendig sind.

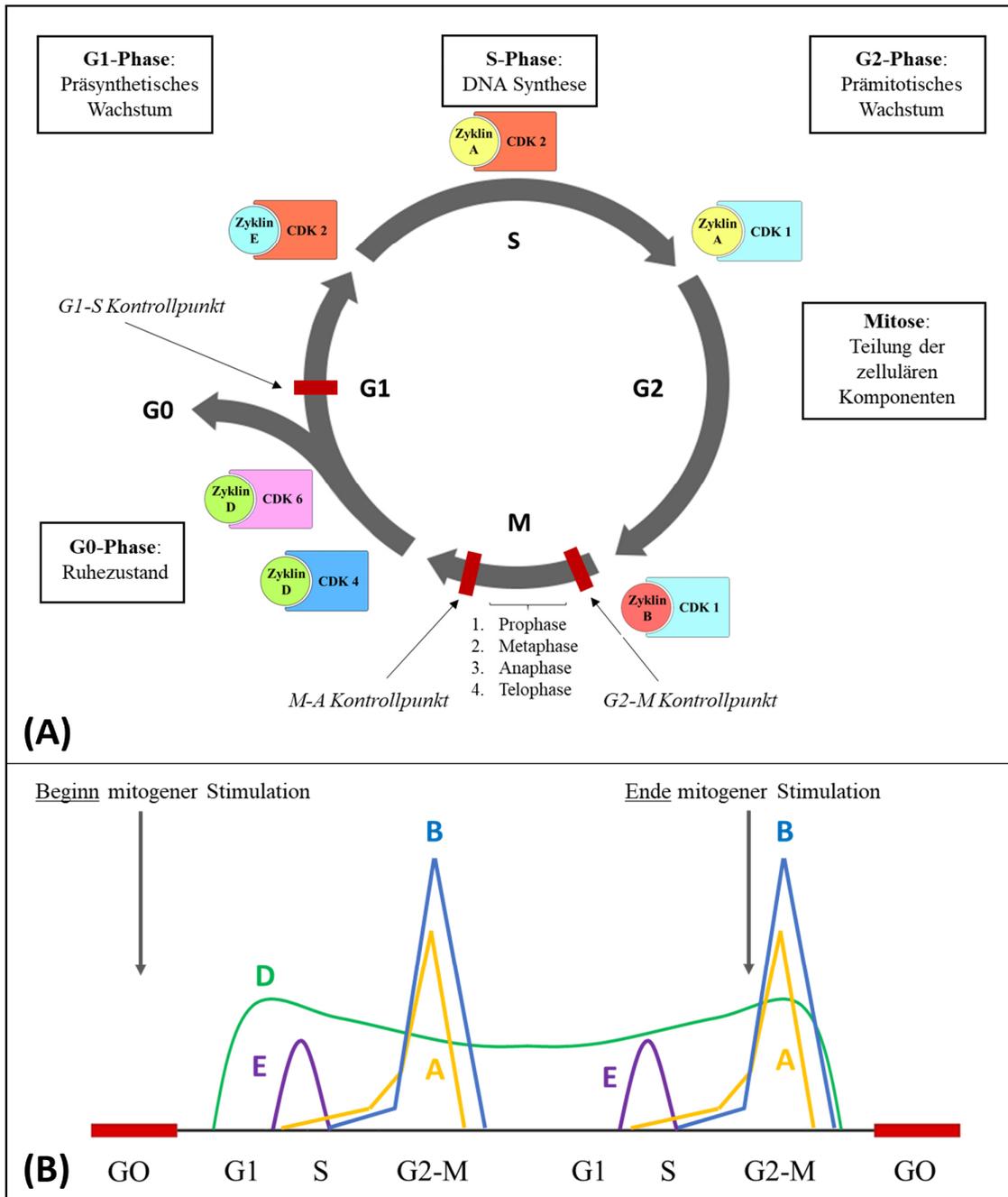


Abbildung 3: Überblick über den Zellzyklus (A). Oszillation der Zykline nach mitogener Stimulation (B). Entworfen in Anlehnung an Roskoski et al³². Der Ablauf des Zellzykluses gliedert sich in vier aktive Phasen: G1-, S-, G2- und M-Phase. Auf mitogener Stimulation hin wird Zyklin D exprimiert, welches im Komplex mit CDK 4 und CDK 6 die Progression durch die G1-Phase erlaubt. Zusammen mit CDK 2/Zyklin E wird der G1-Restriktionspunkt überschritten, woraufhin die Zelle determiniert ist, den Zellzyklus zu durchlaufen. Der CDK 2-Zyklin A Komplex führt die Zelle durch die S-Phase. Die Transition von der S- zu der G2- Phase wird wiederum von CDK 1/Zyklin A bestimmt, während der Übergang in und durch die Mitose selbst durch CDK 1/Zyklin B gesteuert wird. Ist die Zelle nicht mehr teilungsfähig oder bleibt die mitogene Stimulation aus, geht die Zelle in einen Ruhezustand, die G0 -Phase, über.

Die Aktivität der CDKs wird neben der phasenspezifischen Expression von Zyklinen durch eine vielfältige Gruppe an endogenen CDK-Inhibitoren (CDKIs) kontrolliert, die die Zellteilung unter ungünstigen Umständen stoppen. Dabei stehen zwei Familien an CDKIs im Vordergrund: Die INK4-Familie bestehend aus p15 (INK4B, CDKN2B), p16 (INK4A), p18 (INK4C, CDKN2C) und p19 (INK4D, CDKN2D) hemmen selektiv CDK 4 und CDK 6, während die Mitglieder der CIP/KIP-Familie, namentlich p21 (CDKN1A), p27 (CDKN1B) und p57 (CDKN1C), eine breite Anzahl an unterschiedlichen CDKs inhibieren können (siehe Abbildung 4)³². Sie sind dabei ebenfalls Effektorproteine an wichtigen Kontrollpunkten, welche die Zelle nutzt, um einen verfrühten oder schadhafte Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus zu verhindern und um damit die Integrität ihrer DNA und der zellulären Stabilität zu schützen. In dem Fall von DNA-Schäden wird am G1-S-Kontrollpunkt und G2-M-Kontrollpunkt, sowie bei Defekten des mitotischen Spindelapparates in der Mitose, die Progression des Zellzyklus unterbrochen, um die entsprechenden DNA-Schädigung zu reparieren oder gezielt die Apoptose einzuleiten.

Störungen in diesem eng abgestimmten Prozess des Zellzyklus können zu unkontrollierter Proliferation führen und sind in mehreren Tumorentitäten nachgewiesen. DNA-Schäden werden somit nicht mehr korrigiert und wachstumsfördernde Mutationen können sich anhäufen, was den entarteten Zellen einen Vorteil gegenüber regulierenden Mechanismen verschafft. So ist die Überexpression von CDKs, wie z.B. CDK 4 u.a. in Glioblastomen³³, von Zyklinen, wie z.B. Zyklin D1 u.a. im Multiplen Myelom³⁴, oder die verminderte Expression von CDKIs, wie z.B. p27 u.a. im Kolonkarzinom³⁵, nachweisbar. Daraus leitet sich der therapeutische Einsatz von pharmazeutischen Zellzyklusinhibitoren ab, welche sich in drei Untergruppen gliedern lassen: Synthetische CDKIs, Kontrollpunktkinasen-Inhibitoren und Inhibitoren von Polo-like-Kinasen, welche u.a. an der Bildung der mitotischen Spindel beteiligt sind³³. Bereits seit über 20 Jahren sind synthetische kleinmolekulare CDKIs in Testung zur Therapie unterschiedlicher Tumorentitäten, wobei erst 2015 die erste Zulassung eines CDKI erfolgte. In diesem Prozess wurde die erste Generation an CDKIs, wie z.B. Flavopiridol, aufgrund ihres unspezifischen Wirkungspotential und/oder hoher Toxizität weiter modifiziert. Die zweite und dritte Generation konnte mit verbesserter Selektivität und geringeren Nebenwirkungen überzeugen und zahlreiche Vertreter befinden sich bereits in klinischen Studien bis hin zur Zulassung des Inhibitors Palbociclib (Ibrance) im Jahre 2015 zur

kombinierten Erstlinientherapie des Hormonrezeptor-positiven und HER2 (Human epidermal growth factor receptor 2) -negativen metastasierten Mamma-Karzinoms^{32,33,36}.

Aufgrund ihres hohen antiproliferativen Effektes, des beschriebenen sicheren Einsatzes in *in vitro* und *in vivo* Versuchen und aufgrund ihrer sich ergänzenden Wirkspektren (siehe Tabelle 3) wurden die Inhibitoren Dinaciclib und Palbociclib für diese Arbeit ausgewählt und ihre Charakteristika sollen im folgenden Abschnitt erläutert werden.

Inhibitor	CDK 1	CDK 2	CDK 3	CDK 4	CDK 5	CDK 6	CDK 7	CDK 8	CDK 9
Dinaciclib	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Palbociclib	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Tabelle 3: Wirkungsprofil von Dinaciclib und Palbociclib.

Dinaciclib ist ein niedermolekularer, hochpotenter Inhibitor der zweiten Generation, dessen Wirkungsspektrum die CDKs 1,2,5 und 9³⁷ umfasst und in mehreren *in vitro* und *in vivo* Modellen erfolgreich eingesetzt wurde, u.a. in T-Zell-Leukämie und soliden Tumoren^{38,39}. Dinaciclib blockiert selektiv die proliferationsfördernde Wirkung der CDKs durch Bindung an ihre ATP-Bindungsstelle⁴⁰. In weiterführenden klinischen Studien konnte Dinaciclib v.a. einen therapeutischen Effekt in hämatologischen Malignitäten wie dem Multiplen Myelom und der Chronischen lymphatischen Leukämie (CLL)^{41,42} zeigen, während in soliden Tumoren, wie Brustkrebs und Lungenkrebs, ein signifikanter Effekt ausblieb^{43,44}. Die Effektivität von Dinaciclib als Kombinationsmöglichkeit zur Therapie solider und hämatologischer Malignitäten ist Gegenstand weiterer klinischen Studien (ClinicalTrials.gov; Stand 03/2020).

Palbociclib ist ebenfalls ein niedermolekularer Inhibitor, welcher selektiv die Aktivität von CDK 4 und CDK 6 blockiert. Fry et al. konnten in verschiedenen Tumorzelllinien als auch in entsprechenden *in vivo* Modellen eine antiproliferative Wirkung durch RB-Suppression zeigen⁴⁵. Finn et al. konnten diesen antiproliferativen Effekt besonders in Östrogenrezeptor-positiven (ER-positiv) Brustkrebszellen beobachten und zeigen, dass die Kombination mit Östrogenrezeptormodulatoren synergistisch mit Palbociclib wirkt⁴⁶. In einer darauf aufbauenden Phase-II-Studie (PALOMA-1) konnten die Autoren durch die Therapie mit Palbociclib und dem Aromatasehemmer Letrozole eine signifikante Zunahme progressionsfreier Überlebenszeit bei Frauen mit metastasierten ER-positiven, HER2-negativen Brustkrebs im Vergleich zur Letrozole alleine feststellen⁴⁷. Nachdem in

einer Phase-III-Studie auch die Wirksamkeit des kombinierten Einsatzes von Palbociclib und dem Östrogenrezeptorantagonisten Fulvestrant, im Vergleich zu Fulvestrant alleine, nachgewiesen wurde⁴⁸, erfolgte die Zulassung durch die US-amerikanischen Food and Drug Administration (FDA) und die Europäische Arzneimittel-Agentur (EMA) im Jahre 2015³⁶. Eine weitere Phase-III-Studie (PALOMA-2) bestätigte die in der Phase-II-Studie (PALOMA-1) dargelegte klinische Wirksamkeit von Palbociclib bei gleichzeitig guter Toleranz⁴⁹. Damit fand die Kombination Palbociclib mit Letrozole für postmenopausale Patientinnen im metastasierten Stadium eines ER-positiven/HER2-negativen Brustkrebs Eingang in die klinische Praxis. Zum Einsatz von Palbociclib in weiteren Kombinationen und in anderen Stadien des Brustkrebses, sowie zur Evaluierung des möglichen Nutzens in anderen Tumorentitäten, werden weitere klinische Studien momentan durchgeführt (ClinicalTrials.gov; Stand 03/2020).

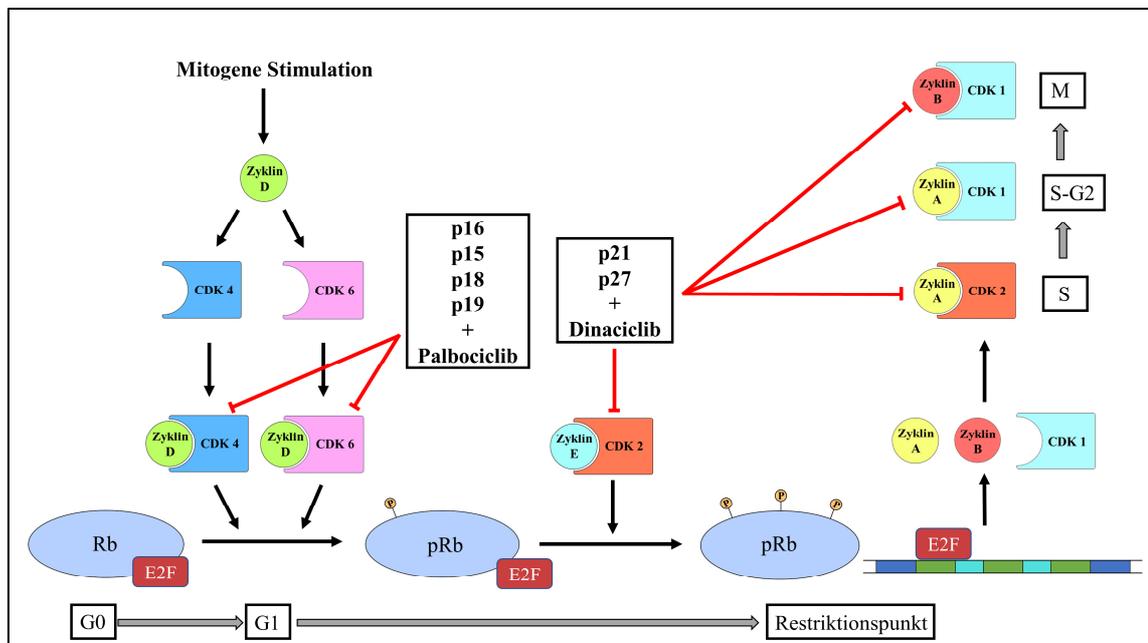


Abbildung 4: Wirkmechanismus endogener und synthetischer CDKIs. Entworfen in Anlehnung an Collier⁵⁰, Dueñas et al³⁶ und Ingham et Schwartz⁵¹. Nach mitogener Stimulation wird über intrazelluläre Signalkaskaden letztendlich Zyklin D exprimiert, welches in Komplex mit CDK4 und CDK 6 das RB-Protein phosphoryliert. Durch die weitere Phosphorylierung über den CDK 2/Zyklin E Komplex wird die Konformation des RB-Proteins verändert, was zur Freisetzung des vorher gebundenen Transkriptionsfaktors E2F führt. Dieser induziert die Synthese von weiteren essenziellen Proteinen für die nachfolgenden Phasen des Zellzyklus. Endogene als auch synthetische CDKIs intervenieren in diesen Ablauf über Inhibition der aktiven CDK/Zyklin-Komplexe. Während die Ink-Familie und Palbociclib die phosphorylierende Aktivität von CDK 4 und CDK 6 blockieren, inhibieren die CIP/KIP-Familie und Dinaciliclib u.a. CDK 1 und CDK 2. Der Arrest des Zellzyklus ist die letztendliche Konsequenz der CDK-Inhibition.

1.5 Fragestellung

Die exzessive Proliferation v.a. der PSMCs im Bereich der Media ist ein zentraler Aspekt der Pathogenese der PAH. Während etablierte Therapiestrategien vermehrt auf vasodilatatorischen Effekten basieren und somit eher einen symptomatischen Ansatz verfolgen, fehlen Ansätze, die gezielt den strukturellen Gefäßumbau adressieren. Dabei zeigt das hyperproliferative Wachstumsverhalten bei der PAH Ähnlichkeiten zu dem Wachstum von Tumoren. Pharmazeutische CDKIs wurden dabei bereits in mehreren Tumorentitäten erfolgreich untersucht und zur Behandlung des fortgeschrittenen Brustkrebses zugelassen. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Fragestellung, inwiefern Dysregulierungen des Zellzykluses eine Rolle in der Pathogenese der PAH spielen und ob der Einsatz von synthetischen CDKIs einen neuartigen Therapieansatz für die Therapie der PAH darstellen kann, um den Prozess des krankheitsbedingten Gefäßumbaus zu reduzieren (siehe Abbildung 5).

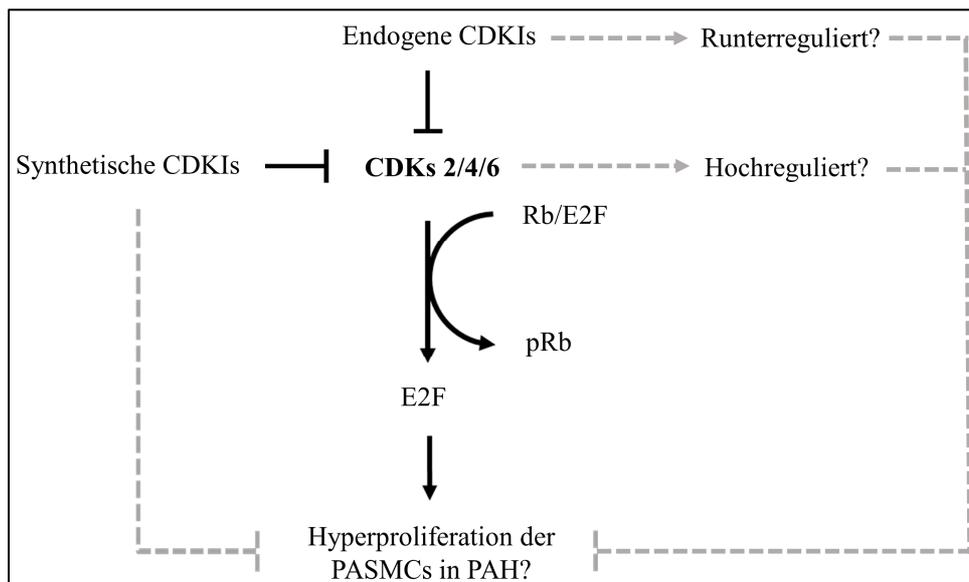


Abbildung 5: Arbeitshypothesen der Arbeit. Zellzyklusfehlregulationen in Form von entweder hochregulierten CDKs oder fehlender Inhibition der CDKs durch endogene CDKI könnten die Hyperproliferation der PSMCs in PAH begünstigen. Die verstärkte Aktivität der CDKs würden dabei über eine verstärkte Phosphorylierung von RB zu einer Freisetzung des Transkriptionsfaktor E2F führen.

Im Zuge dessen sollte das antiproliferative Potential der CDKIs Dinaciclib und Palbociclib an isolierten glatten Muskelzellen der Pulmonalarterie getestet werden, um einen eventuellen therapeutischen Nutzen zu eruieren, sowie die Pathogenese der PAH

auf zellulärer Ebene weiter zu beleuchten. Dazu gliederte sich die Arbeit in folgende Teilbereiche:

- 1) Analyse der Proteinexpression in Lungenhomogenisaten: In Lungenhomogenisaten von PAH-Patienten sollte untersucht werden, inwiefern eine Überexpression von CDKs bzw. eine Reduktion der Expression von endogenen CDKIs nachweisbar ist.
- 2) Zellkulturversuche mit synthetischen CDK-Inhibitoren: In Zellkulturversuchen sollte das Wachstumsverhalten von PSMCs unter Einsatz der synthetischen CDKIs, Dinaciclib und Palbociclib, und deren molekularer Wirkmechanismus untersucht werden. Hier sollte insbesondere das antiproliferative, therapeutische Potential getestet werden, mit dem Ziel, den vaskulären Umbau zu vermindern und somit den Gefäßwiderstand positiv zu beeinflussen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Chemikalien, Puffer und Lösungen	Hersteller (Land)
2-Propanol $\geq 98,5\%$	Sigma-Aldrich (USA)
Acrylamid/Bisacrylamid 30%	Roth (Deutschland)
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich (USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	GE Healthcare (USA)
Chemilumineszenz Substrat	Thermo Fisher Scientific (USA) und GE Healthcare (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (USA)
Dinaciclib (SCH727965)	Selleckchem (USA)
Essigsäure 100 %	Roth (Deutschland)
Ethanol $\geq 99,5\%$	J.T. Baker (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Deutschland)
Glycin $> 98\%$	Roth (Deutschland)
Imatinib (STI571)	Selleckchem (USA)
LE-Agarose	Biozym Scientific (Deutschland)
Methanol $\geq 99,5\%$	Roth (Deutschland)
Milchpulver	Roth (Deutschland)
Natriumchlorid	Roth (Deutschland)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth (Deutschland)
Palbociclib (PD-0332991)	Selleckchem (USA)
Paraformaldehyd (PFA)	Roth (Deutschland)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich (USA)
Propidiumiodid	Roth (Deutschland)
RNase A	Macherey-Nagel (Deutschland)
RNase Away	Roth (Deutschland)
Staurosporin	Merck (Deutschland)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth (Deutschland)
Trichlormethan/Chloroform $\geq 99,5\%$	Roth (Deutschland)

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth (Deutschland)
Tris-Base	Roth (Deutschland)
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCL)	Roth (Deutschland)
Trypan Blau	Sigma-Aldrich (USA)
Trypsin 0.05 %	PAN-Biotech (Deutschland)
Tween-20	Sigma-Aldrich (USA)

2.1.2 Geräte

Geräte	Hersteller (Land)
Absaugpumpe	Integra Biosciences (Deutschland)
Biologische Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific (USA)
CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific (USA)
DNA-Gel-Elektrophorese-System	Scie-Plas (UK)
Durchflusszytometer	BD Biosciences (USA)
Gel-Dokumentations-System	Bio-Rad Laboratories (USA)
Magnetrührer	IKA (Deutschland)
Mikroskop	Nikon (Japan)
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan (Schweiz)
Mikrowelle	LG (Südkorea)
Mikrozentrifuge	VWR International (USA)
Minizentrifuge	Neolab (Deutschland)
Pipetten	Eppendorf (Deutschland)
Pipettierhilfe	Integra Biosciences (Deutschland)
Quantitatives PCR-Gerät	Agilent Technologies (USA)
Rollenmischer	Phoenix Instrument (Deutschland)
Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (USA)
Stickstoffbehälter	Cryo-Tech (Deutschland)
Thermo-Inkubationsmischer	PeqLab (Deutschland)
Thermozykler	Biometra (Deutschland)
Tischzentrifuge	Hettich (Schweiz)
Vortex-Gerät	Scientific Industries (USA)
Wasserbad	Memmert (Deutschland)

Western-Blot-Kamerasystem	Intas Science Imaging (Deutschland)
Western-Blot-System	Bio-Rad Laboratories (USA)
Zählkammer	Marienfeld Superior (Deutschland)

2.1.3 Kits und gebrauchsfertige Reagenzien

Kits und gebrauchsfertige Reagenzien	Hersteller (Land)
Cell Proliferation ELISA (BrdU, colorimetric)	Roche Diagnostics (Schweiz)
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics (Schweiz)
GelRed	VWR International (USA)
Halt Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Fisher Scientific (USA)
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories (USA)
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories (USA)
miRNeasy Mini Kit	Qiagen (Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (USA)
Protein-Ladepuffer (Roti-Load)	Roth (Deutschland)
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific (USA)
RIPA Lyse- und Extraktionspuffer	Thermo Fisher Scientific (USA)
RNase AWAY	Thermo Fisher Scientific (USA)
RNase freie DNase	Qiagen (Deutschland)

2.1.4 Antikörper und Markerproteine

Antikörper und Markerproteine	Hersteller (Land)
(P-) CDK2	Cell Signaling Technology (USA)
(P-) RB	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Beta-Aktin	Abcam (UK)
Caspase-3	Cell Signaling Technology (USA)
CDK4	Cell Signaling Technology (USA)
CDK6	Cell Signaling Technology (USA)
DNA-Ladungsfärbstoff	Thermo Fisher Scientific (USA)

DNA-Leiter	New England Biolabs (USA)
HRP-gekoppelte Sekundärantikörper	Cell Signaling Technology (USA)
P21 Waf/Cip1	Cell Signaling Technology (USA)
P27 Kip1	Cell Signaling Technology (USA)
PageRuler, vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Fisher Scientific (USA)
PCNA	Santa Cruz Biotechnology (USA)
Vinculin	Abcam (UK)
Zyklin D3	Cell Signaling Technology (USA)

2.1.5 Primer

Gen (Human)	Vorwärtsprimersequenz: 5' – 3'	Rückwärtsprimersequenz: 5' – 3'
GAPDH	TTTTGCGTCGCCAGCCGAG	TGACCAGGCGCCCAATACGA
CCNA2	ACCCAGAAAACCATTGGTCC	CATTTAACCTCCATTTCCTAAGGT
CDC2	AATAAGCCGGGATCTACCATAC	CATGGCTACCACTTGACCTG

Tabelle 4: Basen-Paar-Sequenz der genutzten Oligonukleotid-Primer.

Alle Oligonukleotid-Primer wurden über die Firma Metabion (Deutschland) bezogen.

2.1.6 Zellkultur

2.1.6.1 Zelllinien und humane Patientenproben

Zelllinie, humane Patientenproben	Hersteller (Land)
Humane PASCs	Lonza (Schweiz)
IPAH-PASC und humane Lungenhomogenisate	Biobank des Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC)

2.1.6.2 Medium und Zusätze

Medium, Zusätze	Hersteller (Land)
Basalmedium für PASCs	Lonza (Schweiz)
Wachstumsfaktorzusätze für PASCs	Lonza (Schweiz)

2.1.7 Software

Software	Hersteller (Land)
ChemoStar Imager Software	Intas Science Imaging Instruments (Deutschland)
FACSDiva Software	BD Biosciences (USA)
GraphPad Prism	Graphpad Software (USA)
I-Control Software	Tecan (Schweiz)
Magellan Software	Tecan (Schweiz)
MxPro QPCR Software	Agilent Technologies (USA)
NanoDrop Software	Thermo Fisher Scientific (USA)

2.1.8 Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgestände	Hersteller
BD Falcons, 15 ml	BD Biosciences (USA)
BD Falcons, 50 ml	BD Biosciences (USA)
Filterpapier	VWR International (USA)
Filterspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab (Deutschland)
Gelloader Pipettenspitzen, 200 µl	Sarstedt (Deutschland)
Magnetstäbchen	Roth (Deutschland)
Mikrotiterplatte mit 96 Kammern	Greiner Bio-One (Österreich)
Nitril Handschuhe	Ansell (Australien)
Nitrocellulose Transfer Membran	Pall Corporation (USA)
Pipettenspitze, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt (Deutschland)
Reagiergefäß, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt (Deutschland)
Röhrchen für Durchflusszytometer	Sarstedt (Deutschland)
Steril verpackte Einmalpipetten	Greiner Bio-One (Österreich)
Zellschale, 10 cm	Sarstedt (Deutschland)
Zellschaber	Sarstedt (Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 **Humane Lungenhomogenisate und Zelllinien**

Zur Durchführung der Versuche wurden Lungenhomogenisate und isolierte Zellen von Patienten aus der Biobank der Justus-Liebig-Universität („Giessen PNEUMObank“) mit positivem Ethikvotum von 2008/2012 (Aktenzeichen 10/16 und 179/12) genutzt (siehe Tabelle 5).

2.2.2 **Zellkultur**

Für die vorliegende Arbeit wurden überwiegend humane pulmonal-arterielle glatte Muskelzellen (PASMC, Produkt Code: CC-2581) von der Firma Lonza verwendet. Diese Zellen wurden vom Gewebe eines gesunden Spenders nach dessen vorigem Einverständnis isoliert. Gemäß der Herstellerfirma Lonza war der Spender zur Zeit der Entnahme 43 Jahre alt und männlich. PASMCs von IPAH-Patienten wurden von der Biobank des Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg (UGMLC) bereitgestellt. Die Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert und zu Beginn des Versuchs (siehe Abbildung 6) in Wachstumsmedium angezogen.

Zur Anzucht und Kultivierung wurde das Wachstumsmedium (GM) von Lonza genutzt, welches aus dem Basalmedium „Smooth muscle cell basal medium“ (BM) und den Zusätzen der „Smooth muscle cell growth medium-2 SingleQuotes“ besteht. Ein Zusatz für 500 ml Basalmedium beinhaltetete 25 ml Fetales Kälberserum (FKS oder auch englisch FBS für „fetal bovine serum“), 1 ml humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor-B (Human fibroblast growth factor B, hFGF-B), 0,5 ml Insulin, 0,5 ml Gentamicin-Amphotericin (GA-1000) und 0,5 ml humaner epidermaler Wachstumsfaktor (Human epidermal growth factor, hEGF). Gehalten wurden die Zellen in einem gewärmten 37°C-Inkubator mit befeuchteter und 5% CO₂ angereicherter Luft von Thermo Fisher Scientific mit der Bezeichnung „Heracell 150i“. Gearbeitet wurde unter der biologische Sicherheitswerkbank „Safe 2020“ ebenfalls von Thermo Fisher Scientific und mit der Absaugpumpe „Vacusafe“ von Integra.

Der experimentelle Aufbau wird in Abbildung 6 gezeigt: In der ersten Versuchswoche wurden die aufgetauten Zellen angereichert, um in der zweiten Woche die Versuchsreihen starten zu können. Dabei wurden die Zellen nach dem Auftauen auf Rundschalen (Durchmesser 10 cm) mit jeweils 10 ml Wachstumsmedium ausgesät. Bei ausreichender

Konfluenz wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, mittels 1 ml Trypsin von der Platte gelöst und jeweils auf drei weitere Schalen in frischem Wachstumsmedium aufgeteilt. Dieser Schritt wurde 2-3 Mal in der Woche wiederholt, sodass die entscheidenden Experimente in der 4.-6. Passage durchgeführt werden konnten.

In der zweiten Woche wurden die Zellen aller Platten nach oben beschriebenen Verfahren abgelöst und kumulativ in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Nach Abzentrifugieren mittels Tischzentrifuge unter Kühlung (5°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit frischem Wachstumsmedium suspendiert. Die Zellzahl pro ml wurde mittels Mikroskops und Neubauer-Zählkammer ermittelt, sodass eine standardisierte Zellzahl in jede Zellschale ($9,81 \times 10^5$ Zellen auf 10 ml Medium) und in jede Kammer der Mikrotiterplatte (4×10^3 Zellen auf 100 µl) ausgesät werden konnte. Dabei wurden alle Zellen anfangs für 6 h in Wachstumsmedium gehalten und danach eine Hungerphase mittels Kultivierung in Basalmedium für 18 h abgeschlossen, um den Zellzyklus der Zellen zu synchronisieren.

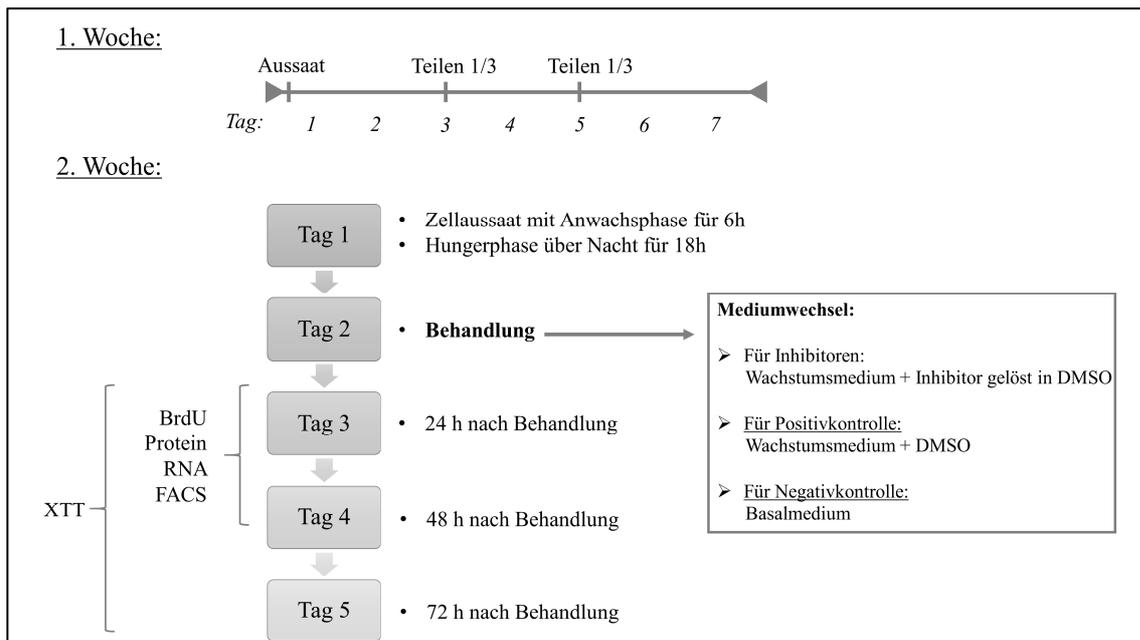


Abbildung 6: Schemaabbildung zum experimentellen Aufbau der Zellkulturversuche. In der ersten Woche wurden die Zellen in Zellschalen aufgetaut, in Wachstumsmedium kultiviert und bei Konfluenz ca. 2-3 Mal pro Woche auf neue Zellschalen mit frischem Wachstumsmedium aufgeteilt. Am ersten Tag der zweiten Woche wurden die Zellen geerntet und in standardisierter Zellzahl ausgesät. Es folgte eine Anwachsphase in Wachstumsmedium für 6 h und daraufhin eine Hungerphase unter Basalmedium für 18 h. Am zweiten Tag wurden diese Zellen behandelt, indem ein Mediumwechsel für alle Konditionen erfolgte. Die Inhibitoren wurden gelöst in DMSO mit Wachstumsmedium angewendet. Für die Positivkontrolle wurde Wachstumsmedium mit DMSO bzw. für die Negativkontrolle nur Basalmedium verwendet. An den darauffolgenden Tagen wurden die Zellen, je nach Versuchsaufbau, für Messungen des XTT- bzw. BrdU-Assays genutzt, oder Proben für Protein-, RNA- oder FACS-Analysen gewonnen.

Es folgte der Mediumwechsel entsprechend den gewünschten Konditionen (d.h. für Inhibitoren, Positiv- oder Negativkontrollen). Die Inhibitoren wurden in DMSO gelöst und dabei gemeinsam mit dem Wachstumsmedium appliziert. Die Analysen erfolgten 24 oder 48 h nach Mediumwechsel. Bilder wurden 24, 48 und 72 h nach der Behandlung mit dem Mikroskop „Eclipse TS100“ von der Firma Nikon aufgenommen. Alle anderen zellulären Analyse-Verfahren werden im nachfolgenden Abschnitt beschrieben.

2.2.3 Zellphysiologische Untersuchungen

2.2.3.1 Messung der Proliferation und Viabilität

Zur Messung der Proliferation wurden zwei unterschiedliche Nachweisverfahren genutzt, der XTT- und der BrdU-Test von der Firma Roche. Beide Versuche wurden analog ihrer Protokolle des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden die Zellen für jede Kondition in Volumen von 100 µl als Triplikat nach dem oben beschriebenen Verfahren in die Kavität einer 96-Kammer-Mikrotiterplatte pipettiert.

Für den XTT-Versuch wurden an den Zeitpunkten 24, 48 und 72 h nach Behandlungsstart jeweils 50 µl der XTT-Lösung in die jeweilige Kavität hinzugefügt und für 4 h bei 37°C inkubiert. XTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilid), das in metabolisch aktiven Zellen in ein orangefarbenes Formazanprodukt gespalten wird. Die Messung des Farbumschlages erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 – 500 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm.

Beim antikörperbasierten Nachweisverfahren (ELISA, englisch für Enzyme-linked Immunosorbent Assay) des BrdU-Tests wurden anstelle der 50 µl XTT-Lösung 10 µl der BrdU-Lösung hinzugefügt und für 24 h in einem Inkubator bei 37°C gehalten. BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridin) ist ein Thymidinanalogon, das bei der Synthese in die DNA inkorporiert wird. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen fixiert, mit einem Enzym-gekoppelten-Zweitantikörper bei Raumtemperatur inkubiert, mit PBS (300 µl pro Kammer) dreimal gewaschen und anschließend mit einer Substratlösung (100 µl pro Kammer) gefüllt. Die Messung der BrdU-Menge wurde kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von 370 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm bestimmt. Alle Messungen erfolgten mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät „Infinite 200 PRO“ von Tecan mit der zugehörigen Software „iControl“.

2.2.3.2 Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklus-Analyse wurde mithilfe der Methode der Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt, ähnlich wie bereits von anderen Autoren beschrieben⁵². Dabei kann PI an Nukleinsäuren binden, wobei seine Fluoreszenz proportional zum DNA-Gehalt der jeweiligen Zelle ist. Das erlaubt eine Zuordnung der Zellen zu den jeweiligen Phasen des Zellzykluses, die sich durch die Menge an synthetisierter DNA auszeichnen. Auch lässt sich eine mögliche Apoptose-Induktion durch das Vorhandensein fragmentierter DNA zuverlässig beobachten. Dazu wurde das Medium einer Zellschale abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und mittels Trypsins gelöst. Das Medium, PBS und die gelösten Zellen wurden in einem 15 ml Röhrchen vereint. Nach Zentrifugation bei 4°C wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen zweimal mit kalten (4°C) PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden 2 ml kalter 70%iger Ethanol (-20°C) hinzugefügt und für mindestens 24 h im Kühlschrank (4°C) gelagert. Im weiteren Verlauf wurden die Zellen wieder bei 4°C zentrifugiert, diesmal mit einem Natriumcitrat-Puffer (Konzentration 38 mM) gewaschen und ein weiteres Mal abzentrifugiert. Nach Abtragung des Überstandes wurden 300 µl der hypotonen PI-Lösung (PI 50 µg/ml, 5 µg/ml RNase A, 38 mM Natriumcitrat) den Zellen hinzugegeben und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung wurde im FACS Core Facility des Instituts für klinische Immunologie der Justus-Liebig-Universität unter der Leitung von Prof. Dr. Holger Hackstein und unter der Betreuung von Dr. Nelli Baal durchgeführt. Als Durchflusszytometer wurde das „FACSCANTO II Flow Cytometer“ von BD Biosciences und die dazugehörige Software „FACSDiva“ genutzt.

2.2.4 Molekularbiologische Untersuchungen

2.2.4.1 Proteinanalytik

2.2.4.1.1 Proteinisolierung

Für die Proteinanalyse mittels Western-Blot-Verfahren wurde das Medium der Zellschalen abgesaugt und die Zellen auf Eis mit PBS (5 ml) zweimal gewaschen. Die Zellen wurden mit 200 µl eines Lyse-Gemisches aus dem Lyse-Puffer „RIPA“, einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Thermo Fisher Scientific) und EDTA versehen und mittels Zellschaber von der Platte abgetragen. Das Lysat wurde daraufhin unter

zwischenzeitlichem Mischen 30 min auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Reagiergefäß überführt. Die Konzentration der Proteingehaltes wurden mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific, dem Mikrotiterplatten-Lesegerät „Infinite 200 PRO“ und der Software „Magellan“ von der Firma Tecan gemessen.

2.2.4.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Gemäß dem Verfahren der SDS-PAGE zur Analyse von Proteinen kommt das Detergent SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz, das die Eigenladung der Proteine überdeckt und für eine konstant negative Ladungsverteilung sorgt. Durch Hitze-Denaturierung und Abstoßungskräfte der negativen Ladungen entstehen so lineare Proteinstrukturen mit einheitlichen Masse-Ladungsverhältnissen, die nach Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer molekularen Größe [kDa, Kilodalton] in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt werden können. Nach Inkubation mit dem Proteingelladepuffer „Roti-Load“ von Roth und nach Denaturierung in einem Thermo-Inkubationsmischer von PeqLab wurden gleiche Mengen an Proteinlysaten (je 30 µg) zusammen mit dem Proteingrößenstandard „PageRuler“ von Thermo Fisher Scientific auf die Polyacrylamid-Gele aufgetragen und die Gelelektrophorese (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Der dabei genutzte Laufpuffer setzte sich auch 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS zusammen, die angelegte Spannung während der Elektrophorese betrug 100 Volt. Im Rahmen des sich anschließenden Verfahrens des Elektroblothing wurden die Proteine des Gels auf eine Nitrocellulose-Membran mit der Bezeichnung „BioTrace“ von Pall Corporation übertragen. Gel, Membran, Filterpapier wurden mit Transfer-Puffer (20 % Methanol, 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,01 % SDS) angefeuchtet und entsprechend den Vorgaben des Herstellers in dem Western-Blot-System eingerichtet. Der Transfer wurde bei 100 V je nach Größe des Zielproteins für ungefähr 60 min durchgeführt. Anschließend wurden die unbesetzten Proteinbindungsstellen der Membran 90 min lang schwenkend in 5%iger Milchpulverlösung geblockt. Die Membran wurde über Nacht mit dem ebenfalls in 5%iger Milchpulverlösung gelösten Primär-Antikörper bei 4°C auf einem Rollenmischer von Phoenix Instrument inkubiert. Bei den Antikörpern P-CDK2, P-RB und RB wurde statt Milchpulverlösung eine 5%ige BSA-Lösung genutzt. Danach wurde dreimal 10 min lang mit Tris-Base-gepufferter Salzlösung (TBS-T bestehend aus 20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) gewaschen, bevor der in 5%iger Milchpulverlösung

enzymgekoppelte Zweitantikörper zugegeben wurde. Bei Raumtemperatur erfolgte eine Inkubation über 2 h mit darauffolgendem erneutem dreimaligem Waschen für 10 min mit TBS-T. Anschließend wurde die Membran für 5 min mit einem Chemilumineszenz-Substrat inkubiert; dabei kam entweder das „SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate“ von Thermo Fisher Scientific oder „Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent“ von GE Healthcare zum Einsatz. Die Chemolumineszenz wurde mittels des „ChemoCam Imager“ von Intas und dessen Software „ChemoStar Imager“ gemessen und dokumentiert.

2.2.4.2 Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.4.2.1 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurde analog zur Proteinisolation das Medium der Zellschalen abgesaugt, die Zellen zweimal auf Eis mit PBS gewaschen und 700 µl des Lyse Puffers „QIAzol Lysis Reagent“ des „miRNeasy Mini Kit“ von Qiagen auf die Zellen gegeben. Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat zur RNA-Isolation mittels der Phenol-Chloroform-Extraktions-Methode. Die Methode nutzt die unterschiedlichen Löslichkeiten der Lysat-Bestandteile. Dazu wurde das Lysat-Gemisch homogenisiert und bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 140 µl Chloroforms mit erneuter Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Lysate bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde daraufhin in ein neues Reagiergefäß überführt, während die untere proteinreiche Phase verworfen wurde. Das Lysat wurde zur Fällung mit Ethanol versetzt und auf eine Filtersäule mit einer Siliciumdioxid-Membran pipettiert. Die RNA bindet hierbei an die Membran der Säule, sodass in nachfolgenden Waschsritten die verbleibenden Zellbestandteile herausgewaschen wurden. Zusätzlich wurde die Membran mit DNase zum Verdau der genomischen DNA versetzt und für 15 min inkubiert, um die Kontamination der RNA mit DNA zu unterbinden. Nach weiteren Waschsritten wurde die RNA mit 40 µl RNase-freien-Wasser von der Membran der Filtersäule abgelöst und dessen Konzentration und Integrität mit Hilfe des Spektralphotometer „NanoDrop 2000c“ und dessen dazugehörige Software von Thermo Fisher Scientific bestimmt. Zur Bestimmung der Integrität wurde der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm, sowie der Quotient der Absorption bei 260 nm und 230 nm angewendet. Beide Werte sollten in dem Bereich 1,8 – 2,2 liegen. Stark reduzierte Werte unter 1,8 sprachen für eine

Kontamination des RNA-Lysates mit sonstigen Zellbestandteilen und Proben mit entsprechend niedrigen Werten wurden erneut angefertigt.

2.2.4.2.2 Herstellung der cDNA

Für die Genexpressionsanalyse anhand der zellulären mRNA-Menge muss diese zuerst in DNA umgeschrieben werden, damit letztere als Vorlage für eine PCR-basierende, quantitative Analyse verwendet werden kann. Zur Herstellung der komplementären DNA (im Englischen: Complementary DNA; cDNA) wurde ein Reaktionsgemisch von insgesamt 20 µl aus 8 µl RNA (50 ng/µl; entspricht dann insgesamt 400 ng), 7 µl Nuklease-freien Wasser, 4 µl des Reaktionsansatzes „5x iScript reaktionsmix“ und 1 µl der reversen Transkriptase (RT) „iScript reverse transkriptase“ von Bio-Rad Laboratories angesetzt. Im Falle der –RT-Kontrolle wurde die reverse Transkriptase durch 1 µl Wasser ersetzt. Das Gemisch wurde in einem Thermozykler von Biometra für 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C inkubiert und anschließend runtergekühlt auf 4°C. Vor dem weiteren Verfahren wurde der cDNA (20 µl) noch 80 µl RNase/DNase-freies Wasser zum Zweck der Verdünnung zugesetzt.

2.2.4.2.3 Durchführung der Real-time PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (im Englischen: Real-time polymerase-chain-reaction; RT-PCR) wird das herkömmliche Verfahren der PCR zur Mengenbestimmung der gewonnen DNA genutzt. Dabei kommt ein hochsensitiv an die DNA bindender Fluoreszenzfarbstoff zum Einsatz, der sich in die Furche der doppelsträngigen DNA anlagert. Die resultierende Fluoreszenz lässt sich quantitativ während der Denaturierungsphase eines PCR-Zyklus in Echtzeit messen und die Intensität korreliert mit der entstandenen Menge an PCR-Produkt. Die Messungen erfolgen dabei nur in der anfänglichen, exponentiellen Phase der PCR, da hier von optimalen Reaktionsbedingungen des Vervielfältigungsprozesses ausgegangen werden kann. Nach Überschreiten eines definierten Schwellenwertes, an dem die spezifische Fluoreszenz sich deutlich vom Hintergrund unterscheidet, wird die Anzahl der Zyklen, die durchlaufen werden mussten, um diesen Schwellenwert zu erreichen, dokumentiert. Dieser Wert wird als CT-Wert (englisch für „threshold cycle“) bezeichnet, der in Relation eines Referenzgens (im Englischen „house keeping gene“, hier Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; GAPDH) die relative Expression des untersuchten Gens darstellt. Zur Durchführung wurde in einer 96-Kammern-Platte pro Kavität ein Reaktionsgemisch mit einem Endvolumen von 20 µl aus dem Reagenz „iTaQ Universal

SYBR Green Supermix“ von Biorad Laboratories, Vorwärts- und Rückwärts-Primern von Metabion (siehe Tabelle 4), verdünnter cDNA und Wasser angesetzt. Zur Messung wurde das Gerät „Mx3000P qPCR System“ mit der dazugehörigen Software von Agilent Technologies mit folgenden Thermozyklen genutzt: 10 min bei 95°C; 40 Zyklen mit jeweils 95°C für 10 sec, 58°C für 30 sec und 72°C für 10 sec; dann 1 min bei 95°C mit abschließenden Anstieg von 58°C bis 95°C für jeweils 30 sec in 2°C-Intervallen. Alle Durchläufe wurden mit einer –RT-Kontrolle (ohne reverse Transkriptase) exemplarisch für jedes untersuchte Gen und einem Reaktionsmix ohne cDNA (NTC, im Englischen für „No template control“) durchgeführt, um etwaige Kontaminationen zu identifizieren. Zur statistischen Auswertung wurde zuerst die Differenz zwischen den CT-Werten des untersuchten Genes und des Referenzgenes GAPDH gebildet, was den Δ CT-Wert bildet. Der Quotient zwischen dem Δ CT-Wert einer jeden Behandlung und dem Δ CT-Wert einer definierten gesunden Kontrolle ergab im Anschluss den $\Delta\Delta$ CT-Wert. Der relative Expressionsunterschied zur Kontrolle wurde mithilfe der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet (Livak-Methode).

2.2.4.2.4 Spezifität der Primer-Paare

Zur Qualitätskontrolle hinsichtlich der Amplifizierung des korrekten DNA-Bereiches und ihrer Spezifität wurden die Primer-Paare mittels Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft (siehe Abbildung 7). Dazu wurden die PCR-Produkte (10 μ l) zusammen mit einem DNA-Ladungsfarbstoff von Thermo Fisher Scientific (4 μ l) auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Zur Darstellung von Referenzmolekülgrößen kam eine DNA-Leiter mit einem Darstellungsbereich von 100-1517 Basenpaare von New England Biolabs zur Anwendung (10 μ l). Das Agarose-Gel enthielt den Fluoreszenzfarbstoff „GelRed“ von VWR International zum Färben und späteren Detektieren der DNA. Die negativ geladene DNA wurde nach Anlegen einer Spannung von 130 Volt gemäß ihrer Fragmentgröße aufgetrennt und mittels des Detektiersystems „Gel Doc XR+ System“ von Biorad Laboratories und der dazugehörigen Software visualisiert. Es wurden Primer-Paare für die vorliegenden Resultate verwendet, die nur zur Vervielfältigung eines einzelnen Fragments mit der erwarteten Größe führten.

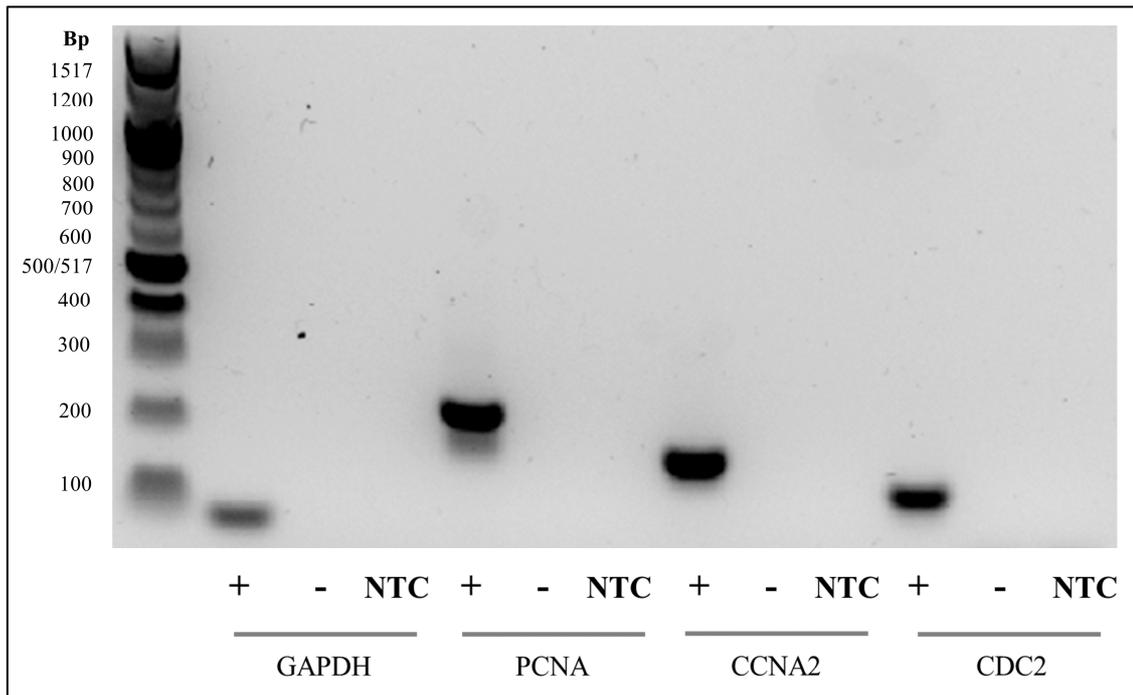


Abbildung 7: DNA-Gel-Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primer. Zur Spezifitätsbestimmung wurden die PCR-Produkte der Primer-Paare für die Gene GAPDH, PCNA, CCNA2 und CDC2 durch DNA-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels Fluoreszenz sichtbar gemacht (+: +RT). Für jedes Gen wurden Negativkontrollen durchgeführt, jeweils PCR-Durchläufe ohne reverse Transkriptase (-: -RT) oder ohne cDNA-Vorlage (NTC-Kontrolle). In der Y-Achse ist die Leiter des DNA-Markers in Basenpaaren (Bp) angegeben.

2.2.5 Statistische Auswertung und graphische Darstellung

Alle Zellkulturversuche wurden in drei unabhängigen Versuchsdurchläufen wiederholt. Die Zellkulturassays XTT und BrdU wurden dabei zusätzlich in jedem Versuch als Triplikate angefertigt. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels der Software „GraphPad Prism“ von Graphpad Software (Version 5). Ergänzend kamen für die Erstellung der Abbildungen und Tabellen die Software „Microsoft Excel“ und „Microsoft Powerpoint“ von Microsoft zu Anwendung.

3 Ergebnisse

3.1 Überblick

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Abschnitte (siehe Abbildung 8):

1. Im ersten Teil sollte in einem Screening die Frage geklärt werden, ob in Lungenhomogenisaten von Patienten mit PAH im Vergleich zu Lungenhomogenisaten von gesunden Donoren, Hinweise auf einen dysregulierten Zellzyklus zu finden sind.
2. Im zweiten Teil sollte anhand unterschiedlicher Zellkulturversuchen das antiproliferative Potential, der Wirkmechanismus und toxische Nebenwirkungen der synthetischen CDKIs Palbociclib und Dinaciclib in humanen pulmonalen glatten Muskelzellen (PASMCs) eruiert werden.

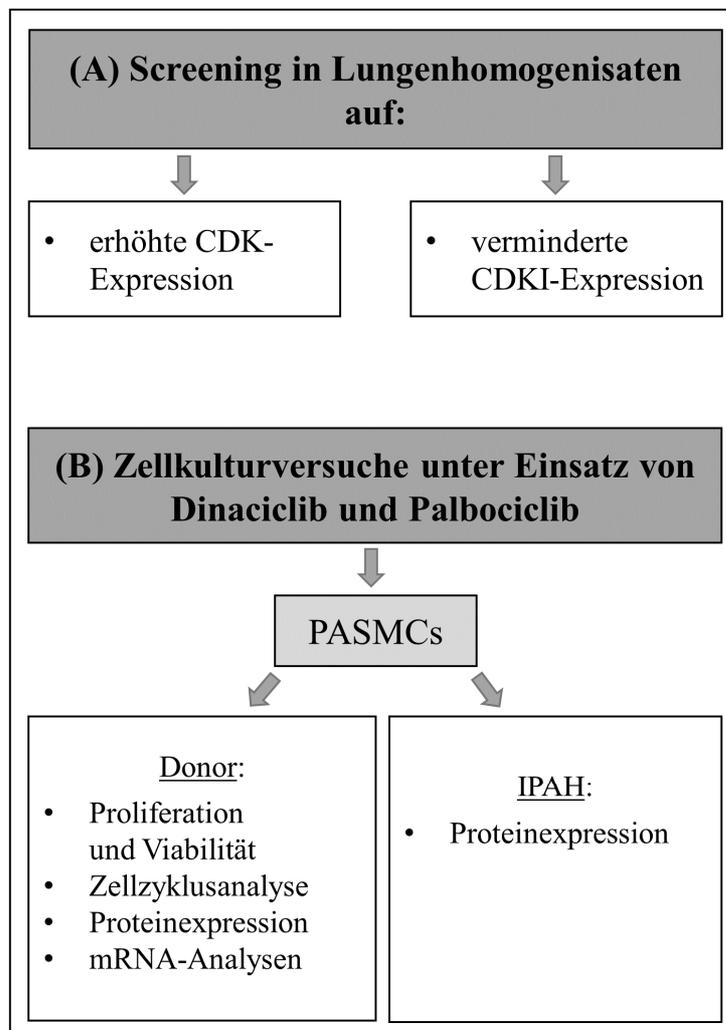


Abbildung 8: Darstellung der Versuchsabschnitte der Arbeit mittels Flussdiagramm.

3.2 Screening in Lungenhomogenisaten

3.2.1 Hintergrund

Wie eingangs beschrieben, sind wichtige zelluläre Akteure der Zellteilung u.a. die CDKs 1, 2, 4 und 6, die mit ihren korrespondierenden Zyklinen aktive Proteinkinasekomplexe bilden. Diese spielen für den Progress der Zellteilung eine entscheidende Rolle und werden durch zelleigene CDKIs, wie p27, in ihrer Aktivität reguliert. Dysregulierte Expression und/oder Aktivität dieser CDK/Zyclin-Komplexe können bei Tumoren zu erhöhten Proliferationsraten, wie z.B. beim Multiplen Myelom, führen^{33,34}. Auch in der PAH ist bekannt, dass Veränderungen in der Expression dieser Zellzyklusproteine Auswirkungen auf die Proliferation haben können^{26,53,54}. Ziel der folgenden Versuche sollte sein, zu eruieren, inwiefern eine permanente abnormale Expression von CDKs, CDKIs oder Zyklinen in Patienten mit PAH nachweisbar ist. Dafür wurde die Proteinexpression in Lungenhomogenisaten gesunder Donoren mit denen von erkrankten PAH-Patienten mittels Western-Blot-Analyse verglichen.

3.2.2 Resultate der Screenings

3.2.2.1 Analyse des neueren Datensatzes auf CDK4 und CDK6

Die Expressionen von CDK4 und CDK6 zeigen hohe interindividuelle Variationen.

Die Lungenhomogenisate der Patienten wurden je nach Erhebungszeitpunkt in zwei Datensätzen unterteilt (siehe Tabelle 5). Dabei ist Datensatz Nr. 1 als erstes erhoben worden, während Datensatz Nr. 2 später generiert wurde. Dies spiegelt sich auch in der unterschiedlichen Klassifikation der PAH wider. Während im älteren Datensatz die Proben in PPH (Primäre Pulmonale Hypertonie; eine ältere Einteilungsform der PH, zu der die PAH zählte) oder PAH/PH untergliedert werden, wurde im neuere Datensatz nur noch die Klassifikation IPAH genutzt. Die Proben der Donoren wurden nicht weiter spezifiziert. Die Proben mit der Nummer 2 und 32 konnten aufgrund ihrer geringen Proteinkonzentration nicht verwertet werden.

Im ersten Durchlauf wurden die Proben des neueren Datensatzes (Datensatz Nr. 2), aufgrund ihrer Homogenität in ihrer Klassifikation, hinsichtlich ihrer Proteinexpression von CDK4 und CDK6 untersucht (siehe Abbildung 9).

Ergebnisse

Datensatz	Proben-Nr.	Bezeichnung	Pat.-Nr.	Proben-Nr.	Bezeichnung	Pat.-Nr.
1	11	PPH	37/7	1	Donor	58
1	12	PPH	56	2	Donor	L101
1	13	PPH	G4	3	Donor	L76
1	14	PPH	111	7	Donor	58
1	4	PAH/PH	74	8	Donor	38
1	5	PAH/PH	78	9	Donor	198
1	6	PAH/PH	329	10	Donor	200
2	25	IPAH	231	15	Donor	471D
2	26	IPAH	253	16	Donor	22
2	27	IPAH	310	17	Donor	449D
2	28	IPAH	314	18	Donor	457D
2	29	IPAH	401	19	Donor	419D
2	30	IPAH	394	20	Donor	423G
2	31	IPAH	447	21	Donor	411a
2	32	IPAH	449	22	Donor	409sp
2	33	IPAH	453	23	Donor	198

Tabelle 5: Patientenproben der Lungenhomogenisate mit Nummerierung.

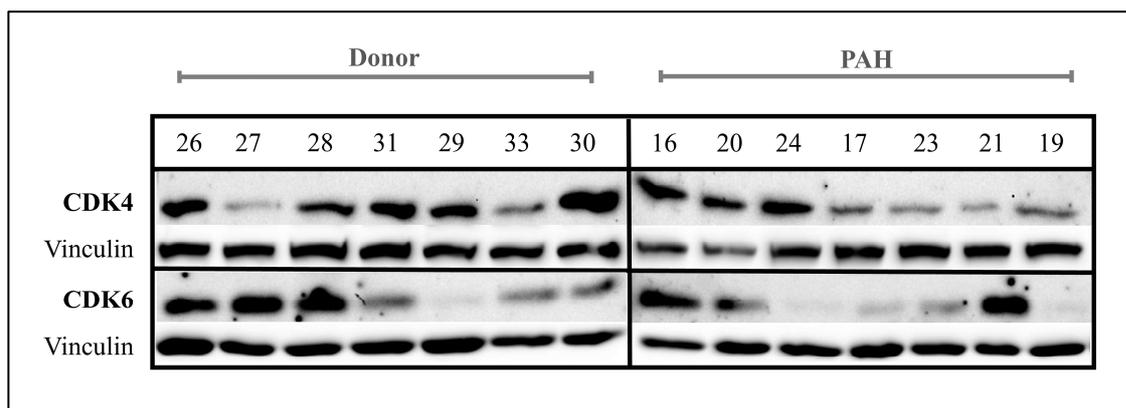


Abbildung 9: Analyse des Datensatzes Nr. 2 auf CDK4 und CDK6 im Vergleich von Donor zur PAH. In der jeweils oberen Reihe ist die Proteinanalyse von CDK 4 bzw. CDK 6 in Lungenhomogenisaten mittels Western-Blot-Technik dargestellt. Die Gruppen Donor und PAH sind für jedes Protein auf einem gemeinsamen Blot abgebildet. Als Ladekontrolle, zu sehen in der jeweils unteren Reihe, diente Vinculin.

Die Analyse zeigte bei den Donoren für CDK4 ein ausgeprägtes Signal in fünf von sieben Proben, während die zwei verbleibenden Proben (Proben-Nr. 27 und 33) vergleichsweise schwach zur Darstellung kamen. Demgegenüber steht ein relatives konstantes Signal bei den Patienten mit PAH, wobei Nr. 16, 20 und 24 ein stärkeres Signal zeigten als die übrigen Proben. Für CDK 6 zeigte sich bei den Donoren drei Proben (Nr. 26, 27, 28) mit starkem Signal, drei weitere mit schwachem Signal (Nr. 31, 33, 30) und eine Probe mit kaum Signal (Nr. 29). Bei den Erkrankten fanden sich in zwei Proben eine relative starke Proteinexpression (Nr. 16, 21), sowie ein mittelstarkes Signal (Nr. 20) und in vier Proben kaum bis kein Signal (Nr. 24, 17, 23, 1). Für beide Proteinexpressionen zeigte sich somit eine ausgeprägte Heterogenität innerhalb der jeweiligen Vergleichsgruppe. Dies erschwerte eine klare Aussage zur Überexpression von CDK4 bzw. CDK6 bei PAH im Vergleich zu den Donoren in diesem Versuchsaufbau.

3.2.2.2 Analyse aller Proben zur Erstellung einer repräsentativen Auswahl

Um eine Aussagefähigkeit bei diesen interindividuellen Unterschieden zu gewährleisten, wurden alle Proben jeweils innerhalb ihrer Vergleichsgruppe auf die Expression von CDK4 und CDK6 hin untersucht. Ziel war es, die einzelnen Proben in Gruppen unterschiedlicher Signalstärke zu untergliedern, um jeweils für die Vergleichsgruppe „Donor“ und „PAH“ eine repräsentative Auswahl zu generieren. Die Gegenüberstellung auf einem gemeinsamen Western Blot dieser repräsentativen Auswahl der Vergleichsgruppen würde daraufhin eine stärkere Aussagekraft ermöglichen. Dazu wurden alle Proben der jeweiligen Vergleichsgruppe für jedes Protein auf zwei einzelnen Western-Blots analysiert (siehe Abbildung 10). Um eine Vergleichbarkeit der Signalintensität dieser einzelnen Western-Blots zu erreichen, wurde die Probe 1 auf jedem Western-Blot als Referenz gewählt. Entsprechend der Signalstufe wurden die Proben in drei Gruppen (schwach, mittelstark, stark) rein visuell grob untergliedert und, gemäß ihrer Häufigkeit in der jeweiligen Gruppe, eine repräsentative Auswahl getroffen (siehe Tabelle 6).

Ergebnisse

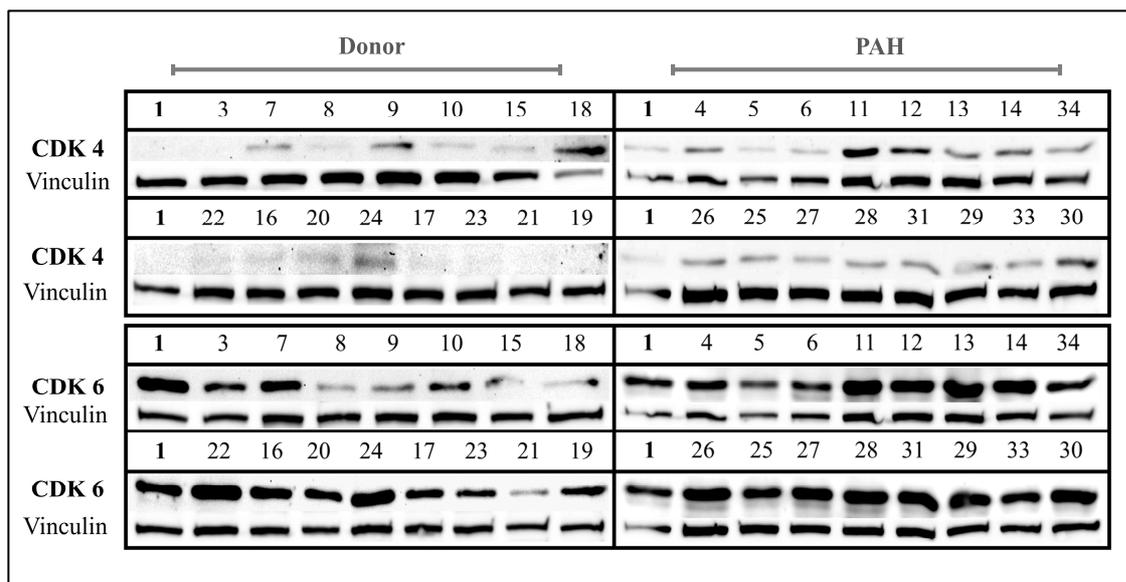


Abbildung 10: Proteinanalyse aller Proben auf CDK4 und CDK6. Die jeweils obere Reihe der Western-Blots zeigt die Proteinanalyse von CDK4 bzw. CDK6 in Lungenhomogenisaten mit Vinculin als Ladungskontrolle in der jeweils unteren Reihe. Es wurden alle Proben von Donoren und Patienten mit PAH in jeweils zwei einzelnen Western-Blots analysiert. Die Probe 1 wurde in allen Western-Blots als Referenz genutzt.

Signal	Donor			PAH		
	Schwach	Mittelstark	Stark	Schwach	Mittelstark	Stark
CDK4	1, 3, 21, 19, 23	8, 10, 15, 22, 16, 20, 17	7, 9, 18, 24	5, 6	4, 25, 27-29, 31, 33	11 – 14, 26, 34, 30
Summe	5	7	4	2	7	7
Verteilung	2	3	2	1	3	3
Auswahl	21, 3	10, 17, 8	24, 7	5	4, 25, 28	14, 30, 11
CDK6	8, 15, 18, 21, 9	10, 17, 23, 19,	1, 7, 22, 16, 20, 24, 3	5, 6,	4, 34	11-14, 25- 31, 33
Summe	5	4	7	2	2	12
Verteilung	2	2	3	1	1	5
Auswahl	21, 8	17, 10,	24, 7, 3	5	4	14, 30, 11, 25, 28

Tabelle 6: Klassifizierung der Western-Blot-Proben. Die Proben wurden anhand ihrer Signalintensität rein visuell in drei Gruppen untergliedert (Schwach, Mittelstark, Stark) und gemäß ihrer Häufigkeit repräsentativ für ein Auftragschema zum Gesamtvergleich ausgewählt.

3.2.2.3 Vergleich der repräsentativen Auswahl

Die Expression von CDK4 und CDK6 und weiterer Zellzyklusproteine, bis auf p27, zeigen im Vergleich von Donor zu PAH keine signifikante Veränderungen.

Zum repräsentativen Vergleich von CDK4 und CDK 6 wurde die Auswahl aus Abbildung 10 bzw. Tabelle 6 genutzt und auf einem gemeinsamen Western-Blot für Donor und PAH aufgetragen (siehe Abbildung 11). Diese Auswahl wurden auch für die Bestimmung weiterer Zellzyklusproteine verwendet: Für die Auswahl von CDK4 wurde zusätzlich die Expression von CDK2 und p27 gemessen. Die Expression von Zyklin D3 wurde weiterhin in der Auswahl für CDK6 bestimmt.

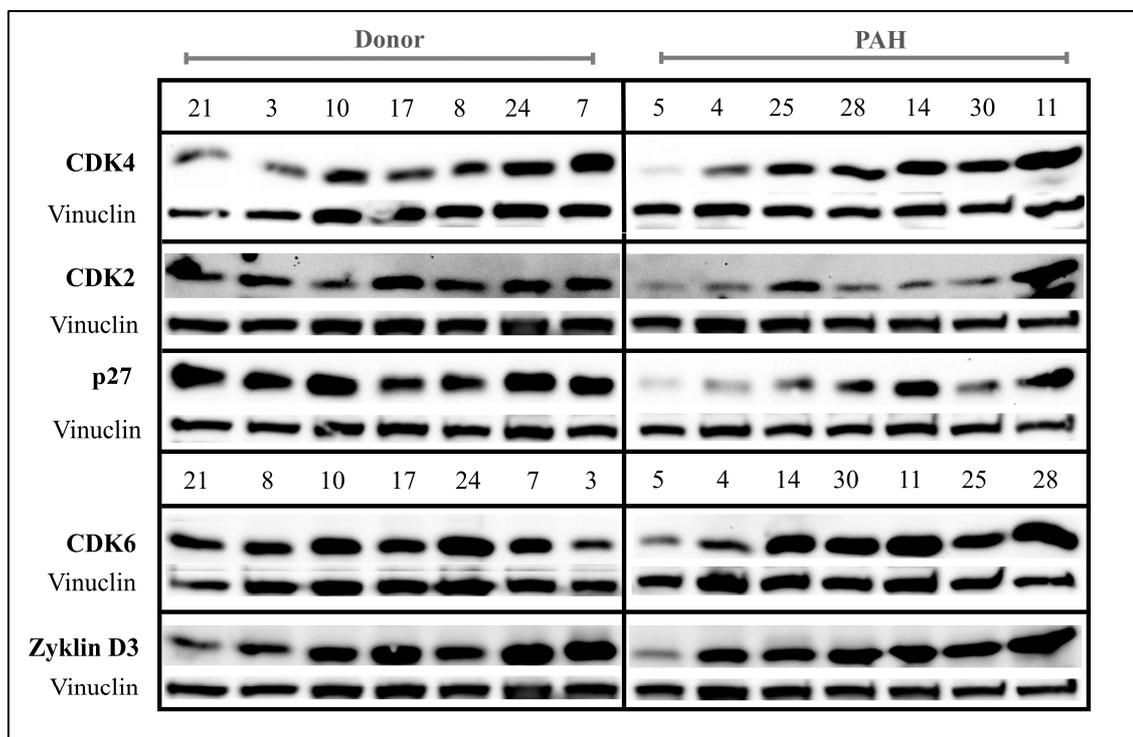


Abbildung 11: Vergleich der repräsentativen Auswahl für CDK 4 und CDK6 von Donor zu PAH mit weiterer Analyse von CDK2, p27 und Zyklin D3. In der jeweils oberen Reihe ist die Proteinanalyse von CDK4, CDK2, p27, CDK6 und Zyklin D3 in Lungenhomogenisaten mittels Western-Blot-Technik dargestellt. Die Gruppen Donor und PAH sind auf einem gemeinsamen Blot abgebildet. Als Ladekontrolle wurde in der jeweils unteren Reihe Vinculin genutzt.

Die repräsentativen Proben zeigten für beide CDKs ein vergleichbares Expressionsmuster mit interindividuellen Schwankungen, ohne eine klare Tendenz der Über- oder Unterexpression zur Vergleichsgruppe erkennen zu lassen. Gleiches zeichnete sich auch für CDK2 ab, bei ebenfalls prominenter Expression in beiden Vergleichsgruppen. Für p27 zeigte sich ein generell vermindertes Signal in der Krankheitsgruppe. Während alle

Proben der Donoren ein deutliches Signal zeigten, waren in vier PAH-Proben (Proben-Nr. 5, 4, 25, 30) kaum oder keine Expression nachweisbar. Für Zyklin D3 zeigte sich eine vergleichbare Tendenz zu CDK4 und CDK6, auch hier ist ein starkes Signal in beiden Krankheitsgruppen nachweisbar.

3.3 Zellkulturversuche mit Dinaciclib und Palbociclib

3.3.1 Hintergrund

Wie bereits angesprochen konnten die CDK-Inhibitoren Dinaciclib (CDK 1, 2, 5, 9) und Palbociclib (CDK 4, 6) durch andere Arbeitsgruppen bereits in vitro, als auch am Tiermodell und in klinischen Studien sicher und erfolgreich eingesetzt werden, was im Falle von Palbociclib bis zur Zulassung als medikamentöse Therapie des metastasierten Brustkrebs führte^{36,39,55}. Ziel des zweiten Abschnittes der Arbeit war die Testung dieser Inhibitoren in Zellkulturversuchen an humanen PSMCs, um zu evaluieren, ob die Inhibitoren auch hier vergleichbar sicher und effektiv eingesetzt werden können. Dazu wurden nach lichtmikroskopischer Dokumentation, Zellkulturverfahren zur Quantifizierung des antiproliferativen Effektes genutzt und mittels Zellzyklus-Analyse, Protein- und RNA-Analysen der Wirkmechanismus der Inhibitoren auf molekularer Ebene nachvollzogen.

3.3.2 Lichtmikroskopische Dokumentation von behandelten Zellen

PASMCs zeigen unter Dinaciclib, nicht aber unter Palbociclib, lichtmikroskopische sichtbar verminderte Proliferation.

Um das antiproliferative Potential der Inhibitoren zu evaluieren, sollte eine optimale therapeutische Dosis und ein Zeitfenster für die folgenden Zellkulturversuche ermittelt werden. Dafür wurden die Zellen zuerst in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt und das Zellwachstum wurde durch Fotografieren der Zellen 24, 48 und 72 h nach Behandlung dokumentiert (siehe Abbildung 12).

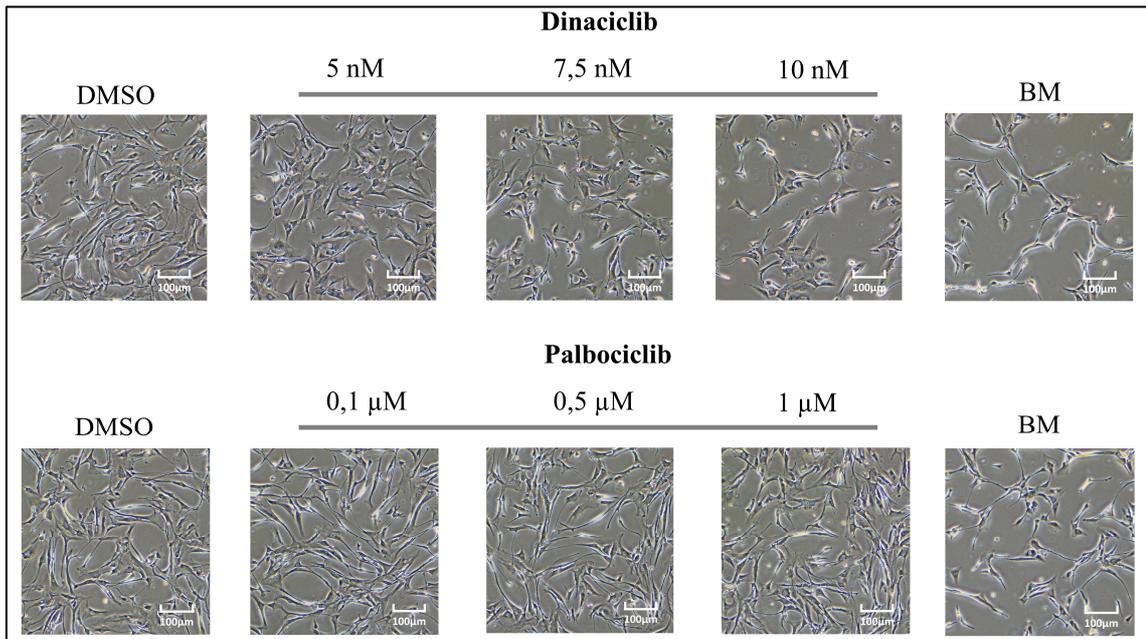


Abbildung 12: Histologische Veränderungen von PSMCs 24 h nach Behandlung. Aufnahmen von PSMCs 24 h nach Behandlung mit Dinaciclib in 5 nM, 7,5 nM und 10 nM bzw. mit Palbociclib in 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM. Die Kondition DMSO wurde mit Wachstumsmedium als Positivkontrolle, die Kondition Basalmedium (BM) als Negativkontrolle genutzt. Der angegebene Maßstab beträgt 100 µm. Es handelt sich um eine repräsentative Auswahl eines Versuchsdurchgangs aus $n = 3$ Versuchsreihen.

Für Dinaciclib zeigte sich dabei bereits nach 24 h eine lichtmikroskopisch sichtbare Reduktion in der Zellpopulation ab 5 nM, sowie ein ausgeprägter Effekt bei 10 nM. Daraus ergaben sich für die folgenden Versuche die genutzten Konzentrationen für Dinaciclib von 5 nM, 7,5 nM und 10 nM. Für Palbociclib zeigte sich histologisch keine eindeutige sichtbare Reduktion in der Zellpopulation innerhalb des getesteten Zeitfensters. Gemäß der Herstellerinformationen von Pfizer wurde die maximal empfohlene Konzentration von 1 µM als Höchstkonzentration festgelegt und entsprechende Abstufungen über 0,5 µM bis 0,1 µM genutzt.

3.3.3 Quantitative Messung der Proliferation

Dinaciclib und Palbociclib wirken in PSMCs dosisabhängig antiproliferativ.

Zur Quantifizierung der Wirkung von Dinaciclib und Palbociclib auf das Proliferationsverhalten der PSMCs, wurden zwei hochempfindliche Nachweisverfahren genutzt. Der XTT-Test bestimmt zelluläre Proliferation, Zellviabilität und Zytotoxizität, da die Reduktion des zugegebenen gelben Tetrazoliumsalzes (XTT) in ein

orangenfarbenes, detektierbares Formazanprodukt nur in lebenden, metabolisch aktiven Zellen stattfindet.

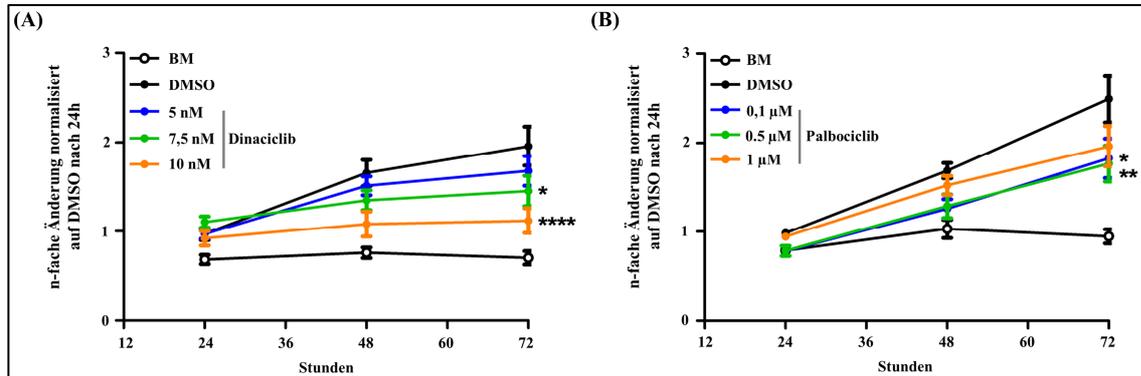


Abbildung 13: Messung der metabolischen Aktivität mittels XTT-Tests. Die XTT-Messungen von Dinaciclib (A) und Palbociclib (B) 24 h, 48 h und 72 h nach Behandlung. Die Absorptionenwerte der relativen Absorption [A492 nm - A690 nm] wurden auf den 24 h-Wert der DMSO-Positivkontrolle normiert und als dessen n-fache Änderung in der y-Achse angeben. Die Kondition Basalmedium (BM) diente als Negativkontrolle. Daten aus drei unabhängigen Versuchsdurchläufen, die jeweils in Triplikaten angefertigt wurden, sind hier als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (im englischen „two-way ANOVA“, wobei ANOVA für „analysis of variance“ steht) mit dem Bonferroni - Test als Post-Test genutzt: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. P – Werte sind hier nur für den 72 h-Wert angegeben und im Bezug zur Positivkontrolle DMSO.

Wie bereits aus den histologischen Aufnahmen antizipiert, führt der Einsatz von Dinaciclib nach 72 h zu einer signifikanten Abnahme an metabolisch aktiven Zellen in den Konzentrationen 7,5 nM und 10 nM im Vergleich zur DMSO-Positivkontrolle (siehe Abbildung 13). Für Palbociclib zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellpopulation bei 0,1 μ M und 0,5 μ M. In allen Konditionen der Inhibitoren ist generell eine Zunahme der metabolischen Aktivität über den gesamten Verlauf zu sehen und somit ein allgemeines Wachstum der Zellpopulation, sodass sich hieraus keine Anzeichen einer Zytotoxizität ergaben. Um diese initialen Ergebnisse zu bestätigen und um Limitationen des Testes zu überwinden, wie z.B. falsch positive Werte im Zuge von vermehrter metabolischer Aktivität bei gleichbleibender Zellzahl, wurde ein weiterer Test durchgeführt (siehe Abbildung 14). Der BrdU-Test (ELISA) weist immunchemisch die Inkorporation des markierten Pyrimidin-Analogen Bromdesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese nach, und lässt somit Rückschlüsse auf den Anteil proliferierender Zellen zu. Im Gegensatz zum XTT-Assay, der die Proliferation nur indirekt über die

metabolische Aktivität bestimmt, misst der BrdU-Test anhand der Menge an neu synthetisierter DNA von sich teilenden Zellen, direkt die Häufigkeit der Zellteilung.

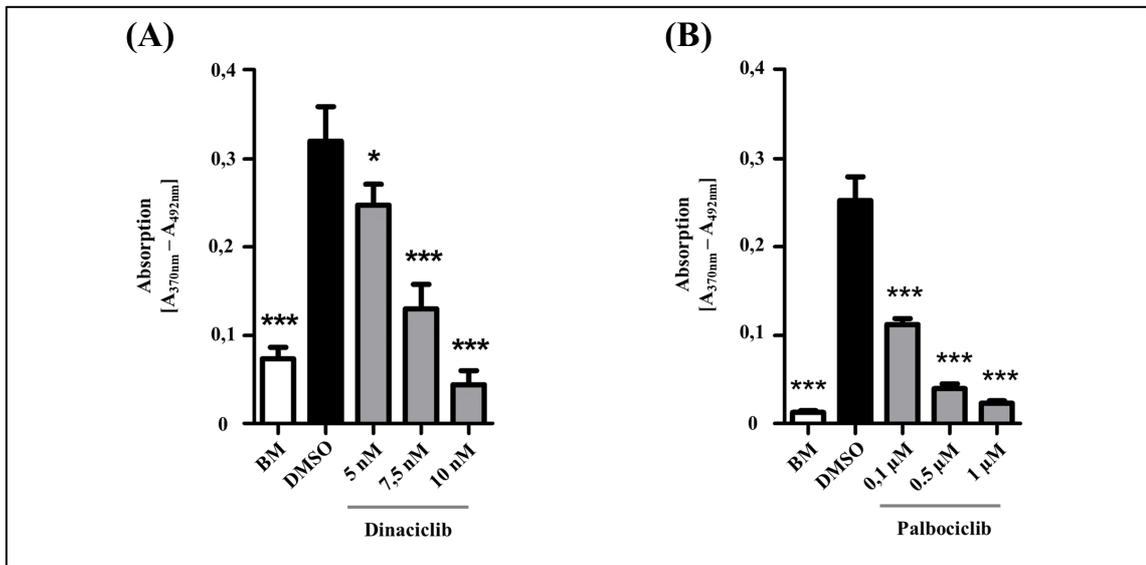


Abbildung 14: Messung der DNA-Synthese mittels BrdU-Test 24 h nach Behandlung. Die BrdU-Messungen von Dinaciclib (A) und Palbociclib (B) 24 h nach Behandlung mit DMSO als Positivkontrolle und BM als Negativkontrolle. Die Absorptionswerte der relativen Absorption [A_{370 nm} - A_{492 nm}] sind in der y-Achse angegeben. Daten aus drei unabhängigen Versuchsdurchläufen, die jeweils in Triplikaten angefertigt wurden, sind hier als Mittelwert ± SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde die einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit dem Newman-Keuls als Post-Test genutzt: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; $n = 3$. P – Werte wurden nur im Vergleich zur Positivkontrolle DMSO berechnet.

Kohärent mit den Ergebnissen des XTT-Testes zeigte der BrdU-Assay nach Behandlung mit Dinaciclib und Palbociclib in allen drei Konzentrationen nach 24 h eine signifikante Reduktion der DNA-Synthese mit linearer Dosis-Wirkungskurve. Während im XTT-Test eine signifikante Abnahme der metabolischen Aktivität erst 72 h nach Behandlung zu messen war, konnte der BrdU bereits nach 24 h einen deutlichen antiproliferativen Effekt beider Substrate, insbesondere von Palbociclib, nachweisen.

3.3.4 Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie und Propidiumiodid

Dinaciclib und Palbociclib blockieren den Übergang von der G1 in die S-Phase und führen zum Arrest des Zellzykluses.

Um zu zeigen, dass die Reduktion der Proliferation durch die beiden CDK-Inhibitoren auf einen Arrest der Zellzyklusprogression zurückzuführen ist, wurde das Verfahren der Durchflusszytometrie genutzt. Dafür wurde die DNA der Zellen mit Propidiumiodid (PI)

Ergebnisse

angefärbt und der Farbstoffanteil der Zellen mittels eines Durchflusszytometers gemessen (siehe Abbildung 15). Je nach Stadium, in welcher Phase des Zellzykluses die Zellen sich gerade befinden, enthalten diese unterschiedliche Anteile an DNA; mit einem geringen Gehalt in der G1-Phase, einem höheren während der S-Phase und einem doppelten in der G2-Phase.

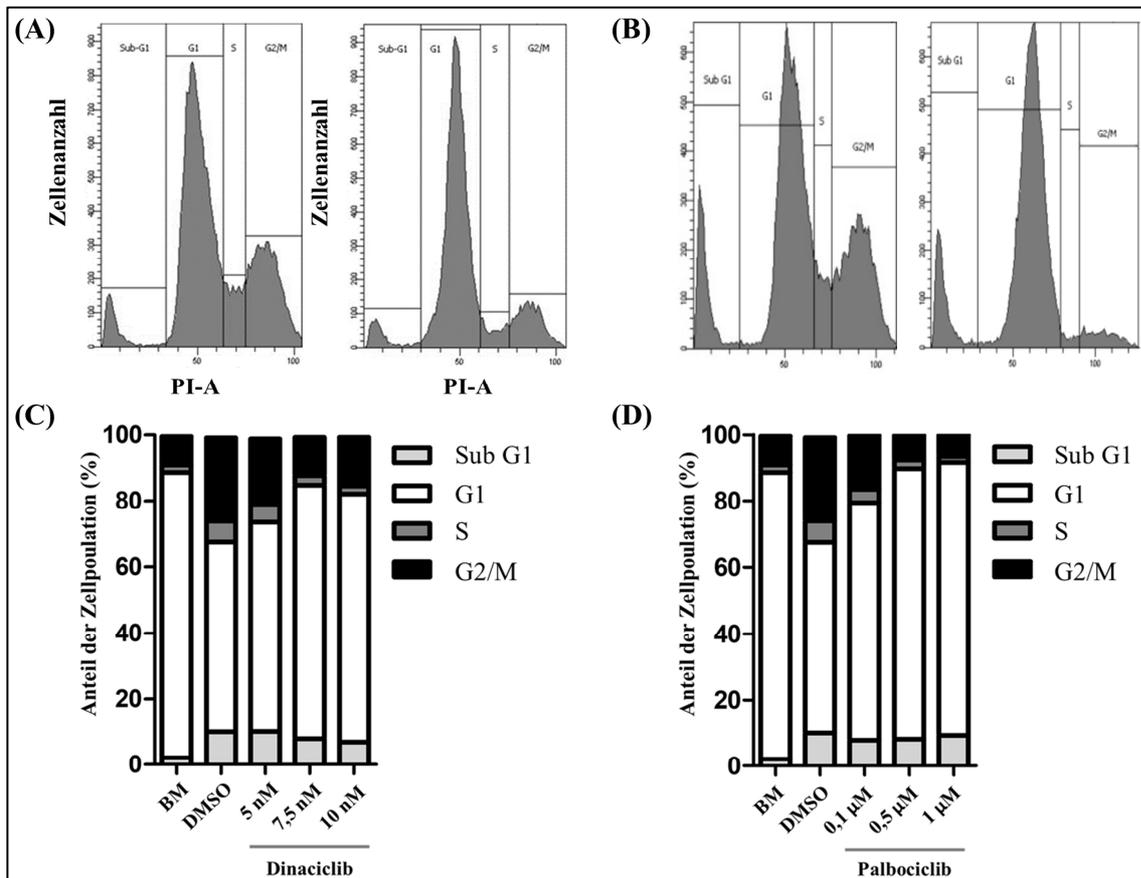


Abbildung 15: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie 24 h nach Behandlung. Die Zellzyklusanalyse 24 h nach Behandlung mit Dinaciclib (A, C) oder Palbociclib (B, D) mittels Durchflusszytometrie. In den repräsentativen Histogrammen (A, B) ist der Zellzyklusarrest zwischen der Positivkontrolle DMSO und der jeweils höchsten Konzentration der CDKIs (Dinaciclib mit 10 nM (A) und Palbociclib mit 1 µM (B)) beispielhaft dargestellt. Die Zellpopulationen der entsprechenden Kondition wurden nach dem Fluoreszenzsignal in dem PI-A Kanal in die einzelnen Fraktionen unterteilt und der Mittelwert aus 4 unabhängigen Versuchsdurchläufen in C und D dargestellt.

Zellen, die vorher mit Dinaciclib oder Palbociclib behandelt wurden, zeigten eine dosisabhängige Zunahme der G1 – Fraktion, bei gleichzeitiger Abnahme der S- und G2-Phase. Während bei Palbociclib sich für jede höhere Konzentration eine Zunahme der G1-Phase unter Abnahme der G2/M-Phase zeigte, nahm bei Dinaciclib in der höchsten Konzentration die G1-Phase wieder leicht ab, bei Zunahme der G2/M-Phase. Die Sub-

G1- Phase zeigt fragmentierte DNA-Anteile an, die nach Apoptose auftreten. Hier konnte kein Anstieg unter der Anwendung von Dinaciclib und Palbociclib gemessen werden, was gegen eine ausgeprägte Zytotoxizität der Substanzen in diesen Konzentrationen sprach.

3.3.5 Molekularer Wirkmechanismus von Dinaciclib und Palbociclib

Durch Unterdrückung des RB-Signalweges führen Dinaciclib und Palbociclib zum Zellzyklusarrest ohne molekularbiologischen Nachweis einer Apoptose-Induktion.

Als nächsten Schritt sollte der molekulare Wirkmechanismus des Zellzyklusarrest durch die synthetischen CDKIs in PSMCs verifiziert werden, wie er bereits für verschiedene Tumorzellen publiziert wurde. Wie im Abschnitt 1.4.3 beschrieben, bewirken Dinaciclib und Palbociclib eine Inhibition der aktiven CDK/Zyclin-Komplexe entsprechend des jeweiligen Wirkspektrums. Martin et al. konnten zeigen, dass sich die hohe Potenz und Selektivität von Dinaciclib durch Bildung eines komplexen Netzwerkes aus Bindungsinteraktionen im Bereich der ATP-Bindungsstelle der aktiven Komplexe von CDK 1, 2, 5 und 9 erklären lässt⁴⁰. Über eine vergleichbare Bindung innerhalb der ATP-Bindungsstelle inhibiert Palbociclib die Kinaseaktivität von CDK 4 und 6⁵⁶. Es resultiert eine Störung des nachfolgenden RB-Signalweges, wobei durch ausbleibende Phosphorylierung des RB-Proteins die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren E2F unterbleibt, welcher normalerweise die Expression essenzieller proliferative Gene induziert. Die Progression des Zellzykluses wird auf diese Weise durch die synthetischen CDKIs Dinaciclib und Palbociclib unterbunden. Um diesen Wirkmechanismus in humanen PSMCs zu bestätigen, wurden Proteinexpressionen relevanter Zellzyklusproteine mittels Western Blot 24 h nach Behandlung mit den Inhibitoren bestimmt (siehe Abbildung 16).

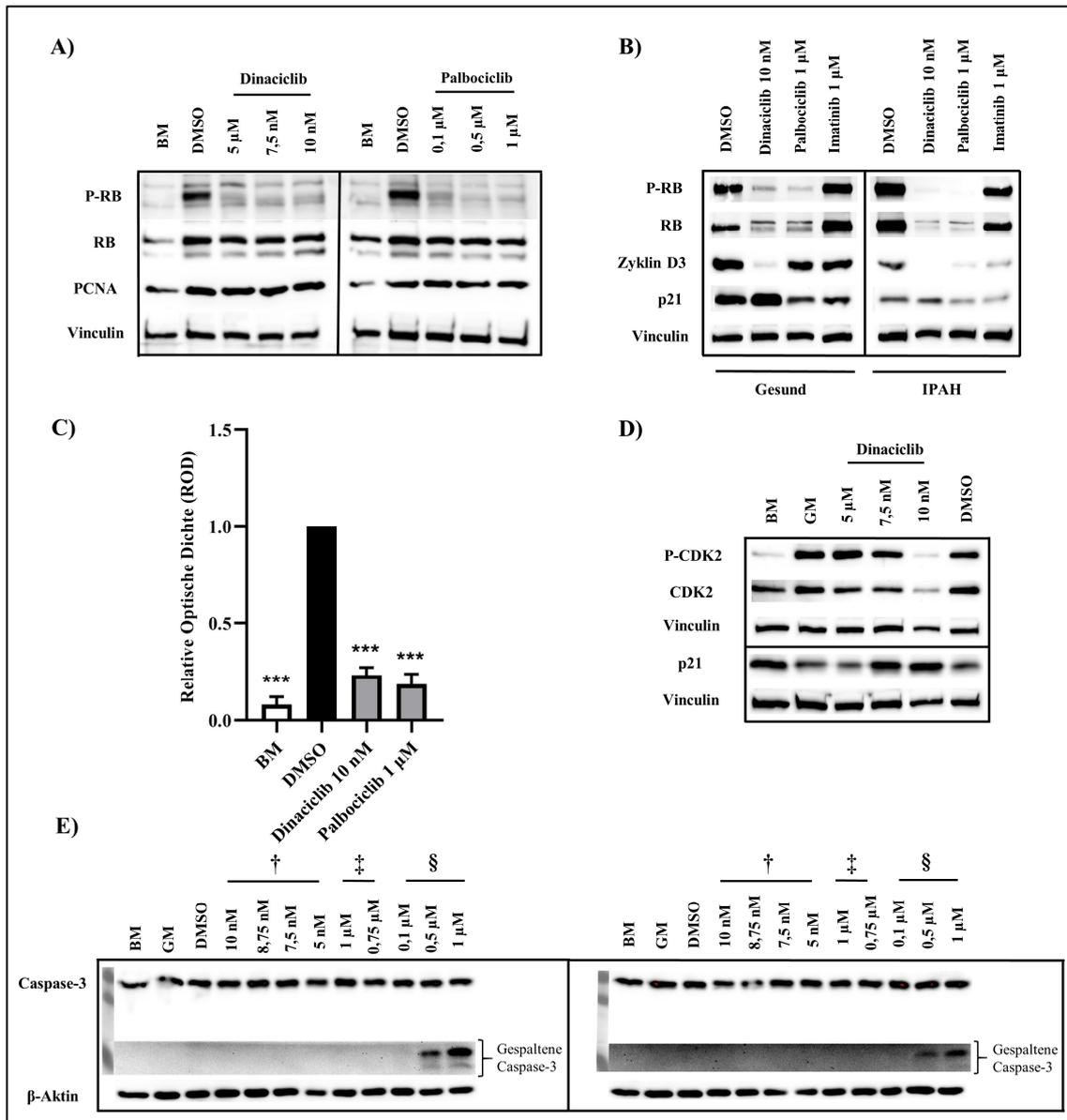


Abbildung 16: Western Blot Analyse Zellzyklus- und Apoptose-relevanter Proteine. Darstellung von P-RB, totalem RB und der Ladungskontrolle Vinculin in PASMcs 24 h nach Inhibitoreinsatz im Vergleich zur Positivkontrolle DMSO und Negativkontrolle BM (A). Vergleich der Expression von P-RB, totalem RB, p21 und der Ladungskontrolle Vinculin 24 h nach Behandlung mit Dinaciclub, Palbociclib und Imatinib in PASMcs zwischen gesundem Donor und Patient mit IPAH (B). Densitometrische Quantifizierung der P-RB/RB-Suppression der jeweiligen Höchstkonzentration des angewendeten Inhibitors (C). Zur statistischen Analyse wurde die einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA) mit dem Dunnetts-Test als Post-Test genutzt: * $p < 0.033$, ** $p < 0,002$, *** $p < 0,001$; $n = 3$. Darstellung von P-CDK 2, totalem CDK 2 und p21 mit der Ladungskontrolle Vinculin 24 h nach Behandlung mit Dinaciclub in PASMcs mit zusätzlicher Positivkontrolle GM (Wachstumsmedium ohne DMSO) (D). Caspase-3 Expression 24 h (links) und 48 h (rechts) nach Behandlung mit Staurosporin als Positivkontrolle (\dagger = Dinaciclub, \ddagger = Palbociclib, \S = Staurosporin) (E).

Der unmittelbare Effekt einer verminderten Phosphorylierung des RB-Proteins konnte sich für Dinaciclib und Palbociclib in allen angewendeten Konzentrationen, bei unveränderten totalen RB-Proteingehalt, zeigen (A). Dieser Wirkmechanismus ließ sich im direkten Vergleich zu Imatinib, einem Inhibitor mit unterschiedlichem Angriffspunkt, nochmal deutlich darstellen: Während Imatinib zwar antiproliferativ wirkt, jedoch als Tyrosinkinaseinhibitor nicht unmittelbar im RB-Signalweg ansetzt, zeigte sich hier keine Änderung des P-RB-Gehaltes im Vergleich zur Kontrolle, während Palbociclib und Dinaciclib wieder eine klare Suppression der P-RB Proteinexpression demonstrierten (B). Sichtbar wurde ebenfalls eine Überexpression von P-RB und RB in der Positivkontrolle im Vergleich der PAH Gruppe zu gesunden PSMCs. Die Expression des endogenen CDKI p21 zeigte sich dabei in beiden Gruppen, Gesund und PAH, in der Dinaciclib-Kondition im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Zur Bestimmung des P-RB/RB-Quotienten wurden die oben beschriebenen Ergebnisse in einer densitometrischen Auswertung quantifiziert (C). Für Dinaciclib in den Konzentrationen 5 nM und 7,5 nM zeigte sich die Expression von CDK 2 und dessen aktive phosphorylierte Form P-CDK 2 im Vergleich zur Kontrolle konstant, während in der Höchstkonzentration ein Abfall von CDK 2 und dessen phosphorylierten Form zu verzeichnen war (D). Analog zu den obigen Ergebnissen führte Dinaciclib wieder zur Überexpression von p21 in den höheren Dinaciclib-Konzentrationen. Zur Evaluierung toxischer Nebeneffekte der CDKIs wurden die PSMCs-Proteinlysate auf Spaltprodukte der Caspase-3 hin untersucht (E). Die Protease Caspase-3 gehört als Caspase zu einer zentralen Gruppe an Enzymen der Exekutivphase des programmierten Zelltodes, der Apoptose. Die inaktive Vorstufe wird im Zuge der Initiation der Apoptose in aktive Spaltprodukte geteilt, die sich im Western-Blot nachweisen lassen können⁵². In der Analyse zeigten sich keine nachweisbaren Spaltprodukte 24 h nach Behandlung der PSMCs mit Dinaciclib oder Palbociclib.

3.3.6 Transkriptionelle Folgen der Zellzyklusinhibition

Die Suppression des P-RB/RB-Signalwegs durch Dinaciclib und Palbociclib führt zur reduzierten Expression der E2F-abhängigen Gene CCNA2 und CDC2.

Die Gruppe des E2F-Transkriptionsfaktors umfasst mindestens 7 unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (E2F 1-7), die in der G0/G1-Phase des Zellzykluses an das RB-Protein gebunden sind und damit, durch fehlende Synthese wesentlicher zellzyklusrelevanter Proteine, die G1/S-Transition verhindert wird. Die CDK/Zyklin-

Ergebnisse

abhängige Phosphorylierung des RB-Proteins in der späten G1-Phase führt zur Freisetzung von E2F. E2F induziert die Transkription einer Vielzahl an Genen, deren Genprodukte für das Fortschreiten des Zellzykluses, der DNA-Synthese und DNA-Reparatur relevant sind, aber auch für Prozesse ohne direkten Bezug zum Zellzyklus, wie Apoptose oder Zelldifferenzierung. CCNA2 (Protein: Zyklin A2) und CDC 2 (Protein: CDK 1) sind Beispiele Zellzyklus-relevanter Gene, die E2F-abhängig transkribiert werden und deren Genprodukte eine essenzielle Rolle für die darauffolgende S/G2-Phase spielen. Das Gen CCNA2 codiert für Zyklin A2, welches v.a. in der S- und G2-Phase gebildet und während der Prometaphase degradiert wird. In diesem Zeitraum bindet Zyklin A2 an CDK 2 in der S-Phase, um die Passage durch diese Phase zu ermöglichen, und in der G2-Phase ermöglicht es zusammen mit CDK1 den Übertritt in die G2-Phase. Es gibt zwei Arten des Zyklin A, A1 kommt spezifisch im Hoden vor, während A2 ubiquitär in allen Säugetierzellen vorkommt. Dabei korreliert Zyklin A2 mit hohen zellulären Proliferationsraten und ist häufig in humanen Tumorzellen hochreguliert⁵⁷. Wie bereits beschrieben, stellt auch CDK 1 eine Schlüsselrolle beim Durchlaufen des Zellzykluses da. Zusammen mit Zyklin A vermittelt CDK 1 den Übergang in die G2-Phase und in Verbindung mit Zyklin B in die Mitose. Um die Effekte der P-RB Suppression durch die Inhibitoren zu untersuchen, wurde die mRNA-Expression von CCNA2 und CDC2 mittels RT-PCR 24 h und 48 h nach Behandlung quantifiziert (siehe Abbildung 17).

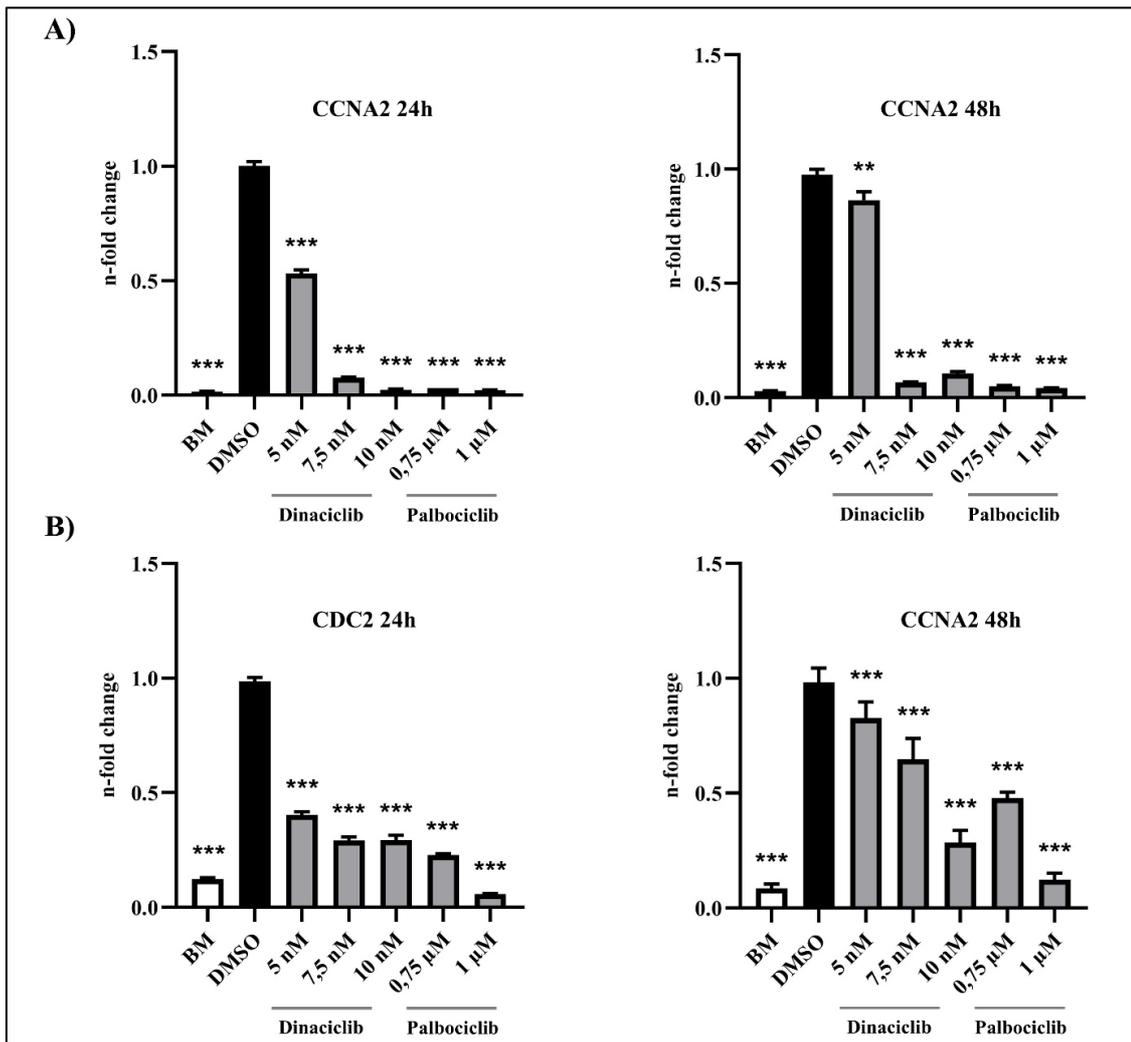


Abbildung 17: RT-PCR Analyse der Zielgene CCNA2 und CDC2 des Transkriptionsfaktors E2F 24h und 48h nach Behandlung. Quantitative Messung der mRNA-Expression der E2F-abhängigen Gene CCNA2 (A) und CDC2 (B) 24 h (links) und 48 h (rechts) nach Behandlung mit Dinaciclilb und Palbociclilb. In der Y-Achse wird die relative Genexpression als „n-fold change“ zur Positiv-Kontrolle DMSO angegeben. Die Kondition Basalmedium (BM) diente als Negativkontrolle. Als Ladungskontrolle wurde das Protein GAPDH verwendet. Statistische Auswertung erfolgte mittels One-way-ANOVA-Tests mit dem Bonferroni-Test als Post-Test: * $p < 0.033$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.001$; $n = 3$.

Für CCNA2 zeigte sich 24 h nach Einsatz der CDK-Inhibitoren eine signifikante, dosisabhängige Verminderung der mRNA-Expression in allen eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zur Positivkontrolle DMSO (A). Für alle Konditionen mit Ausnahme von der geringsten Dinaciclilb-Konzentration zeigte sich sogar eine nahezu vollständige Unterdrückung der mRNA-Synthese. 48 h nach Behandlung stieg das Expressionsniveau wieder an; insgesamt zeigte sich aber auch hier eine signifikante

Ergebnisse

Reduktion verglichen zur Positivkontrolle. Ein vergleichbares Bild zeichnete sich auf für CDC2 ab (B). Auch hier ließ sich 24 h nach Behandlung mit Dinaciclib und Palbociclib eine dosisabhängige Suppression der mRNA-Synthese zur Positivkontrolle DMSO feststellen, die 48 h nach Behandlung in allen Konditionen zwar weiterhin signifikant vermindert blieb, aber sich tendenziell wieder normalisierte.

4 Diskussion

4.1 Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Der vaskuläre Gefäßumbau ist ein zentrales führendes pathologisches Merkmal der PAH und trägt wesentlich zu den erhöhten Druckverhältnissen innerhalb der pulmonalen Strombahn bei. Auf zellulärer Ebene zeichnet sich dieser durch eine exzessive Proliferation mit pathologischer Apoptose-Resistenz der zellulären Komponenten der Gefäßwand aus. Betroffen sind dabei alle drei Schichten der Gefäßwand mit stärkster Ausprägung bei den glatten Muskelzellen der Media²⁰. Neben dem Querschnittsverlust der Gefäße durch „Neo-Muskularisation“ von physiologisch nicht-muskularisierten oder nur teilweise muskularisierten distalen Pulmonalarterien, trägt die Hypertrophie der glatten Muskelzellen und Invasion der Media durch Myofibroblasten zudem zur Entwicklung von plexiformen Läsionen bei^{5,58}. Diese Läsionen können bis zur vollständigen Obliteration der distalen Pulmonalarterien führen und so die hohen Druckverhältnisse weiter verschlechtern. Im Kontext der Erkenntnis, dass die exzessive Proliferation eine maßgebliche Rolle in der Progression der PAH spielt, bieten sich anti-proliferative Therapieansätze als potenzielle Interventionsmöglichkeit an. Dabei zeigt das Proliferationsverhalten der glatten Muskelzellen wesentliche Gemeinsamkeiten zu Tumorzellwachstum^{7,25,26}. Auch wenn ein rein neoplastischer Prozess die Pathogenese der PAH nicht vollumfänglich erklärt, so ermöglichen antiproliferative Therapiestrategien die Reduktion der exzessiven Proliferation der glatten Muskelzellen und die Eindämmung des Gefäßumbauprozess.

Fehlregulationen des Zellzykluses durch krankhaft erhöhte Expression essentieller Zellzyklusproteine, insbesondere der CDKs, Zykline und der endogenen CDKIs wurden für eine Vielzahl von Tumoren beschrieben und sind mit deren massiv gesteigerten Proliferationsraten vergesellschaftet^{33-35,59,60}. Auch im Wachstum von PASMCs wurde durch mehrere Autoren die zentrale Rolle der Zellzyklusproteine untersucht und hervorgehoben. So wurde der CDKI p27 als zentraler Mediator der Proliferation von PASMCs erkannt und berichtet, dass p27 für das Gleichgewicht an proliferierenden und nicht proliferierenden PASMCs eine entscheidende Rolle spielt⁶¹. Weiter korreliert p27 ebenfalls invers mit dem Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen in Tiermodellen. So wird p27 dauerhaft in Gefäßmuskelzellen exprimiert, nach einer Gefäßverletzung degradiert, um zelluläre regenerative Proliferation zuzulassen und nach erfolgter Reparaturphase

zum Arrest der Proliferation erneut wieder exprimiert⁶². Konsistent mit dieser Erkenntnis konnten Yu et al. zeigen, dass die günstigen Effekte von Heparin auf die Hypoxie-induzierten PAH *in vitro* als auch *in vivo* auf eine über p27 vermittelte Hemmung der Proliferation der PASCs basieren⁶³. In Bezug auf p21 ließ sich Vergleichbares nachweisen. Die positive Wirkung von NO soll, neben seinen vasodilatativen Eigenschaften, auch auf der Stimulation der Expression von p21 in PASCs basieren und somit die Entwicklung Hypoxie-induzierter PAH reduzieren⁵⁴. Auch knüpft der protektive Effekt des Inhibitors A17, der eine bestimmte Micro-RNA hemmt und so in den zellulären Prozess der Genexpression eingreift, an diesen Wirkungsmechanismus an⁶⁴. Der Inhibitor A17 konnte in Monocrotalin-induzierter experimenteller PAH klinisch relevante Endpunkte wie den pulmonal-arteriellen Gefäßwiderstand und das Ausmaß der Rechtsherzhypertrophie signifikant reduzieren. *In vivo* als auch *in vitro* wiesen die Autoren die gesteigerte Synthese von p21 als zentralen Effektor der Wirkung des Inhibitors nach. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass zelleigene CDKs, wie p27 und p21, in der Proliferation der PASCs eine zentrale Rolle einnehmen und als Effektoren für verschiedener therapeutischer Ansätze dienen, um die exzessive Proliferation insbesondere der PASCs zu beeinflussen. Daraus leiteten sich die zwei Fragestellungen der vorliegenden Arbeit ab:

1. Ist die Expression von CDKs, CDKs und Zyklinen in Patienten mit PAH im Vergleich zu gesunden Personen (Donoren) verändert?
2. Inwiefern kann die direkte Applikation pharmazeutischer CDKs einen therapeutischen Nutzen in der PAH darstellen?

Dabei wurden die selektiven Inhibitoren Dinaciclib und Palbociclib genutzt, deren Einsatz bereits in unterschiedlichen Tumorzelllinien erfolgreich untersucht wurde und im Fall von Palbociclib Zugang in die klinische Routine in der Brustkrebstherapie erlangte. Mit ihren sich ergänzenden Wirkungsprofilen in den zellzyklusrelevanten CDKs 1, 2, 4 und 6 sollten diese CDK-Inhibitoren ein umfassendes Bild zur möglichen Zellzyklusinhibition als antiproliferative Therapie bei PAH demonstrieren können.

4.2 Ergebnisse der Arbeit

4.2.1 **Erster Teil: Screening in Lungenhomogenisaten**

Wie eingangs beschrieben, sind für verschiedenste Tumorentitäten Hochregulierung von CDKs und Zyklinen, sowie Herunter-Regulierungen von CDKIs identifiziert worden, die mit der exzessiven Proliferation assoziiert werden. Ein Ziel dieser Arbeit war, zu überprüfen, ob sich vergleichbare Expressionsunterschiede bei Patienten mit PAH in Vergleich zu gesunden Personen finden lassen. Dafür wurden Lungenhomogenisaten der Gießener Biobank genutzt, die aus dem Lungengewebe von Patienten mit PAH stammten und mit Lungengewebe von Patienten ohne PAH (sogenannte Donoren) verglichen. Es wurden insgesamt zwei Probensätze genutzt, die sich durch das Alter und die Klassifikation der PAH-Patienten unterschieden (siehe Tabelle 4). Untersucht wurde die Proteinexpression von CDK 2, 4 und 6, sowie von p27 und Zyklin D3. Es zeigte sich bei der Analyse der Expression für CDK 4 und CDK 6 bei einer Auswahl an Proben, dass sich für CDK 4 und CDK 6 innerhalb der Vergleichsgruppen eine hohe interindividuelle Variation bestand, die den Gruppenvergleich erschwerte (siehe Abbildung 9). Es wurden im Folgenden alle Proben hinsichtlich ihrer Expression von CDK 4 und CDK 6 untersucht, grob visuell entsprechend ihrer Expression in drei Gruppen gegliedert (stark, mittelstark und schwache Expression des Zielproteins) und für jede Vergleichsgruppe eine repräsentative Auswahl getroffen (siehe Abbildung 10 und Tabelle 6).

Auch der Vergleich der repräsentativen Probensätze ließ keinen Trend erkennen; insgesamt war in den meisten Proben beider Vergleichsgruppen eine kräftige Expression der CDKs 2, 4, 6 und Zyklin D3 nachweisbar (siehe Abbildung 11). Für p27 zeigte sich eine verminderte Expression dieses zelleigenen CDK-Inhibitors in der PAH-Gruppe; allerdings ließ sich dies nicht in nachfolgenden Versuchsreihen bestätigen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der Inhomogenität innerhalb der Gruppen, d.h. Donor und PAH, welche letztendlich die natürliche biologische Diversität abbildet, wurde auf weitere Western-Blot-Analysen der Lungenhomogenisate verzichtet. Neben der interindividuellen Variabilität eines jeden menschlichen Organismus, die sich auch nicht durch Gruppierungen vollständig bereinigen lässt, können Gewinnung, anatomische Lage, Prozessierung und Aufbewahrung des Probenmaterials einen wesentlichen Einfluss auf die Qualität der Probe nehmen. So kann die Zeitdauer von der Entnahme bis zum Einfrieren oder Unterbrechungen der Kühlketten zur Degradierung von Proteinen führen.

Als wichtigstes Argument ist allerdings die folgende Erklärung zu nennen: Die homogenisierten Proben enthielten neben Proteinen von glatten Muskelzellen auch Anteile weiterer pulmonal-vaskulärer Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen, wobei der Anteil je nach Entnahmestelle und Größe variieren kann. Insgesamt sind bisher bis zu 40 unterschiedliche ortständige Zelltypen der Atemwege bekannt⁶⁵. Es wurden zudem auch Proben von Datensätzen mit noch älterer Einteilung der PAH genutzt, wobei eventuell Patienten in die PAH-Gruppe eingeschlossen wurden, die nach neuem Kenntnisstand nicht zu dieser Gruppe gehören würden. Auch die „gesunden“ Proben wurden im Kontext von anderen pulmonalen Krankheiten, wie z.B. COPD gewonnen, die ebenfalls eine unterschiedliche Proteinexpression zur Folge haben können. Diese Faktoren können in ihrer Kombination die interindividuelle Variation der Proben erklären und die Eindeutigkeit der möglichen Schlussfolgerung beeinträchtigen, dass CDKs nur in einzelnen Zelltypen des Lungengewebes in der PAH verstärkt exprimiert werden. Es kann daher nur eine Aussage über die Gesamtheit aller Proteine im Homogenisat aus verschiedensten Zellen getroffen werden. Um diesem Argument Rechnung zu tragen wurden daraufhin in weiterführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe Aktivitätsmessungen von Serin/Threonin-Kinasen in Lysaten von isolierten PSMCs gesunder bzw. erkrankter PAH-Patienten durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass einige CDKs in erkrankten Proben übermäßig aktiv sind im Vergleich zu gesunden PSMCs unter basalen, unstimulierten Mediumbedingungen. Protein-, mRNA- und immunhistochemische Analysen ließen dabei den Schluss zu, dass die vermehrte CDK-Aktivität auf eine vermehrte Expression in den PSMCs in der Gefäßwand zurückzuführen ist. Auch ließen sich in Tiermodellen der PAH vermehrte Expression von CDK 2 und teilweise auch CDK 4 and CDK 6 in Lungenhomogenisaten nachweisen⁶⁶. Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass die hohe Heterogenität innerhalb der Vergleichsgruppen der humanen Lungenhomogenisate insgesamt am ehesten methodisch bedingt war. Die unterschiedlichen, anatomischen Entnahmestellen und die damit verbundene variable Zellzusammensetzung des zur Verfügung gestellten humanen Lungengewebes kann hier eine Erklärung bieten, warum die Auswertbarkeit dieser Ergebnisse (im Vergleich zu den späteren Versuchen mit isolierten PSMCs) stark eingeschränkt ist.

4.2.2 Zweiter Teil: Zellkulturversuche mit Dinaciclib und Palbociclib

4.2.2.1 Antiproliferative Potential

Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte ein umfangreiches Profil des antiproliferativen Potentials pharmazeutischer CDKIs in humanen PSMCs erstellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass Palbociclib und Dinaciclib dosisabhängig im nanomolaren bzw. mikromolaren Konzentrationsbereich die Proliferation der PSMCs äußerst effizient inhibieren können. Während mikroskopisch für Palbociclib rein visuell keine eindeutige Verminderung der Zellzahl auf den Zellkulturplatten zu sehen war, zeigte sich für Dinaciclib bereits hier eine deutliche Reduzierung der Zelldichte (Abbildung 12). Die Aufnahmen wurden nicht über Zellzählungen quantifiziert und sollten einen rein qualitativen Eindruck vermitteln. So ließ sich hier der antiproliferative Effekt von Palbociclib methodenbedingt nicht klar darstellen. Quantitativ konnte der proliferationshemmende Effekt der beiden Substanzen anhand der Messung der DNA-Synthese und der metabolischen Aktivität gezeigt werden (siehe Abbildung 13 und 14). Hier zeigten sich lineare Dosis-Wirkungs-Beziehungen in den Konditionen beider synthetischer CDKIs im Vergleich zur Kontrolle. Bestätigt werden konnte der antiproliferative Effekt durch Analyse des Zellzykluses, in dem sich ebenfalls eine dosisabhängige Umverteilung der Zellen in den jeweiligen Phasen des Zellzykluses zeigte (siehe Abbildung 15). So stieg in den behandelten Konditionen die G1-Population im Vergleich zur Positivkontrolle an, während die G2- und S-Populationen abnahmen. Diese Ergebnisse zeigten einen Arrest des Zellzykluses in der G1-Phase, da für eine G1/S-Transition sowohl CDK 2 als auch CDK 4 und CDK 6 in ihrer aktiven Form notwendig sind. Molekularbiologisch konnte der Zellzyklusarrest in PSMCs auf eine unmittelbare Suppression der Phosphorylierung des RB-Proteins, dem Zielprotein des aktiven CDK/Zyclin-Komplexes, zurückgeführt werden. Dem gegenüber zeigte sich am Beispiel von Dinaciclib in den niedrigen Konzentrationen eine konstante Expression von CDK 2 und dessen phosphorylierte Form (P-CDK 2). Damit unterstreichen diese Ergebnisse den bereits für Tumorzellen publizierten Wirkmechanismus der synthetischen CDKIs, die selektiv die Kinaseaktivität der aktiven CDK/Zyclin-Komplexe hemmen. In der höchsten Konzentration zeigte Dinaciclib auch eine generelle Inhibition der CDK 2-Konzentration, womöglich als zellulärer negativer Rückkopplungs-Mechanismus bei insgesamt stark unterdrückter proliferativer Aktivität, wenn man miteinbezieht, dass in dieser

Konzentration die Proliferationsrate im BrdU-Assay unter der der Negativkontrolle lag (siehe Abbildung 14). Interessanterweise zeigte sich in mehreren Versuchsreihen eine erhöhte Expression des endogenen Inhibitors p21 nach Applikation von Dinaciclib nicht aber nach Palbociclib (Abbildung 16 B, D). Wie bereits eingangs beschrieben, nutzen vaskuläre Zellen die Hoch- und Herunterregulierung der endogenen Inhibitoren wie p21 und p27, um ihre Proliferationsrate den äußeren Umständen, wie z.B. vermehrte Zellteilung nach Gefäßverletzung, anzupassen⁶¹. Gemäß dessen zeigt sich in der Negativkontrolle BM eine Hochregulierung von p21 zur Unterdrückung der Proliferation bei fehlender mitogener Stimulation. Eine Hochregulierung in den Dinaciclib-Konditionen könnte ebenfalls auf einen negativen Rückkopplungs-Mechanismus zurückzuführen sein, da Dinaciclib die Proliferation unterdrückt und die Zelle reaktiv eventuell weitere teilungshemmenden Signalwege aktiviert. Fraglich bleibt dann, warum bei den ebenfalls proliferationshemmenden Wirkstoffen Imatinib und Palbociclib der Effekt zumindest für p21 ausbleibt. Dinaciclib unterscheidet sich von Palbociclib durch sein Wirkungsprofil, das wie p21 selbst vorzugsweise CDK 1 und CDK 2 hemmt³². Auch wenn unklar bleibt, wie diese Interaktion intrazellulär vermittelt wird, scheint Dinaciclib neben dem eigenen antiproliferativen Effekt zusätzlich einen endogenen antiproliferativen Signalweg über p21 zu induzieren. Das könnte womöglich seine hohe Potenz bereits im nanomolaren Dosisbereich erklären. Als unmittelbare Folge der Suppression des P-RB/E2F-Signalweges durch die beiden CDK-Inhibitoren zeigte sich nach 24 h und 48 h eine signifikant verminderte mRNA-Expression der E2F-abhängigen Gene, hier CCNA2 und CDC2 (Abbildung 17). Festzustellen war, dass während beide Inhibitoren nach 24 h die Transkription der Gene sehr potent inhibieren konnten, der inhibitorische Effekt nach 48 h zwar noch signifikant, jedoch abgeschwächt war. Erklärend dafür könnte die Neusynthese von RB-Proteinen sein, während die Konzentration der Inhibitoren über diesen Zeitverlauf aufgrund von Abbauprozessen gesunken war. Insgesamt konnte damit der antiproliferative Effekt der CDKIs, Dinaciclib und Palbociclib, quantifiziert, molekularbiologisch nachvollzogen, und dessen unmittelbare Folgen auf die nachfolgende Genexpression beschrieben werden. Damit sind die hier präsentierten Ergebnisse konsistent mit den Erkenntnissen von anderen Arbeitsgruppen, die diese CDKIs im onkologischen Bereich mittels ähnlicher Methodik untersucht haben. Parry et al. testeten Dinaciclib an einer Vielzahl an Tumorzelllinien (u.a. Brust-, Prostata- und Lungentumorzellen) und kamen zum Ergebnis, dass Dinaciclib in einem breiten Spektrum an Tumorzelllinien das Wachstum hemmt und *in vivo*

Tumormodellen zur Regression der Tumorerkrankung führt³⁹. Exemplarisch untersuchten sie an Tumorzellen des Ovars mittels Zellzyklusanalyse und über Western-Blot-Analyse die P-RB/RB-Suppression. Sie wählten dabei den Konzentrationsbereich von 3,15 – 6,25 nmol/l, da hier einerseits eine erkennbare P-RB-Suppression eintrat gleichzeitig aber noch keine Apoptose induziert wurde. Damit wurde indirekt der hier gewählte Anwendungsbereich von 5 – 10 nM bestätigt. Auch die hier vorgelegten präklinischen Daten von Palbociclib ließen sich durch einen Vergleich mit Literaturangaben bestätigen. So zeigten Finn et. al, dass Palbociclib 24 h nach Behandlung in Brustkrebszelllinien bei einer Konzentration von 100 nM ebenfalls zu einer verminderten Teilungsrate über Zellzyklusarrest und Suppression von P-RB führt⁴⁶. Damit konnte insgesamt die in Tumorzellen gezeigte Effektivität auch für humane PSMCs bestätigt werden.

4.2.2.2 Nebenwirkungen

Nebenwirkungen spielen bei allen therapeutischen Ansätzen eine wichtige Rolle, insbesondere bei onkologischen Therapien aufgrund ihrer teils ausgeprägten Zytotoxizität. Während aktuelle Chemotherapeutika sich oft durch ein breites Wirkungsspektrum für alle sich schnell teilenden Zellen (inklusive gesunder Knochenmarkszellen) auszeichnen, ist das Ziel zukünftiger onkologischer Therapien, ausschließlich die Tumorzellen zielgerichtet zu attackieren. Auch bei den Zellzyklus-Inhibitoren ist davon auszugehen, dass sie nicht zellspezifisch auf PSMCs wirken, sondern systemisch jede Zelle in ihrer Zellteilung beeinträchtigen. Die toxischen Nebenwirkungen konnten in dieser Arbeit anhand des XTT-Tests, der Zellzyklusanalyse und dem Nachweis von Spaltprodukten von Caspase-3 mittels Western Blot untersucht werden. Der XTT-Test lässt aufgrund der quantitativen Messung der metabolischen Aktivität auch Rückschlüsse auf die Viabilität der Zellen zu. So zeigten die PSMCs in allen angewendeten Konzentrationen beider Substanzen zwar einen geringeren Anstieg der Messkurve im Vergleich zur Kontrolle, jedoch keinen Abfall der Signalintensität zum vorigen Messwert bis 72 h nach Behandlung (siehe Abbildung 13). So war in allen Konditionen eine gegenüber der unbehandelten Kontrolle verminderte, aber absolut gesehen dennoch zunehmende metabolische Aktivität im zeitlichen Verlauf feststellbar, was für eine generelle Proliferation der Zellpopulation und gegen eine Apoptose-Induktion sprach. Vergleichbare Resultate konnten in der Zellzyklusanalyse gezeigt

werden, in der für alle Inhibitor-Konditionen kein signifikanter Anstieg in der Sub-G1 Phase 24 h nach Behandlung festzustellen war, in welcher normalerweise fragmentierte DNA-Anteile, die im Rahmen der Apoptose entstehen, nachweisbar wären (Abbildung 15). Auch ließen sich 24 h nach Behandlung keine Spaltprodukte der Caspase-3 mittels Western Blot für die Inhibitor-Konditionen detektieren (Abbildung 16 E). So zeigte sich insgesamt in den angewendeten Konzentrationsbereichen keine zytotoxischen Effekte der Inhibitoren, während ihr Effekt eher als zytostatisch zu beschreiben wäre. Damit sind diese Ergebnisse vereinbar mit den präklinischen Daten aus der onkologischen Literatur^{39,45,46}. Dinaciclib und Palbociclib wurden u.a. für dieses Projekt ausgewählt, da sich beide Präparate in onkologischen Versuchsreihen, sowohl *in vitro* und *in vivo* neben ihrem hohen antiproliferativen Potential auch durch eine allgemeine gute Verträglichkeit auszeichneten. Wie oben bereits beschrieben testeten Parry et al. Dinaciclib an Tumorzellen des Ovars und analysierten die zytotoxischen Effekte mittels Zellzyklusanalyse und über Western-Blot-Analyse von Caspase-Spaltprodukten. Eine Apoptoseinduktion 16 h nach Behandlung trat erst ab einer Konzentration von 12 nmol/l auf, die oberhalb der hier gewählten maximalen Konzentration für Dinaciclib liegt. Einhergehend damit zeigten die Autoren, dass kurze Inkubationsphasen von 2 h erst ab einer Konzentration von 25 nmol/l zu einem direkten toxischen Effekt durch Akkumulation von Zellfragmenten in der Sub-G1-Phase führten. Auch die Reduktion des Tumorumfanges um 70 – 90% durch Dinaciclib im entsprechenden Tiermodell des Ovarialkarzinoms konnte durch Konzentrationen unterhalb der maximalen tolerierbaren Dosis erzielt werden. In klinischen Phase-I- und Phase-II-Studien wurde der Einsatz von Dinaciclib am Patienten relativ gut vertragen^{42-44,55,67}. Zwar traten als Folgen der Anwendung gehäuft Übelkeit, Müdigkeit, Neutropenie, Leukopenie und Thrombozytopenie auf, insgesamt konnten aber diese Nebenwirkungen klinisch gut beherrscht werden. Betreffend Palbociclib konnten die Autoren in den präklinischen *in vitro* Untersuchungen in Brusttumorzellen mittels Zellzyklusanalyse ebenfalls keinen Nachweis einer Apoptose-Induktion feststellen⁴⁶. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte Palbociclib an Brusttumoren und weiteren soliden Tumoren, wie dem Kolonkarzinom, *in vitro* und *in vivo*⁴⁵. Neben erfolgreicher Regression des Tumorumfanges in den getesteten Tiermodellen, berichteten sie, dass keine klinischen Nebenwirkungen im Einsatz am Tiermodell beobachtet wurden. Dieses günstige Nebenwirkungsprofil konnte sich auch in klinischen Studien fortsetzen. So konnte Palbociclib in einer mit 521 Patienten großen Phase-III-Studie (Palbociclib und Fulvestrant vs. Placebo und

Fulvestrant) sicher eingesetzt werden. Zwar stiegen die hämatologischen Nebenwirkungen, wie Neutropenie, Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie signifikant an; der Anteil der schwerwiegenden febrilen Neutropenie jedoch nicht⁴⁸. Ähnliches zeigte eine weitere Phase-III-Studie (Palbociclib und Letrozole vs. Placebo und Letrozole) mit 666 Patienten. Auch hier zeigte Palbociclib myelotoxische Nebenwirkungen, die gemäß den Autoren mittels Dosisreduktion und entsprechenden unterstützenden Maßnahmen beherrscht werden konnten⁴⁹. Die mittlerweile erfolgte Zulassung und erfolgreiche Nutzung in der klinischen Routine bei Patientinnen mit metastasierten Brustkrebs unterstreicht die gute Verträglichkeit von Palbociclib³⁶. Somit bieten Dinaciclib und Palbociclib bezüglich ihres Nebenwirkungsprofil eine vielversprechende Ausgangslage für weiterführende Untersuchungen zur Evaluierung ihres therapeutischen Potentials in der Behandlung der PAH. Kritisch angemerkt werden muss allerdings, dass Dinaciclib in höheren Konzentrationen von 12 nmol/l *in vitro* Apoptose induzieren kann, während für Palbociclib kein apoptotischer Effekt beschrieben wurde^{39,46}. Vergleichbare Ergebnisse konnte unsere Arbeitsgruppe mittels eines LDH-Assay und eines AnnexinV/PI-Test beobachten. Während die extrazelluläre Menge von aktiver Laktat-Dehydrogenase im Medium für Dinaciclib auch in der höchsten Konzentration nicht anstieg, konnte im AnnexinV/PI-Test jedoch ein Anstieg der apoptotischen Zellfraktion beobachten werden. Palbociclib dagegen zeigte in beiden Testverfahren keine Anzeichen toxischer Nebenwirkungen⁶⁶. Trotz der insgesamt guten Verträglichkeit erscheint Dinaciclib potenziell toxischer zu sein als Palbociclib. Als Ursache dafür könnte das breitere Wirkspektrums angeführt werden, dass neben den zentralen CDKs, CDK 1 und CDK 2, auch CDK 5 und CDK 9 betrifft. Besonders CDK 1 scheint für die Zellteilung unverzichtbar⁶⁸. Zusätzlich werden CDK 5 und CDK 9 gehemmt, die zwar nicht zu den Zellzyklus-relevanten Kinasen gerechnet werden, jedoch eine zentrale Rolle in anderen zellulären Prozessen spielen, womit die genaue Tragweite der Inhibition dieser Kinasen nicht vollständig vorherzusagen ist. So ist bekannt, dass CDK 9 entscheidenden Einfluss auf die RNA-Polymerase-II während der Transkription nimmt und so in mehreren biologisch relevanten Prozessen, wie Zellentwicklung und Differenzierung, beteiligt ist. Funktionsstörungen von CDK 9 können daher mit einer Vielzahl an Erkrankungen assoziiert sein, wie kardialer Hypertrophie und Leukämie⁶⁹. Auch konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass Dinaciclib die Hochregulierung des endogenen CDK-Inhibitors p21 bedingt und somit mutmaßlich seinen antiproliferativen Effekt weiter steigern kann. Dadurch könnte auch die hohe

Potenz bereits im niedrigen nanomolaren Bereich erklärt werden, was jedoch auch leicht toxische Nebenwirkungen zur Folge haben könnte.

4.3 Limitationen der Arbeit

Trotz den vielversprechenden Daten zum therapeutischen Nutzen von Dinaciclib und Palbociclib in PSMCs in der pulmonal-arteriellen Hypertonie sind auch kritische Punkte zu diskutieren. Generell ist für die Aussagekraft nahezu jeder wissenschaftlichen Arbeit im medizinischen Bereich die Versuchsgruppenanzahl bzw. bei molekularbiologischen Arbeiten die Anzahl der biologischen Replikate wichtig, um sich einer Allgemeingültigkeit anzunähern. In den meisten hier durchgeführten Zellkulturergebnissen wurden die isolierten PSMCs von der Firma Lonza genutzt, die nach einem standardisierten Verfahren aus dem Lungengewebe von verstorbenen Personen gewonnen wurden. Damit sind die Ergebnisse der hier durchgeführten Versuche untereinander gut miteinander vergleichbar, da sie alle standardisiert an einer Zelllinie-ähnlichen Population und mittels mehrerer technischer Replikate durchgeführt wurden. Die Übertragbarkeit auf PSMCs anderer Individuen lässt sich damit aber nur eingeschränkt beurteilen. Zwar zeigten die Inhibitoren auch in PSMCs von IPAH-Patienten (siehe Abbildung 16) die gewünschte P-RB-Suppression, allerdings bleibt die Anzahl an biologischen Replikaten dennoch insgesamt zu gering für eine allgemeingültige Aussage.

Zusätzlich wären in Anbetracht der Frage nach einer Zelltyp-Spezifität in Bezug auf die glatten Muskelzellen aus dem pulmonalen Gefäßsystem weitere Versuche an den anderen Zelltypen der Gefäßwand notwendig, um ein größeres Bild über den Effekt an der Gefäßwand zu gewinnen. Insbesondere in Anbetracht der multifaktoriellen Pathogenese in PAH, ist der Effekt auf Endothelzellen, Fibroblasten und Entzündungszellen von Interesse. Ebenso sollten Gefäßzellen aus dem aortalen System im Vergleich zum pulmonalen Kreislauf untersucht werden.

Darüber hinaus sind die klassischen Limitationen einer reinen *in vitro* Studie zu nennen. Zwar konnten anhand den isolierten PSMCs die antiproliferative Wirkung, der molekularbiologische Mechanismus und die mögliche Apoptose-Induktion nachvollzogen werden, dennoch spiegeln die Versuchsbedingungen des *in vitro* Modells nur bedingt die eines menschlichen Organismus wider. Während die Zellen in den hier durchgeführten Versuchen adhärent in einer Ebene am Boden einer Zellschalen wuchsen,

sind PASMCs im Blutgefäß besonderen Umgebungsfaktoren ausgesetzt. Gefäßzellen müssen sich u.a. an den mechanischen Stress durch die Scherkräfte des zirkulierenden Bluts und den intraluminalen Drücken anpassen. So wurde beschrieben, dass hohe intravaskuläre Scherkräfte sogar prädisponierend sein können für die Entstehung einer PAH⁷⁰.

Einen weiteren wesentlichen Einfluss auf das Verhalten der Zellen hat die interzelluläre Kommunikation, insbesondere zwischen den speziellen Zelltypen der Gefäßwand. Wie in Abschnitt 1.4.1 beschrieben ist im Rahmen von Endothelzell-Dysfunktionen und inflammatorischen Prozessen in der Gefäßwand in der PAH die Mikroumgebung der PASMCs gestört²⁴. Aber auch über zirkulierende Botenstoffe wie Hormone oder Entzündungsmediatoren stehen Organe in ständiger Wechselwirkung zueinander. *In vitro*-Modelle können immer nur Teilaspekte der menschlichen Physiologie abbilden, was die Notwendigkeit von weiterführenden *in vivo* Versuchen und klinischen Studien begründet.

Ein weiterer Punkt stellt die umfassende Evaluierung der Funktion der CDKs und die Folge ihrer Inhibition dar. Diese Arbeit betrachtet die CDKs aus dem konventionellen Blickwinkel, der sich auf ihre Zellzyklusfunktionen bezieht. Neben ihrer klassischen hier beschriebenen Funktion werden CDKs auch mit weiteren Zellzyklus-unabhängigen Funktionen wie beispielsweise der Transkription, Reparatur der DNA, Zytoskelett-Dynamik, epigenetischen Regulation und dem Metabolismus in Verbindung gebracht^{71,72}. So exprimieren auch ausdifferenzierte und teilungsunfähige Zellen wie Neuronen verschiedene CDKs, Zyklone und endogene CDKs⁷³. Die Folgen, insbesondere von Dinaciclib mit seinem breiteren Wirkungsspektrum (CDK 1, 2, 5, 9), konnten in diesen Versuchen nicht vollständig erfasst werden. So soll CDK 9 die Transkription beeinflussen und insbesondere als regulatorische Antwort auf einen DNA-Schaden in Komplex mit Zyklin K dienen⁷⁴. Einerseits kann die attestierte, verminderte Proliferation damit nicht sicher ausschließlich auf den Zellzyklusarrest zurückgeführt werden, da noch unbekannt, unterdrückte Zellfunktionen auf das Teilungsverhalten Einfluss nehmen könnten. Andererseits kann damit die Wirkung der Inhibitoren im Organismus durch die unterschiedlichen Effekte z.B. auf die Transkription oder DNA-Reparatur-Mechanismen weitere Folgen haben, die in reinen Proliferationsanalysen unentdeckt bleiben. Auch das konventionelle Verständnis des Zellzykluses, dass CDK 1, 2, 4, 6 allesamt für eine erfolgreiche Transition nötig sind, wurde durch neuere Ergebnisse in Frage gestellt. So zeigten Studien an Knock-out-Mäusen, dass Tiere ohne Gene für

CDK 2, CDK 3, CDK 4 und CDK 6 prinzipiell überlebensfähig sind. Nur CDK 1 war für den Zellzyklus unverzichtbar⁶⁸. Vielmehr scheint es der Fall zu sein, dass bestimmte CDKs für die Zellteilung einzelne Zelllinien von unterschiedlich großer Bedeutung sind, wie beispielsweise CDK 6 in hämatopoetischen Zellen und CDK 4 für Zellen des Pankreas⁷¹. Damit verbunden steht die Theorie im Raum, dass CDK 1 während der Embryogenese zur Zellteilung vollkommen ausreichend ist, ausgebildete Organismen jedoch zelltypspezifische Expressionen einzelner CDKs als zusätzlichen zellulären regulatorischen Mechanismus nutzen, um sowohl die Proliferation als auch weitere Zellfunktionen in einer Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen kontrollieren zu können⁶⁸. Damit können Inhibitoren der CDKs in unterschiedlichen Zelltypen verschiedenste Folgen haben. Besonders für PASMCs und andere Zellen der Gefäßwand ist es daher von Interesse, ob diese ebenfalls zellspezifische CDKs für bestimmte, teils auch für Zellzyklus-unspezifische Zellfunktionen nutzen. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Rolle der CDKs, Zyklone und CDKIs in den unterschiedlichen Zellen noch nicht abschließend aufgeklärt ist, um die Effekte einer Inhibition der CDKs vollumfänglich vorhersehen zu können.

4.4 Ausblick

Ausgehend von den vielversprechenden Daten der *in vitro* Versuche wurden in unserer Arbeitsgruppe in zwei unabhängigen Tiermodellen der PAH (Monocrotalin- und Su5416/Hypoxie-Rattenmodell) die Auswirkungen von Dinaciclib und Palbociclib auf den pathologischen Gefäßumbau und auf die rechtsventrikuläre Funktion untersucht⁶⁶. Im Monocrotalin (MCT)- Rattenmodell wurde den Tieren einmalig MCT injiziert. In den folgenden 21 Tage entwickelten die Tiere eine Symptomatik, die der klinischen PAH sehr nahekommt. Anschließend wurden Dinaciclib und Palbociclib intraperitoneal für 14 Tage appliziert. Aufgrund von Gewichtsverlust und schweren Nebeneffekten nach 3 Tagen der täglichen Verabreichung, musste die Gabe von Dinaciclib abgebrochen werden. Im Su5416/Hypoxie-Rattenmodell wurde vergleichbar zum MCT-Modell, Su5416 injiziert und die Tiere für 21 Tage unter Hypoxie gehalten mit anschließender Gabe von Palbociclib für 14 Tage unter normoxischen Bedingungen. In beiden Tiermodellen zeigten die Tiere unter Palbociclib einen signifikanten Abfall des pulmonal-vaskulären Widerstandes, des rechtsventrikulären systolischen Druckes und der rechtsventrikulären

Hypertrophie, mit einem insgesamt verbesserten kardialen Index im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Histologisch kam es zur Umkehr des Gefäßumbaus, gemessen an der reduzierten Dicke der Media und einem verminderten prozentualen Anteil der muskularisierten distalen pulmonalen Arterien. Im Su5416/Hypoxie-Rattenmodell zeigte die Behandlung auch einen antiproliferativen Effekt auf die Endothelzellen mit Reduzierung der Dicke der Neointima. Diese Befunde konnten mit einer insgesamt geringeren proliferativen Aktivität der Gefäßzellen (gemessen am PCNA-Proliferationsindex) assoziiert werden. Molekularbiologisch konnte dies wiederum mittels Protein- und mRNA-Analysen auf eine Suppression des CDK-RB-E2F-Signalweges zurückgeführt werden.

Bezüglich der Nebenwirkung war die Gabe von Dinaciclib im MCT-Tiermodell nicht tolerabel, was möglicherweise auf die *in vitro* beobachtete Apoptose-Induktion in höherer Dosierung in Kombination mit der Hepatotoxizität der MCT-Substanz zurückzuführen ist. Palbociclib wurde in beiden Tiermodellen ohne schwerwiegende Nebenwirkungen vertragen: Blutanalysen zeigten bis auf Anzeichen einer moderaten Myelosuppression keine ausgeprägten Zytopenien, die als mögliche Nebenwirkungen von Palbociclib bereits beschrieben wurden. Auch pathohistologische Untersuchungen der postmortal entnommenen Organe (Herz, Leber, Niere und Anteile des gastrointestinalen Traktes) zeigten keine Zeichen einer abnormalen Entzündung, Fibrose oder Nekrose im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Damit konnte in zwei unabhängigen Tiermodellen für Palbociclib die antiproliferative Wirkung bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen bestätigt werden. Durch Palbociclib ließ sich somit der pathologische Gefäßumbau in der experimentellen PAH reduzieren und der Druck im Gefäßsystem konnte gesenkt werden. Angesichts der Tatsache, dass Palbociclib bereits zugelassen ist und am Patienten eingesetzt wird, konnte somit womöglich ein erster Schritt einer neuen antiproliferativen Therapie zur Behandlung der PAH gemacht werden.

5 Zusammenfassung

Die pulmonale arterielle Hypertonie (PAH) ist eine fortschreitende Erkrankung des pulmonalen Gefäßsystems mit ungünstiger Prognose und eingeschränkten Therapiemöglichkeiten. Im Mittelpunkt steht u.a. ein struktureller Umbau der Gefäßwand, der zur Verengung des Lumens der distalen arteriellen Gefäße und letztendlich zum Rechtsherzversagen führt. Einen wichtigen Pathomechanismus stellt das übermäßige Wachstum der glatten Muskelzellen der Pulmonalarterien (PASMCs) dar. Während Dysregulierungen des Zellzykluses in Tumoren eine wichtige Rolle spielen und sich als Therapieansatz etabliert haben, wurden Parallelen im Proliferationsverhalten von Tumorzellen zu PASMCs bei PAH beschrieben. Auch für PASMCs ließen sich je nach Wachstumsverhalten pathologische Expressionsmuster der Zellzyklus-relevanten Proteine nachweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits humane Lungenhomogenisate auf ihre aberrante Zellzyklusexpressionen hin untersucht und andererseits die pharmazeutischen Zellzyklusinhibitoren, Dinaciclib und Palbociclib, die bereits in Tumorzelllinien erfolgreich eingesetzt wurden, an PASMCs getestet. Die zugrunde liegende Hypothese ist, dass dadurch die Proliferation der PASMCs unterbunden und somit der pathologische Umbau der Gefäßwand reduziert werden soll. Während sich in den Proteinanalysen der humanen Lungenhomogenisaten aufgrund hoher interindividueller Heterogenität kein eindeutiger Unterschied zeigen ließ, konnte die gezielte Inhibition der Zyklin-abhängigen-Kinasen (CDKs) zu einem Arrest des Zellzykluses und damit zur signifikanten Abnahme der exzessiven Proliferation führen. Dabei zeigten Proliferations-Studien eine Abnahme der Proliferation mit linearer Dosis-Wirkungs-Beziehung bereits im nano- bis mikromolaren Bereich. Durchflusszytometrische Messungen, sowie Protein- und mRNA-Analysen konnten den Mechanismus des Zellzyklusarrestes über Suppression der Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (RB-Protein) molekularbiologisch nachweisen. Die für antiproliferative Medikamente häufig beobachteten Nebenwirkungen, wie z.B. eine Apoptose-Induktion, konnten für beide Inhibitoren in den Proliferations-Tests, der Durchflusszytometrie und den Protein-Analysen nicht beobachtet werden. Damit konnte insgesamt ein umfassender *in vitro*-Datensatz erhoben werden, der einen Ausgangspunkt für weiterführende Studien bietet, mit dem Ziel der zukünftigen Nutzung von synthetischen Zellzyklusinhibitoren als neuen Ansatz zur Behandlung der PAH.

6 Summary

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease of the pulmonary vasculature, associated with poor prognosis and limited therapy options. Crucial for the development of the disease is a structural remodeling process of the vascular wall, which leads to obstruction of the lumen and eventually to right heart failure, due to elevated vascular resistance and pressure levels. An important role within this process is the excessive proliferation of the smooth muscle cells of the pulmonary artery (PASMCs). While it became clear that a dysregulation of proteins of the cell cycle contributes to the pathogenesis and serves as a therapeutic target in many different tumor types, several authors also described parallels between tumor cells and PASMCs in PAH concerning their uncontrolled proliferation behavior. Moreover, according to the literature, proliferation of PASMCs seems also tightly connected to different expression levels of proteins that regulate the cell cycle. In this work, at first human lung homogenates were screened for aberrant expression of cell cycle proteins. Secondly, the cell cycle inhibitors Dinaciclib and Palbociclib, which have been already successfully used in tumor cell lines, were tested for their antiproliferative potential in isolated PASMCs, to reduce the proliferation of PASMCs and thereby reverse the structural remodeling process. While the screening of the human lung homogenates displayed no significant difference due to high individual heterogeneity, inhibition of cyclin-dependent-kinases (CDKs) in isolated PASMCs lead to an arrest of the cell cycle, thereby causing a significant decline in proliferation. This could be demonstrated by proliferation assays which showed a decrease in cellular growth in a linear dose dependent manner within a nano- to micromolar range. Flow cytometry analysis, as well as protein and mRNA analyses, could demonstrate the anti-proliferative mode of action of both CDK inhibitors, namely the suppression of phosphorylation of the retinoblastoma protein (RB-protein) on a molecular level. Toxic side effects could not be detected for these drugs in their used concentration, judged from the absence of apoptosis induction in the proliferation assays, flow cytometry and protein analyses. General speaking, a comprehensive *in vitro* data set was generated, which offers a promising starting point for future tests *in vivo*. Especially concerning the predominant vasodilative nature of current therapies in PAH, inhibition of excessive PASMC proliferation might lead to a reversal of the pathological remodeling process of the vascular wall thereby providing a new therapeutic option in the therapy of PAH.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
5-HT	5-Hydroxytryptamin
BM	Smooth Muscle Cell basal medium
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type 2
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridin
CDK	Cyclin-dependent-kinase
cDNA	Komplementäre DNA
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CO	Cardiac output
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
Cpc-PH	Kombiniert prä- und postkapilläre pulmonale Hypertonie
CT	Threshold cycle
CTEPH	Chronisch thromboembolischen pulmonale Hypertonie
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPG	Diastolischer pulmonaler Druckgradient
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
ER	Östrogenrezeptorstatus
ET-1	Endothelin 1
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälberserum
GADH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM	Smooth muscle cell growth medium
h	Stunde
hEGF	Human epidermal growth factor
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Human immunodeficiency virus
IPAH	Idiopathische pulmonale arterielle Hypertonie
Ipc-PH	Isolierte postkapilläre pulmonale Hypertonie
kDa	Kilodalton
MCT	Monocrotalin
min	Minute
ml	Mililiter
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NTC	No templat control
o.g.	oben genannt
PAH	Pulmonale arterielle Hypertonie
PAP	Pulmonaler arterieller Druck

Abkürzungsverzeichnis

PASMC	<i>Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen</i>
PAWP	<i>Pulmonalkapillärer Verschlussdruck</i>
PDGF	<i>Platelet-derived-growth factor</i>
PGI ₂	<i>Prostaglandin I₂</i>
PH	<i>Pulmonale Hypertonie</i>
PPH	<i>Primäre pulmonale Hypertonie</i>
PVR	<i>Pulmonaler Gefäßwiderstand</i>
RB	<i>Retinoblastom-Protein</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RT-PCR	<i>Real-time polymerase-chain-reaction</i>
sec	<i>Sekunde</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
TBS	<i>Tris-Base-gepufferter Salzlösung</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
u.a.	<i>unter anderem</i>
UGMLC	<i>Lungenzentrums der Universitäten Gießen und Marburg</i>
WU	<i>Wood-Units</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
μ l	<i>Mikroliter</i>

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histomorphologische Merkmale der PAH..	5
Abbildung 2: Pathogenese der PAH	7
Abbildung 3: Überblick über den Zellzyklus.....	13
Abbildung 4: Wirkmechanismus endogener und synthetischer CDKIs	16
Abbildung 5: Arbeitshypothesen der Arbeit.....	17
Abbildung 6: Schemaabbildung zum experimentellen Aufbau der Zellkulturversuche	25
Abbildung 7: DNA-Gel-Elektrophorese zur Qualitätskontrolle der Primer	32
Abbildung 8: Darstellung der Versuchsabschnitte der Arbeit mittels Flussdiagramm.....	33
Abbildung 9: Analyse des Datensatzes Nr. 2 auf CDK 4 und CDK 6 im Vergleich von Donor zur PAH.....	35
Abbildung 10: Proteinanalyse aller Proben auf CDK 4 und CDK 6	37
Abbildung 11: Vergleich der repräsentativen Auswahl für CDK 4 und CDK6 von Donor zu PAH mit weiterer Analyse von CDK 2, p27 und Zyklin D3	38
Abbildung 12: Histologische Veränderungen von PASMCs 24 h nach Behandlung....	40
Abbildung 13: Messung der metabolischen Aktivität mittels XTT-Test.....	41
Abbildung 14: Messung der DNA-Synthese mittels BrdU-Test 24 h nach Behandlung	42
Abbildung 15: Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie 24 h nach Behandlung	43
Abbildung 16: Western Blot Analyse Zellzyklus- und Apoptose-relevanter Proteine..	45
Abbildung 17: RT-PCR Analyse der Zielgene CCNA2 und CDC2 des Transkriptionsfaktors E2F 24 h und 48 h nach Behandlung.....	48

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation der PH nach der erneuerten Version des Weltkongresses in Nizza, Frankreich, 2019	3
Tabelle 2: Vergleich charakteristischer Merkmale von Tumoren zur PAH	10
Tabelle 3: Wirkungsprofil von Dinaciclib und Palbociclib	15
Tabelle 4: Basen-Paar-Sequenz der genutzten Oligonukleotid-Primer	22
Tabelle 5: Patientenproben der Lungenhomogenisate mit Nummerierung	35
Tabelle 6: Klassifizierung der Western-Blot-Proben.....	37

10 Literaturangaben

1. Kovacs, G., Berghold, A., Scheidl, S. & Olschewski, H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects. A systematic review. *The European respiratory journal* **34**, 888–894; 10.1183/09031936.00145608 (2009).
2. Hoeper, M. M. *et al.* Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 50; 10.1016/j.jacc.2013.10.032 (2013).
3. Simonneau, G. *et al.* Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* **53**; 10.1183/13993003.01913-2018 (2019).
4. Vachiéry, J.-L. *et al.* Pulmonary hypertension due to left heart diseases. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 8; 10.1016/j.jacc.2013.10.033 (2013).
5. Montani, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet journal of rare diseases* **8**, 97; 10.1186/1750-1172-8-97 (2013).
6. Karch, S. B. *et al.* Aminorex associated with possible idiopathic pulmonary hypertension in a cocaine user. *Forensic science international* **240**, e7-10; 10.1016/j.forsciint.2014.03.028 (2014).
7. Guignabert, C. *et al.* Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* **22**, 543–551; 10.1183/09059180.00007513 (2013).
8. Galiè, N. *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *European heart journal* **37**, 67–119; 10.1093/eurheartj/ehv317 (2016).
9. D'Alonzo, G. E. *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Annals of internal medicine* **115**, 343–349 (1991).

10. McGoon, M. D. & Miller, D. P. REVEAL. A contemporary US pulmonary arterial hypertension registry. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* **21**, 8–18; 10.1183/09059180.00008211 (2012).
11. McLaughlin, V. V., Shah, S. J., Souza, R. & Humbert, M. Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **65**, 1976–1997; 10.1016/j.jacc.2015.03.540 (2015).
12. Dickinson, M. G., Bartelds, B., Borgdorff, M. A. J. & Berger, R. M. F. The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **305**, L1-14; 10.1152/ajplung.00031.2013 (2013).
13. Stacher, E. *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **186**, 261–272; 10.1164/rccm.201201-0164OC (2012).
14. Chin, K. M., Kim, N. H.S. & Rubin, L. J. The right ventricle in pulmonary hypertension. *Coronary Artery Disease* **16**, 13–18; 10.1097/00019501-200502000-00003 (2005).
15. Vonk-Noordegraaf, A. *et al.* Right Heart Adaptation to Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, D22-D33; 10.1016/j.jacc.2013.10.027 (2013).
16. Harrison, A., Hatton, N. & Ryan, J. J. The right ventricle under pressure: Evaluating the adaptive and maladaptive changes in the right ventricle in pulmonary arterial hypertension using echocardiography (2013 Grover Conference series). *Pulmonary Circulation* **5**, 29–47; 10.1086/679699 (2015).
17. Rain, S. *et al.* Pressure-overload-induced right heart failure. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*; 10.1007/s00424-014-1450-1 (2014).
18. Naeije, R. & Manes, A. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review* **23**, 476–487; 10.1183/09059180.00007414 (2014).
19. Ryan, J. J. *et al.* Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology* **31**, 391–406; 10.1016/j.cjca.2015.01.023 (2015).

20. Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R. & Grimminger, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nature reviews. Cardiology* **8**, 443–455; 10.1038/nrcardio.2011.87 (2011).
21. Wilkins, M. R. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society* **21**, 19–26; 10.1183/09059180.00008411 (2012).
22. Soubrier, F. *et al.* Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 21; 10.1016/j.jacc.2013.10.035 (2013).
23. Crosswhite, P. & Sun, Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **20**, 191–201; 10.2119/molmed.2013.00165 (2014).
24. Tuder, R. M. *et al.* Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 12; 10.1016/j.jacc.2013.10.025 (2013).
25. Rai, P. R. *et al.* The Cancer Paradigm of Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **178**, 558–564; 10.1164/rccm.200709-1369PP (2008).
26. Sakao, S. & Tatsumi, K. Vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension: multiple cancer-like pathways and possible treatment modalities. *International journal of cardiology* **147**, 4–12; 10.1016/j.ijcard.2010.07.003 (2011).
27. Voelkel, N. F. & Gomez-Arroyo, J. The role of vascular endothelial growth factor in pulmonary arterial hypertension. The angiogenesis paradox. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **51**, 474–484; 10.1165/rcmb.2014-0045TR (2014).
28. Schermuly, R. T. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 2811–2821; 10.1172/JCI24838 (2005).
29. Ghofrani, H. A. *et al.* Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension Patients with Inadequate Response to Established Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 1171–1177; 10.1164/rccm.201001-0123OC (2010).

30. Hoeper, M. M. *et al.* Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. Results of the Randomized IMPRES Study. *Circulation* **127**, 1128–1138; 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765 (2013).
31. Klein, M. *et al.* Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* **118**, 2081–2090; 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.779751 (2008).
32. Roskoski, R., JR. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacological research* **107**, 249–275; 10.1016/j.phrs.2016.03.012 (2016).
33. Lapenna, S. & Giordano, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature reviews. Drug discovery* **8**, 547–566; 10.1038/nrd2907 (2009).
34. Musgrove, E. A., Caldon, C. E., Barraclough, J., Stone, A. & Sutherland, R. L. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**, 558–572; 10.1038/nrc3090 (2011).
35. Chu, I. M., Hengst, L. & Slingerland, J. M. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **8**, 253–267; 10.1038/nrc2347 (2008).
36. Dueñas, E. M. de *et al.* Preclinical and clinical development of palbociclib and future perspectives. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*; 10.1007/s12094-018-1850-3 (2018).
37. Paruch, K. *et al.* Discovery of Dinaciclub (SCH 727965): A Potent and Selective Inhibitor of Cyclin-Dependent Kinases. *ACS medicinal chemistry letters* **1**, 204–208; 10.1021/ml100051d (2010).
38. Moharram, S. A. *et al.* Efficacy of the CDK inhibitor dinaciclub in vitro and in vivo in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer letters* **405**, 73–78; 10.1016/j.canlet.2017.07.019 (2017).
39. Parry, D. *et al.* Dinaciclub (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* **9**, 2344–2353; 10.1158/1535-7163.MCT-10-0324 (2010).

40. Martin, M. P., Olesen, S. H., Georg, G. I. & Schonbrunn, E. Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib interacts with the acetyl-lysine recognition site of bromodomains. *ACS chemical biology* **8**, 2360–2365; 10.1021/cb4003283 (2013).
41. Flynn, J. *et al.* Dinaciclib is a novel cyclin-dependent kinase inhibitor with significant clinical activity in relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **29**, 1524–1529; 10.1038/leu.2015.31 (2015).
42. Kumar, S. K. *et al.* Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* **125**, 443–448; 10.1182/blood-2014-05-573741 (2015).
43. Mita, M. M. *et al.* Randomized phase II trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus capecitabine in patients with advanced breast cancer. *Clinical breast cancer* **14**, 169–176; 10.1016/j.clbc.2013.10.016 (2014).
44. Stephenson, J. J. *et al.* Randomized phase 2 study of the cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib (MK-7965) versus erlotinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **83**, 219–223; 10.1016/j.lungcan.2013.11.020 (2014).
45. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular cancer therapeutics* **3**, 1427–1438 (2004).
46. Finn, R. S. *et al.* PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro. *Breast cancer research : BCR* **11**, R77; 10.1186/bcr2419 (2009).
47. Finn, R. S. *et al.* The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18). A randomised phase 2 study. *The Lancet Oncology* **16**, 25–35; 10.1016/S1470-2045(14)71159-3 (2015).
48. Turner, N. C. *et al.* Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine* **373**, 209–219; 10.1056/NEJMoa1505270 (2015).

49. Finn, R. S. *et al.* Palbociclib and Letrozole in Advanced Breast Cancer. *The New England journal of medicine* **375**, 1925–1936; 10.1056/NEJMoa1607303 (2016).
50. Collier, H. A. What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 667–670; 10.1038/nrm2223 (2007).
51. Ingham, M. & Schwartz, G. K. Cell-Cycle Therapeutics Come of Age. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **35**, 2949–2959; 10.1200/JCO.2016.69.0032 (2017).
52. Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols* **1**, 1458 EP -; 10.1038/nprot.2006.238 (2006).
53. Yu, L., Quinn, D. A., Garg, H. G. & Hales, C. A. Heparin inhibits pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through guanine nucleotide exchange factor-H1/RhoA/Rho kinase/p27. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **44**, 524–530; 10.1165/rcmb.2010-0145OC (2011).
54. Zuckerbraun, B. S. *et al.* Nitrite potently inhibits hypoxic and inflammatory pulmonary arterial hypertension and smooth muscle proliferation via xanthine oxidoreductase-dependent nitric oxide generation. *Circulation* **121**, 98–109; 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.891077 (2010).
55. Nemunaitis, J. J. *et al.* A first-in-human, phase 1, dose-escalation study of dinaciclib, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, administered weekly in subjects with advanced malignancies. *Journal of translational medicine* **11**, 259; 10.1186/1479-5876-11-259 (2013).
56. Kalra, S., Joshi, G., Munshi, A. & Kumar, R. Structural insights of cyclin dependent kinases: Implications in design of selective inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* **142**, 424–458; 10.1016/j.ejmech.2017.08.071 (2017).
57. Loukil, A. *et al.* Cyclin A2: At the crossroads of cell cycle and cell invasion. *World journal of biological chemistry* **6**, 346–350; 10.4331/wjbc.v6.i4.346 (2015).
58. Grant, J. S., White, K., MacLean, M. R. & Baker, A. H. MicroRNAs in pulmonary arterial remodeling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 4479–4494; 10.1007/s00018-013-1382-5 (2013).

59. Abbas, T. & Dutta, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nature reviews. Cancer* **9**, 400–414; 10.1038/nrc2657 (2009).
60. Romagosa, C. *et al.* p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* **30**, 2087–2097; 10.1038/onc.2010.614 (2011).
61. Fouty, B. W. *et al.* p27 Kip1 Is Important in Modulating Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**, 652–658; 10.1165/ajrcmb.25.5.4592 (2001).
62. Tanner, F. C. *et al.* Differential Effects of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors p27Kip1, p21Cip1, and p16Ink4 on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Circulation* **101**, 2022–2025; 10.1161/01.CIR.101.17.2022 (2000).
63. Yu, L., Quinn, D. A., Garg, H. G. & Hales, C. A. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, but not p21WAF1/Cip1, is required for inhibition of hypoxia-induced pulmonary hypertension and remodeling by heparin in mice. *Circulation research* **97**, 937–945; 10.1161/01.RES.0000188211.83193.1a (2005).
64. Pullamsetti, S. S. *et al.* Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* **185**, 409–419; 10.1164/rccm.201106-1093OC (2012).
65. Franks, T. J. *et al.* Resident cellular components of the human lung: current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 763–766; 10.1513/pats.200803-025HR (2008).
66. Weiss, A. *et al.* Targeting cyclin-dependent kinases for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nature communications* **10**, 2204; 10.1038/s41467-019-10135-x (2019).
67. Ghia, P. *et al.* Efficacy and safety of dinaciclib vs ofatumumab in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* **129**, 1876–1878; 10.1182/blood-2016-10-748210 (2017).
68. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer* **9**, 153–166; 10.1038/nrc2602 (2009).
69. Bacon, C. W. & D'Orso, I. CDK9: a signaling hub for transcriptional control. *Transcription* **10**, 57–75; 10.1080/21541264.2018.1523668 (2019).

70. Szulcek, R. *et al.* Delayed Microvascular Shear Adaptation in Pulmonary Arterial Hypertension. Role of Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Cleavage. *American journal of respiratory and critical care medicine* **193**, 1410–1420; 10.1164/rccm.201506-1231OC (2016).
71. Bendris, N., Lemmers, B. & Blanchard, J. M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **14**, 1786–1798; 10.1080/15384101.2014.998085 (2015).
72. Lim, S. & Kaldis, P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development (Cambridge, England)* **140**, 3079–3093; 10.1242/dev.091744 (2013).
73. Besson, A., Dowdy, S. F. & Roberts, J. M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Developmental cell* **14**, 159–169; 10.1016/j.devcel.2008.01.013 (2008).
74. Yu, D. S. *et al.* Cyclin-dependent kinase 9-cyclin K functions in the replication stress response. *EMBO reports* **11**, 876–882; 10.1038/embor.2010.153 (2010).

11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

12 Veröffentlichungen der Arbeit

Publikation

Teile dieser Arbeit wurde in folgender Arbeit veröffentlicht:

Targeting cyclin-dependent kinases for the treatment of pulmonary arterial hypertension

Astrid Weiss*, Moritz Christian Neubauer*, Dinesh Yerabolu, Baktybek Kojonazarov, Beate Schlueter, Lavinia Maegel, Danny Jonigk, Clemens Ruppert, Norbert Weissmann, Ardeschir Ghofrani, Friedrich Grimminger, Werner Seeger, Ralph Theo Schermuly.

Nature Communications | (2019) 10:2204 | <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10135-x> |

Kongressbeiträge

Die Arbeit wurde als Poster auf folgenden Kongressen präsentiert:

- Jährlichen Treffen des Deutschen Zentrums für Lungenforschung (DZL), Hamburg 26.01. – 27.01.2015
- Forschungsworkshop Pulmonale Hypertonie, Bayer, Berlin 27.02. – 28.02.2015
- ECCPS Retreat, Bad Nauheim 18.06. – 19.06.2015

Preise

Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen der o.g. Publikation mit dem

- Forschungspreis 2019 der René-Baumgart-Stiftung

am 60. Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin e.V. in München geehrt.

* Geteilte Erstautorenschaft

13 Danksagungen

Bei allen, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich hier ganz herzlich bedanken:

Herrn Prof. Dr. Ralph Schermuly danke ich sowohl für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe als auch für die fachkundige Betreuung meiner Arbeit und den damit verbundenen Möglichkeiten, wie der Vorstellung der Ergebnisse auf mehreren Kongressen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Astrid Weiß, die die Fragestellung entwarf, mir wissenschaftliches Arbeiten, sowie molekularbiologische Methoden lehrte und mir mit scheinbar unermüdlichem Rat und Unterstützung allzeit zur Seite stand.

Auch den technischen Assistenten Frau Kerstin Gernert, Elena Jenike, Frau Mona Höret und Frau Ewa Bieniek möchte ich ausdrücklich für ihre stetige Unterstützung beim Erlernen und Durchführen verschiedenster Labortechniken und Hilfestellung beim allgemeinen Arbeiten im Labor bedanken. Ganz besonders Frau Kerstin Gernert, von der ich gerade in der Anfangszeit viel lernen konnte.

Auch den weiteren, teils ehemaligen, Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe im BFS, Herrn Dr. Mario Böhm und Frau Dr. Svenja Tiede möchte ich meinen Dank aussprechen, die mir mit ihrer großen Erfahrung oft aushalfen.

Sehr bereichernd empfand ich den Austausch mit Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Professor Günther, von denen ich besonders Frau Dr. Martina Korfei und Herrn Dr. Clemens Ruppert für ihre fachliche und persönliche Unterstützung danken möchten.

Insgesamt empfand ich den wissenschaftlichen Austausch mit den weiteren Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe im wöchentlichen Labmeeting sehr anregend und möchte ihnen auch ausdrücklich dafür danken.

Nicht zuletzt gelten meiner Familie und Freunde ein besonderer Dank, die mir immer eine unverzichtbare Unterstützung waren und mir zu jeder Zeit meiner Ausbildung uneingeschränkten Rückhalt boten.

Dem hessischen Forschungsförderungsprogramm LOEWE und der Studienstiftung des Deutschen Volkes möchte ich für die finanzielle Unterstützung bedanken.

14 Tabellarischer Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.