

Die Rolle von Axl und Gas6 bei der pulmonalen Hypertonie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Nadine Kühn, geb. Presser

aus Salzgitter

Gießen 2021

Aus dem Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Direktor: Prof. Dr. W. Seeger

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: Prof. Dr. Hölschermann

Tag der Disputation: 27. Januar 2021

Für Anneliese

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	4
1.1. Pulmonale Hypertonie	4
1.1.1. Pulmonal arterielle Hypertonie	6
1.2. Tyrosinkinasen und Tyrosinkinase-Inhibitoren	8
1.2.1. PAH als karzinomähnliche Erkrankung.....	9
1.3. Die TAM-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie und ihre Liganden	10
1.3.1. Die Rezeptor-Tyrosinkinase Axl.....	11
1.4. Fragestellung und Zielsetzung.....	16
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Material	18
2.1.1. Chemikalien, Lösungen und weitere Reagenzien.....	18
2.1.2. Kits	20
2.1.3. Antikörper	20
2.1.4. Primer.....	22
2.1.5. Geräte	22
2.1.6. Sonstige Materialien.....	24
2.2. Methoden.....	27
2.2.1. Tiermodell	27
2.2.2. Zellkulturexperimente.....	28
2.2.3. RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR.....	32
2.2.4. Proteinisolation und Western Blot.....	36
2.2.5. Proliferations- und Zellviabilitätsassay	42

2.2.6. Immunfluoreszenz mit Ki-67.....	44
2.2.7. Statistik.....	46
3. Ergebnisse	47
3.1. Axl- und Gas6-Expression im Monocrotalin-Rattenmodell	47
3.1.1. Histologische Untersuchung der Rattenlunge.....	47
3.1.2. Proteinexpression in Lungenhomogenaten.....	48
3.1.3. Proteinexpression in Ratten-PASMC	49
3.2. Axl- und Gas6-Expression in humanen PASMC	50
3.2.1. mRNA-Expression.....	50
3.2.2. Proteinexpression	50
3.3. Proliferation der humanen PASMC.....	51
3.3.1. Effekt von R428 auf die Proliferation und Zellviabilität.....	52
3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67	54
3.3.4. Effekt von Gas6 auf die Proliferation und Zellviabilität.....	56
4. Diskussion.....	57
4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	58
4.2. Diskussion der Methoden	58
4.2.1. Die Monocrotalin-induzierte PH der Ratte und Vergleichbarkeit zur PAH des Menschen.....	58
4.2.2. Untersuchung von SMC	62
4.2.3. Inhibierung von Axl durch R428	62
4.2.4. Verwendung von PDGF neben und anstelle von GM	63
4.2.5. Methoden zur Untersuchung der Proliferation	64

4.3. Diskussion der Ergebnisse	64
4.3.1. Die Rolle von Gas6 und Axl in der MCT-Ratte und in IPAH-Patienten	64
4.3.2. R428 nicht aber Gas6 beeinflusst die Proliferation und Zellviabilität konzentrationsabhängig	65
4.4. Fazit und Ausblick.....	67
4.4.1. Anregungen für weitere Untersuchungen in Bezug auf Gas6/Axl und R428	67
4.4.2. Axl-Inhibitoren als kurative oder supportive Therapeutika bei PH	68
Zusammenfassung.....	69
Summary	70
Abkürzungsverzeichnis	71
Abbildungsverzeichnis.....	74
Tabellenverzeichnis.....	75
Literaturverzeichnis	77
Erklärung.....	102
Danksagung	103

1. Einleitung

1.1. Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine progrediente Erkrankung unterschiedlicher Genese, die mit einer schlechten Langzeitprognose assoziiert ist und zu rechtsventrikulärer Dysfunktion führt ^[1]. Häodynamisch ist sie definiert als Erhöhung des mittleren pulmonal arteriellen Drucks (mPAP) größer gleich (\geq) 25 mm Hg in Ruhe, der während einer Rechtsherzkatheteruntersuchung gemessen wird. Der Normalwert des mPAP liegt bei 14 ± 3 mm Hg, wobei 20 mm Hg die obere Normgrenze ist. Ein Graubereich liegt zwischen 21 und 24 mm Hg. Der Begriff der belastungsinduzierten PH wird derzeit nicht geführt ^[2-4].

Die Prävalenz der PH liegt weltweit bei etwa 1%. Bei den über 65-Jährigen bereits bei etwa 10%; Häufigste Ursachen sind hier Linksherzkrankungen sowie chronisch obstruktive, bzw. fibrosierende Lungenerkrankungen ^[5]. Für die verschiedenen Formen der PH (siehe Tabelle 1, nach ^[4,6]) sind Inzidenz und Prävalenz jedoch stark unterschiedlich: So lag die Inzidenz der pulmonal arteriellen Hypertonie (PAH) 2014 in Deutschland bei 3,9 Neuerkrankungen pro eine Millionen Einwohner, die Prävalenz bei 25,9 pro eine Millionen Einwohner ^[7]. Die Inzidenz für die chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH) lag im selben Jahr bei vier pro eine Millionen Einwohner. 80% der Patienten mit PAH leben in Entwicklungsländern, in denen die Erkrankung häufig mit Infektionen mit dem Humanen Immundefizienz-Virus, Schistosomiasis und rheumatischem Fieber assoziiert ist (Gruppe 1.4, siehe Tabelle 1). Diese Form der PAH tritt am häufigsten bei Patienten auf, die jünger als 65 Jahre alt sind ^[5].

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2013)

Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (Nizza, 2013)
1. Pulmonal arterielle Hypertonie
1.1 Idiopathische PAH
1.2 Hereditäre PAH
1.2.1 BMPR2-Mutationen
1.2.2 Sonstige Mutationen
1.3 Durch Medikamente oder Toxine verursacht
1.4 Assoziiert mit
1.4.1 Bindegewebserkrankungen
1.4.2 Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus
1.4.3 Portaler Hypertension
1.4.4 Angeborenen Herzfehlern
1.4.5 Schistosomiasis

1'. Pulmonale veno-okklusive Erkrankung und/oder pulmonale kapillare Hämangiomatose
1'". Persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
2. Pulmonale Hypertonie infolge von Linksherzerkrankungen
2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion 2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion 2.3 Valvuläre Erkrankungen 2.4 Angeborene/erworbene Linksherz-Einfluss-/Ausflusstrakt-Obstruktionen und angeborene Kardiomyopathien 2.5 Angeborene/erworbene Pulmonalvenenstenose
3. Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie
3.1 Chronisch obstruktive Lungenerkrankung 3.2 Interstitielle Lungenerkrankung 3.3 Andere pulmonale Erkrankungen mit gemischter restriktiver und obstruktiver Struktur 3.4 Schlafapnoe-Syndrom 3.5 Alveoläre Hypoventilation 3.6 Chronische Höhenkrankheit 3.7 Anlagebedingte Lungenerkrankungen
4. Chronisch thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren und/oder multifaktoriellen Mechanismen
5.1 Hämatologische Störungen: Chronische hämolytische Anämie, myeloproliferative Störungen, Splenektomie 5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose 5.3 Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkrankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenstörungen 5.4 Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosierende Mediastinitis, chronisches Nierenversagen unter Dialyse, segmentale pulmonale Hypertonie
<i>BMPR2 = Knochenmorphogenetisches Protein Rezeptor Typ 2 (engl. bone morphogenetic protein receptor type 2), modifiziert nach Galiè et al., 2016 und Simonneau et al., 2013 [4,6].</i>

„Die körperliche Untersuchung ist bei Patienten mit kompensierter pulmonaler Hypertonie oft unauffällig. Die häufigsten, zum Teil subtilen Zeichen sind eine periphere oder zentrale Zyanose (oft ausschliesslich beziehungsweise verstärkt unter Belastung), eine betonte Pulmonaliskomponente des 2. Herztons sowie ein systolisches Strömungsgeräusch mit Punctum maximum links parasternal bei einer Trikuspidalklappeninsuffizienz.“ [8]. Wichtigstes nicht-invasives Diagnostikum ist die Echokardiographie. Hier zeigt sich die Rechtsherzbelastung durch rechtsventrikuläre Hypertrophie und Dilatation. Die endgültige Diagnose kann allerdings nur durch eine invasive Rechtsherzkatheteruntersuchung gestellt werden. Diese ist bei Patienten mit vermuteter PAH oder CTEPH obligat, bei Patienten mit PH infolge von Linksherzerkrankungen jedoch in der Regel nicht indiziert [8].

Therapeutische Allgemeinmaßnahmen sind Sauerstoffgabe, Anämie-Therapie, sowie Influenza- und Pneumokokken-Impfung [9]. Rehabilitation und Physiotherapie mit

mäßigem körperlichem Training verbessern die körperliche Belastbarkeit, kardiopulmonale Funktion und Parameter, sowie die Lebensqualität der Patienten ^[10]. Auf die medikamentöse Therapie der PAH wird noch im Folgenden eingegangen.

1.1.1. Pulmonal arterielle Hypertonie

Die PAH gehört zur ersten Gruppe der PH (siehe Tabelle 1). Sie ist eine präkapilläre PH, bei der zusätzlich zur Erhöhung des mittleren pulmonal arteriellen Drucks ≥ 25 mm Hg in Ruhe, ein endexpiratorisch pulmonal-kapillärer Verschlussdruck kleiner gleich (\leq) 15 mm Hg und ein pulmonal vaskulärer Widerstand von mehr als 3,0 Wood Einheiten (mm Hg/l*min) vorliegen ^[3,4].

Pathohistologisch ist die PAH charakterisiert durch exzessive pulmonale Vasokonstriktion und abnormales vaskuläres Remodeling in allen Gefäßwandschichten. Es kommt zu Inflammation, Intimafibrose und in situ-Thrombose ^[11,12]. Betroffen sind vor allem die kleinen Arterien und Arteriolen ^[13]. Durch die Umbauprozesse obliteriert das Lumen mancher Gefäße und es bilden sich komplexe vaskuläre Läsionen, auch plexiforme Läsionen genannt ^[1]. Die Intima fibrosiert also exzentrisch und konzentrisch; Zusätzlich lassen sich eine Mediahypertrophie und eine Verdickung der Adventitia mit perivaskulärer inflammatorischer Infiltration beobachten ^[13]. Dies führt letztendlich zu einem erhöhten pulmonalen Gefäßwiderstand und pulmonalarteriellen Druck und dadurch zu einer vergrößerten rechtsventrikulären Nachlast ^[11].

Kennzeichnend ist ein Missverhältnis zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren. So wird eine verminderte Freisetzung von Prostacyclin beschrieben ^[14]. Dieses wirkt sowohl vasodilatierend, als auch hemmend auf die Thrombozytenaggregation. Weiterhin vermindert sind das vasodilatierende und antiproliferative Stickstoffmonoxid (NO), sowie sein Second Messenger cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) ^[1]. Gleichzeitig werden erhöhte Level von Thromboxan und Endothelin-1 beschrieben ^[14,15]. Beide wirken hoch vasokonstriktiv, Endothelin-1 wirkt zusätzlich mitogen auf glatte Muskelzellen (VSMC).

Die idiopathische PAH (IPAH) unterscheidet sich von den anderen Untergruppen der PAH dadurch, dass für sie keine spezifische Ursache im Sinne einer Genmutation, eines Triggers oder einer Beteiligung von Herz- und/oder Lungenerkrankungen bekannt ist. Sie ist eine Ausschlussdiagnose ^[13]. Für die Entstehung der hereditären PAH sind mehrere genetische Komponenten bekannt. Heterozygote Mutationen des Knochenmorphogenetischen Protein Rezeptors Typ 2 (engl. *bone morphogenetic protein receptor type 2*, BMPR2) sind der häufigste Grund für die hereditäre PAH und

für rund 75% der Fälle verantwortlich, trotz einer Penetranz von lediglich 20% [16,17]. Ebenfalls weisen 20% der Patienten mit IPAH eine BMPR2-Mutation auf [18,19]. Auch Mutationen der Activin A Rezeptor ähnlichen Kinase Typ 1 (engl. *Activin A receptor-like kinase 1*, ALK1) und zu einem geringeren Teil von Endoglin verursachen die mit der hereditären hämorrhagischen Teleangiektasie assoziierten PAH [20]. Eine untergeordnete Rolle spielen Varianten im Gen für Caveolin-1 (CAV1), Mitglied 3 der Kaliumkanal Unterfamilie K (engl. *Potassium channel subfamily K member 3*, KCNK3) und die eukaryotische Translationsinitiations Faktor-2 alpha Kinase-4 (engl. *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4*, EIF2AK4) [21–23]. Einige dieser Gene kodieren für Rezeptoren, die zur transformierenden Wachstumsfaktor β (engl. *Transforming growth factor beta receptors*, TGF- β) Superfamilie gehören, die circa 5% der Patienten mit hereditärer PAH ausmachen [6]. Eine PAH kann auch durch Einnahme bestimmter Medikamente, Drogen oder Toxine ausgelöst werden. In definitivem Zusammenhang stehen hier Substanzen wie Amiorex, Fenfluramin oder Dexfenfluramin, allesamt Appetitzügler, weiterhin der Lipidsenker Benfluorex, aber auch selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer. Mögliche Zusammenhänge werden beschrieben für Amphetamine, Cocain, bestimmte Chemotherapeutika, echtes Johanniskraut und Interferon α und β [4,6]. Bestimmte Grunderkrankungen wie das Vorliegen von Bindegewebserkrankungen (beispielsweise Sklerodermie), eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus, eine portale Hypertension, angeborene Herzfehler, eine Schistosomiasis und chronisch hämolytische Anämien können ebenfalls zu PAH führen [6].

„Eine neu diagnostizierte pulmonal arterielle Hypertonie sollte rasch und gezielt behandelt werden“ [8]. Während der diagnostischen Rechtsherzkatheteruntersuchung wird ein Vasoreagibilitätstest vorgenommen. Als sogenannte Responder identifizierte Patienten können mit hochdosierten Kalziumantagonisten behandelt werden [24,25]. Zum Einsatz kommen hier Nifedipin, Amlodipin oder Diltiazem. Ziel der Therapie ist eine Stabilisierung der Krankheit ohne Synkopen oder Zeichen der Rechtsherzbelastung und ohne Progression [8]. Bei negativem Vasoreagibilitätstest, kommen andere Therapeutika in Betracht. Zur Verfügung stehen Wirkstoffe, die durch Kenntniss und Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen entwickelt wurden und hier angreifen. Beeinflusst werden der Endothelin-, NO/cGMP- und der Prostacyclin-Pfad. Ambrisentan, Bosentan und Macitentan sind Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und verbessern die körperliche Leistungsfähigkeit und Belastbarkeit, sowie hämodynamische Parameter [15,26–31]. Eine Hemmung der Phosphodiesterase 5 (PDE5) führt über den NO/cGMP-Pfad zu einer Vasodilatation und wirkt zusätzlich antiproliferativ [32,33]. Zur Verfügung stehen

hier Sildenafil, Tadalafil und Vardenafil. Riociguat ist ein Wirkstoff, der die lösliche Guanylatcyklase stimuliert und so die cGMP-Produktion erhöht. Er verbessert klinisch die körperliche Leistungsfähigkeit und Belastbarkeit [34]. Beraprost, Epoprostenol, Iloprost und Treprostinil sind Prostacyclinanaloga und steigern die körperliche Leistungsfähigkeit und Belastbarkeit [35,36], sowie teilweise hämodynamische Parameter und Allgemeinsymptome [37–39]. Initial werden Mono-, Kombinations- oder Dreifachtherapien eingeleitet und die Medikation je nach Symptomatik des Patienten erweitert bzw. angepasst [8]. Keine der verfügbaren Therapien ist jedoch derzeit in der Lage, die PAH zu heilen. Bei therapierefraktärem Verlauf bleibt die Ultima ratio der Lungentransplantation.

1.2. Tyrosinkinasen und Tyrosinkinase-Inhibitoren

Tyrosinkinasen (TK) sind Proteinkinasen, die Tyrosinseitenketten von Proteinen unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung wird die Aktivität bestimmter Proteine beeinflusst, wodurch TK ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion in Zellen sind. Man unterscheidet transmembranäre von zytosolischen TK. Transmembranäre TK haben Rezeptorfunktionen und heißen deshalb auch Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) [40]. Während die intrazelluläre Domäne der RTK charakterisiert ist durch eine konservierte TK, unterscheiden sich die extrazellulären Domänen zum Teil stark voneinander. Anhand dieser extrazellulären Domänen und anhand ihrer funktionellen Eigenschaften werden die RTK in verschiedene Subfamilien eingeteilt [41]. Es existieren insgesamt 58 RTK, die in 20 Subfamilien eingeteilt werden können [42]. „Im Unterschied zu [RTK] folgt nach Ligandenbindung an eine Rezeptor-Serin/Threoninkinase [(RSTK)] die Phosphorylierung von Serin- und Threoninseitenketten von Signalproteinen.“ [41].

Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) sind Substanzen, die die Aktivierung von Tyrosinkinasen (TK) hemmen. Sie sind bekannt durch Anwendung in der Krebstherapie und werden hier erfolgreich eingesetzt. Bereits zur Standardtherapie sind TKI beispielsweise bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML) geworden [43].

Wachstumsfaktoren sind Zytokine, die die Zelldifferenzierung und -proliferation steuern, aber auch großen Einfluss auf Migration und Apoptoseresistenz haben^[1,44]. Sie docken an und aktivieren RTK, bzw. RSTK, um Signalkaskaden in Gang zu setzen [44]. Außerdem wirken sie mitogen und als chemische Lockstoffe für vaskuläre Zellen wie VSMC, Fibroblasten und Endothelzellen [1]. Auch in der PAH spielen einige Wachstumsfaktoren eine große Rolle. So sind die Einflüsse bzw. Hochregulationen von

Vascular endothelial growth factor (VEGF) [45,46], Platelet-derived growth factor (PDGF) [47–49], Basic fibroblast growth factor (bFGF) [50] und Transforming growth factor β (TGF- β) [51] bzw. ihren Rezeptoren auf die PAH beobachtet und beschrieben [1].

1.2.1. PAH als karzinomähnliche Erkrankung

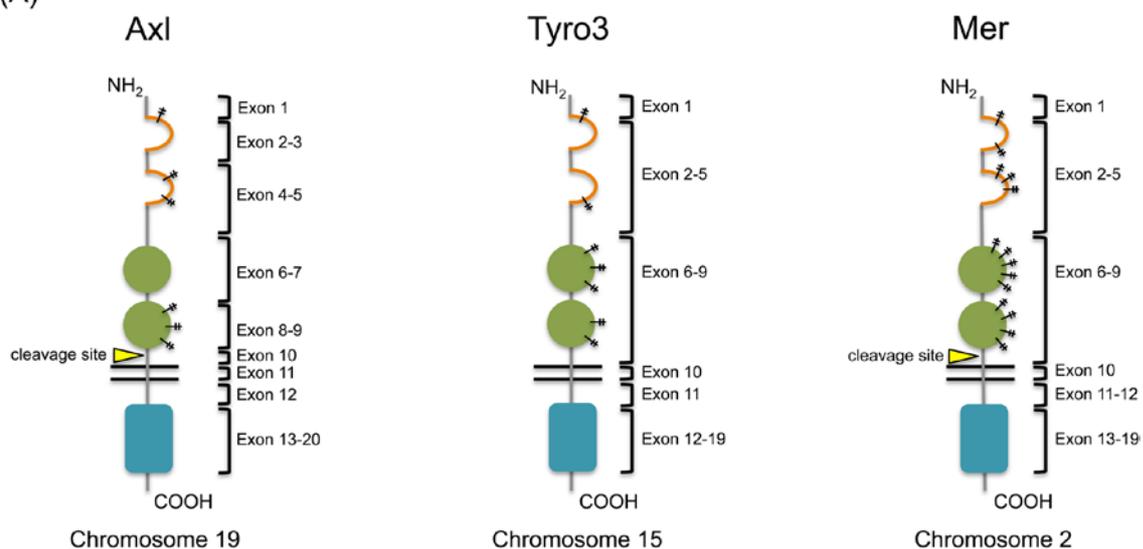
Die Pathophysiologie der PAH und die von Karzinomkrankungen teilen einige bezeichnende Merkmale. 1924 beobachtete Otto Warburg, dass eine Veränderung im Glukosemetabolismus einer Zelle von der aeroben Glykolyse im Mitochondrium hin zur anaeroben Glykolyse im Zytosol, trotz adäquater Sauerstoffversorgung eine zentrale Rolle im Wachstum von Krebszellen spielt [1,52]. Auch in kultivierten humanen IPAH-Zellen wird eine vermehrte anaerobe Glykolyse (statt der mitochondrialen Verstoffwechslung) beobachtet [53]. Der PDGF-Rezeptor ist in einigen Karzinomen hochreguliert und konstitutiv aktiviert [54–59]. Erhöhte Level zeigten sich auch in Lungenbiopsieproben von Patienten mit schwerer PAH [47]. In humanen PAH-Lungen, exprimieren Endothelzellen und VSMC vermehrt den Hypoxie-induzierten Faktor 1- α (HIF-1 α) [60,61], welcher in Karzinomgewebe überexprimiert wird und zusammen mit VEGF für die *de novo*-Angiogenese verantwortlich ist [62]. Auch wird das apoptosehemmende Protein survivin in Pulmonalarterienzellen von PAH-Patienten gefunden, wohingegen dieses Protein bei gesunden Proben nicht vorhanden ist [63]. Die Zellen, die das Gen survivin exprimieren, waren in der Tunica media, sowie in der Neointima lokalisiert und exprimierten überwiegend smooth muscle actin, aber auch von Willebrand Faktor (vWF), was vermuten lässt, dass es sich um VSMC und Endothelzellen handelte [63]. Diese Erkenntnisse begünstigen die Entstehung eines apoptoseresistenten Phänotypen, der auch charakteristisch für neoplastische Prozesse ist [11,63–65]. Eine weitere Gemeinsamkeit von Karzinomen und der PAH ist der pro-proliferative Charakter. Für die PAH ist vor allem die Proliferation von VSMC [66,67] und Endothelzellen [68] gut beschrieben. Die Endothelzellen der plexiformen Läsionen proliferieren sogar monoklonal [65] und exprimieren wie Karzinome [62] vermehrt VEGF und den VEGF-Rezeptor 2 [45,46]. Sie sind Teil der in der PAH stattfindenden gestörten Angiogenese in den plexiformen Läsionen [46,69]. Auch Karzinome brauchen für ihr Wachstum, die Nährstoffversorgung und den Abtransport von Stoffwechselprodukten eine gute Gefäßversorgung, die durch die Induktion der Angiogenese gewährleistet wird [70]. Teil des vaskulären Remodellings der PAH ist neben der Proliferation auch die Migration von vaskulären Zellen wie VSMC, Endothelzellen und Fibroblasten, die durch Wachstumsfaktoren und Aktivierung der oben genannten Tyrosinkinase-Rezeptoren hervorgerufen wird [1]. Auch für die Entstehung von Metastasen ist die Fähigkeit zur

Migration und Invasion der Karzinomzellen essentiell [71,72]. Es findet ein sogenannter angiogenetischer Wechsel (engl. *angiogenic switch*) statt, sodass kontinuierlich neue Blutgefäße aus an sich ruhenden Gefäßsystemen sprießen [70,73]. Im Ganzen lassen sich für die PAH und Karzinomerkrankungen folgende Gemeinsamkeiten zusammenfassen: Eine erhöhte Proliferationsrate, auch unter veränderten Bedingungen wie Hypoxie, sowie die Apoptoseresistenz, Angiogenese, die Fähigkeit zur Migration bzw. Invasion und weitere metabolische (glykolytische) Veränderungen. Die Antikrebs-Therapie stellt also einen attraktiven Therapiezweig für die PAH dar [74].

1.3. Die TAM-Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie und ihre Liganden

Die TAM-Rezeptor-TK-Familie hat drei Mitglieder: Tyro3, Axl und Mer, deren verbindendes Merkmal die einzigartige extrazelluläre Domäne und die gemeinsamen Liganden Gas6 und Protein S sind (siehe Abbildung 1). Axl wurde 1988 als erstes isoliert und erhielt 1991 seinen Namen nach dem griechischen Wort „anexelekto“ für „unkontrolliert“ [75,76]. 1994 folgte die Isolierung von Tyro3 (damals Sky) und Mer [77,78]. Die ähnlichen Extrazellulärdomänen bestehen aus zwei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen und zwei Fibronektin III (FNIII)- Domänen. Von Axl und Mer existieren lösliche Fragmente, die durch Proteasenspaltung an den markierten Stellen (cleavage site, siehe Abbildung 1) entstehen.

(A)



(B)

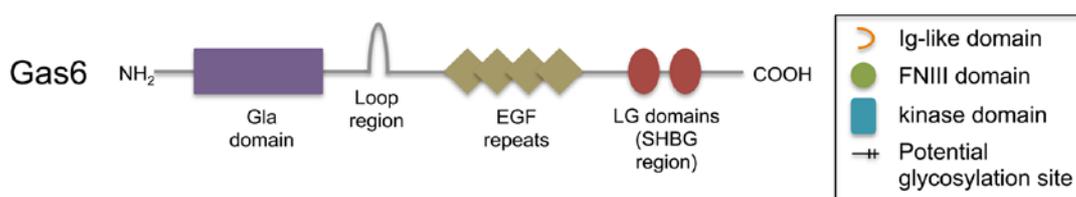


Abbildung 1: Aufbau der TAM-Rezeptoren und ihres Liganden Gas6. (A) **Aufbau von Axl, Tyro3 und Mer.** (B) **Darstellung des Liganden Gas6.** Aus Axelrod, 2014 ^[79], Figure 1. Mit freundlicher Genehmigung durch K. Pienta, 24.03.2017.

Legende: Ig-like domain = Immunglobulin-ähnliche Domäne, FNIII-domain = Fibronectin III-Domäne, Gla domain = Gamma-Carboxyglutamat-Domäne, EGF repeats = Epidermal Growth factor-Wiederholungen, LG domains = Laminin G-Domäne, SHBG region = Sex-Hormon bindende Globulin Struktur.

1988 wurde Gas6 – growth arrested specific gene 6 – als eines von diversen hochregulierten Genen aus Fibroblasten isoliert, die unter Basalmedium einen Wachstumarrest zeigten ^[80]. Das Plasmaprotein S ist ein Antikoagulator und Kofaktor des aktivierten Protein C ^[81]. Gas6 und Protein S teilen mehr als 40% ihrer Proteinstruktur ^[82] und sind ähnlich im Aufbau: Am N-Terminus finden sich in beiden Proteinen elf Gamma-Carboxyglutamat (Gla)-Domänen, gefolgt von einer Loop-Region, vier Epidermal Growth factor (EGF)-ähnlichen Wiederholungen und einer Sex-Hormon bindenden Globulin (SHGB)-ähnlichen Struktur am C-Terminus, die aus zwei Laminin G (LG)-ähnlichen Domänen besteht ^[83]. Die LG-ähnliche Domäne bindet an der Ig-ähnlichen Domäne der Rezeptoren. An der Gla-Domäne werden Gas6 und Protein S Vitamin K-abhängig carboxyliert, wodurch sie ihre Aktivität erlangen. Die Gla-Domäne ermöglicht den Zellmembrankontakt ^[84]. Die Plasmakonzentration der Proteine stellt einen wesentlichen Unterschied zwischen Gas6 und Protein S dar. Während Gas6 mit ungefähr 0,2nM und an der löslichen Form von Axl gebunden zirkuliert, hat Protein S eine tausendfach höhere Konzentration und ist zu 60-70% an das Komplementsystem regulierende C4b-Bindungsprotein gebunden ^[85–87]. Gas6 kann an alle drei Rezeptoren binden; Protein S nur an Tyro3 und Mer. Dieses ist vermutlich zurückzuführen auf die ungleiche Verteilung geladener Reste bei Protein S und Gas6. Diese spezifische Verteilung bei Gas6 bildet die größte Kontaktfläche zwischen Gas6 und Axl ^[83]. Gas6 hat für Axl die größte Affinität unter den drei Rezeptoren. Der Haupt- und Nebenkontakt von Gas6 und Axl wird gebildet durch die LG-ähnlichen Domänen von Gas6 und der Ig-ähnlichen Domänen von Axl ^[79].

1.3.1. Die Rezeptor-Tyrosinkinase Axl

Erstmals isoliert wurde das Gen Axl bei der CML ^[76] und ist seitdem bekannt dafür eine entscheidende Rolle bei der Progression von Karzinomen zu spielen ^[79]. Die RTK Axl hat ein Gewicht zwischen 120 und 140kDa, je nach partieller oder vollständiger Glykosylierung (siehe Abbildung 1). Durch alternatives Splicing gibt es kurze und lange Isoformen, wobei die lange Isoform die häufigste ist ^[75]. Für die Aktivierung von Axl sind verschiedene Mechanismen bekannt. So ist die Liganden-abhängige Aktivierung durch Gas6 und anschließende Homodimerisierung mit Autophosphorylierung der

Tyrosinreste an der intrazellulären Kinasendomäne unter physiologischen Bedingungen am häufigsten. Bisweilen sind drei Autophosphorylierungsstellen bekannt, deren jeweilige Bindungspartner in Tabelle 2 dargestellt sind. In pathologischen Konditionen findet vermehrt eine Liganden-unabhängige Aktivierung statt. Diese beinhaltet Homodimerisierung von Axl bei Überexpression [88], homophile Bindung zweier Axl-Extrazellulärdomänen benachbarter Zellen mit nachfolgender Zellaggregation [89] und Heterodimerisierung mit TAM-Familienmitgliedern [90,91] und anderen RTK [92]. Weiterhin wurde die Phosphorylierung von Axl durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in VSMC von Ratten [93] und weiteren Zelltypen [94] beschrieben. In Endothelzellen bewirkt VEGF-A über die Aktivierung des VEGF-Rezeptor mit nachfolgender Src-Kinasenfamilie-Aktivierung die Phosphorylierung von Axl. Dadurch wird der PI3K/Akt-Signalweg eingeleitet. Laut Ruan und Kazlauskas ist Axl essentiell für die Einleitung dieses Signalwegs durch VEGF-A [95].

Tabelle 2: Axl Tyrosinphosphorylierungsstellen und jeweilige Bindungspartner

Tyrosin	Bindungspartner	Quellenangabe
Y779	PI3K p85α/β	[96]
Y821	PLCγ, PI3K p85α/β, SRC, LCK	[96]
Y866	PLCγ	[96]
<i>PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, p85α/β = Untereinheit der Klasse I PI3K, PLCγ = Phospholipase C, SRC = Name der TK (Protoonkogen, Akronym für sarcoma, Mitglied der Src-Kinasenfamilie), LCK = Abk. für engl. lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Mitglied der Src-Kinasenfamilie), modifiziert nach Axelrod, 2014 [79]</i>		

Die Aktivierung von Axl hat je nach Zelltypus und Gewebetyp, physiologischen oder pathologischen Gegebenheiten unterschiedliche Konsequenzen (siehe Abbildung 2). Gas6 und Axl sind involviert in Apoptoseschutz und Zellüberleben von VSMC [97] und Endothelzellen [98,99], welche bei VSMC über den Gas6/Axl/PI3K/Akt-Signalweg [100] und ebenfalls bei Endothelzellen mittels NFκB/BCI2 [101] sichergestellt werden. Weiterhin induziert Gas6 die Axl-vermittelte Migration von VSMC [102]. Dies geschieht unter anderem durch Interaktion von Axl mit der Myosin-schweren-Kette (heavy chain)-IIB durch die durch Gas6 erhöhte ROS-Produktion [103]. Auch beim Gefäßremodelling spielt Axl eine große Rolle. So wiesen Axl-knockout-Mäuse (Axl^{-/-}) im Gegensatz zum Wildtyp (Axl^{+/+}) nach Ligation der linken Koronararterie eine signifikant dünnere Tunica intima und media auf. Die Immunhistochemie der linken Koronararterie zeigte eine fünffach höhere Apoptoserate in der Intima der Axl-knockout-Mäuse im Gegensatz zum Wildtyp [104]. Auf Hypertension reagierten Axl-knockout-Mäuse ebenfalls mit vermehrter

Apoptose in der Tunica media im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sie wiesen zusätzlich einen verminderten systolischen Blutdruck im Gegensatz zum Wildtyp auf. Im Wildtyp herrschte außerdem eine beeinträchtigte Endothelfunktion vor, die in den Axl-knockout-Mäusen nicht aufzufinden war ^[105]. Axl fördert in diesem Setting also eine inflammatorische Reaktion ^[79]. Die oben genannte essentielle Beteiligung von Axl an der VEGF-A-induzierten Einleitung des PI3K/Akt-Signalweges in Endothelzellen führt zu Migration, erhöhter Gefäßpermeabilität, Rohrformation (engl. *tube formation*) und zu kornealer Neovaskularisierung bei Mäusen ^[95]. Endothelzellen werden zudem durch Gas6 vor der TNF α -vermittelten Apoptose geschützt ^[106]. Axl, Tyro3 oder Mer sind außerdem in der Lage durch Phosphorylierung des Integrin β_3 und nachfolgender Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs, die Plättchenaggregation zu fördern ^[107,108]. Das Fehlen von Gas6 vermindert die Adenosindiphosphat(ADP)-induzierte Plättchenaggregation ^[109]. Fehlt einer der TAM-Rezeptoren, wird die initiale Plättchenaggregation zwar nicht verhindert, jedoch die Stabilisierung des Aggregats beeinträchtigt ^[107].

Für die Inhibierung von Axl existieren verschiedene Komponenten. So ist BGB324 (ehemals R428) die in Laboren am meisten verwendete Substanz und der potenteste Axl-Inhibitor. R428 ist eine niedermolekulare Verbindung, die erstmalig von der Firma Rigel Pharmaceuticals, Inc. (Sitz in San Fransisco, Kalifornien, USA) entwickelt wurde ^[110]. Es verhindert die Autophosphorylierung von Axl und somit die nachfolgende Aktivierung von downstream Signalkaskaden. Derzeit wird R428 in Phase I bei akuter myeloischer Leukämie und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) eingesetzt ^[79]. Monoklonale Antikörper wie Bosutinib, Sunitinib und Cabozanitib wurden entwickelt und inhibieren neben Axl auch weitere RTK (sog. Multikinase-Inhibitoren, engl. *multi-kinase inhibitors*). Sie sind derzeit im Einsatz gegen Philadelphia-Chromosom positive CML, Glioblastom, Mammakarzinom, medulläres Schilddrüsenkarzinom, Hepatozelluläres Karzinom, NSCLC und weitere Karzinome in verschiedenen Phasen klinischer Studien, bzw. sind bereits zugelassen (siehe Tabelle 27) ^[111].

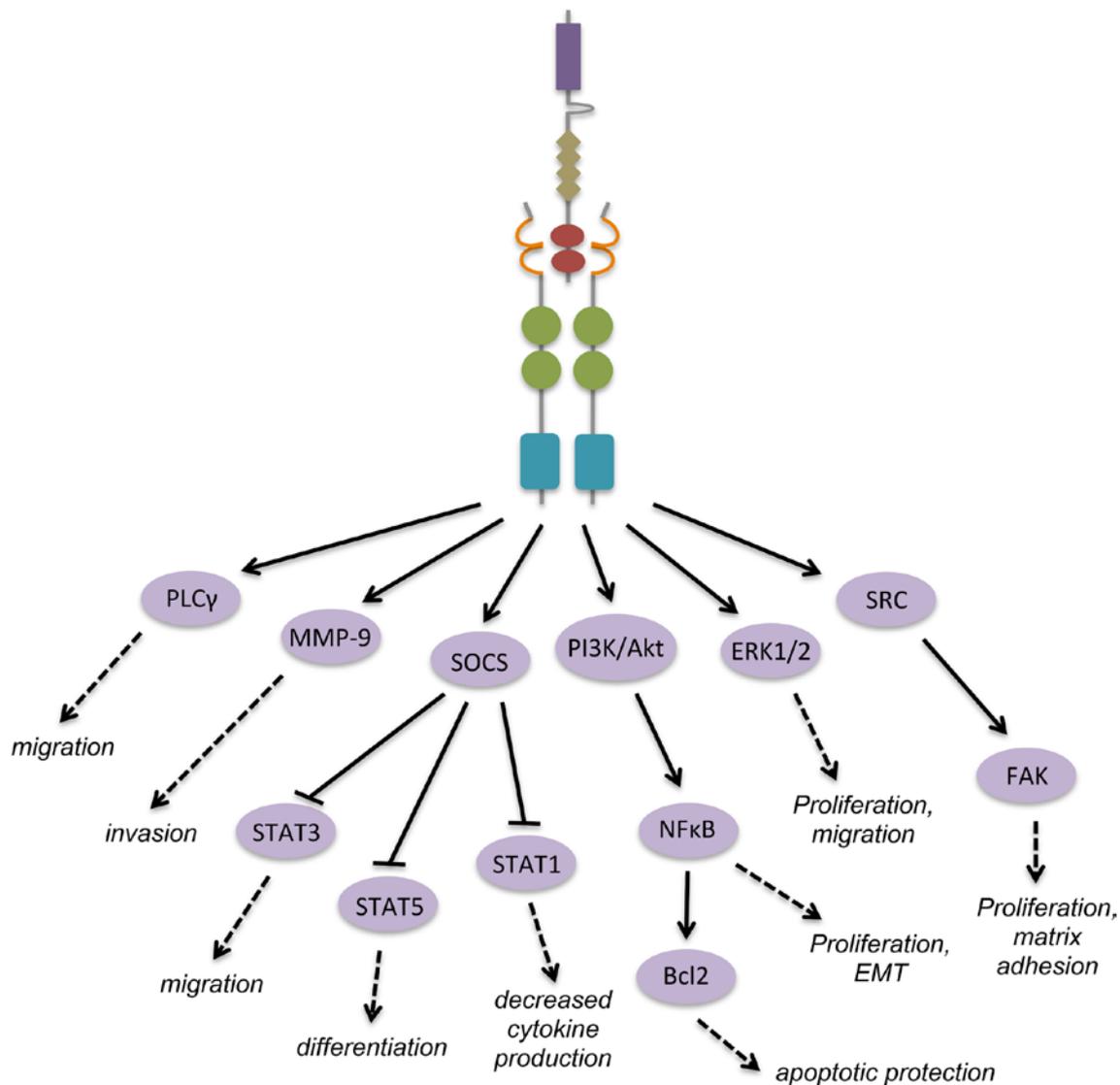


Abbildung 2: Die Aktivierung von Axl durch Gas6 führt zu Homodimerisierung und Aktivierung von Downstream-Signalkaskaden mit den jeweiligen funktionalen Konsequenzen. Dargestellt für mehrere Zelltypen. Aus Axelrod, 2014 ^[79], Figure 2. Mit freundlicher Genehmigung durch K. Pienta, 24.03.2017.

Legende: PLC γ = Phospholipase C, MMP-9 = Matrix-Metalloproteinase-9, SOCS = Suppressor of cytokine signaling, STAT = Abk. für engl. Signal Transducers and Activators of Transcription, PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase, Akt = Proteinkinase B, NF κ B = Abk. für engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, Bcl2 = Abk. für engl. B-cell lymphoma 2, EMT = Epithelial-mesenchymale Transition, ERK1/2 = Abk. für engl. Extracellular-signal Regulated Kinases, SRC = Name der TK (Protoonkogen, Akronym für *sarcoma*, Mitglied der Src-Kinasenfamilie), FAK = Abk. für engl. focal adhesion kinase

1.3.1.1. Die Rolle von Axl bei Karzinomerkrankungen

Axl beeinflusst verschiedenste zelluläre Prozesse, auch unter pathologischen Bedingungen. Es ist bei Karzinomen entscheidend für Wachstum, Tumorausbreitung mit Proliferation, Invasivität und Migration, sowie Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und Angiogenese. So wurden in Osteosarkom-Zellen durch small hairpin RNA-

vermitteltes Axl-knockdown eine verminderte Proliferation sowie erhöhte Apoptosemarker gefunden [112,113]. In Prostatakrebs-Zelllinien wurde durch Gas6 die Proliferation stimuliert [114], und durch Axl-knockdown durch small interfering RNA die Proliferation, Migration und Invasion stark gehemmt [112,115]. Auch beim Mesotheliom [116] und Adenokarzinom der Lunge [117] und des Kolons [118] werden die Proliferation und Migration bzw. Invasion durch Axl beeinflusst [112]. Es findet sich weiterhin ein Zusammenhang von Axl und der EMT im NSCLC [119,120] und Stammzellen des Mammakarzinoms [121]. Ye et al., 2010 entwickelten den Axl-spezifischen monoklonalen Antikörper YW327.6S2, der sowohl murines als auch humanes Axl hochspezifisch bindet. In NSCLC- und Mammakarzinom-Xenotransplantations-Modellen wurde durch YW327.6S2 und Axl-knockdown das Tumorwachstum abgeschwächt [122,123]. Durch YW327.6S2 wurde außerdem der Effekt der anti-VEGF-Therapie, der Therapie mit Erlotinib (TKI des EGF-Rezeptors) und der Chemotherapie verstärkt [122]. Die Inhibierung von Axl durch R428 verhindert die Angiogenese und Metastasierung verschiedener Karzinommodelle [124].

Weiterhin wurden in bestimmten Karzinomarten Zusammenhänge zwischen der Axl-Expression und einer Therapieresistenz beschrieben. So wurde eine Korrelation zwischen der Axl-Expression und Chemoresistenz von Mamma- [121], Kolon- [125] und Lungen-Karzinomen [126] aufgezeigt. Beispielsweise wiesen Lungenkarzinompatienten mit erworbener Erlotinib-Resistenz aufgrund von EGFR-Mutationen eine erhöhte Axl-Expression auf [79,120]. In diesen Patienten förderte Axl ebenfalls die EMT und eine Axl-Inhibierung stellte die Erlotinib-Sensitivität wieder her [79,120]. Auch in Imatinib-resistenten Gastrointestinalen Strumatumoren (GIST) [127] und CML-Zellen [128] konnte eine erhöhte Axl-Expression nachgewiesen werden. Durch selektives Axl-Knockdown wiederum wurde die Imatinib-Sensitivität der CML-Zellen wieder erhöht [128]. Ebenfalls bestehen Zusammenhänge zwischen der Axl-Expression und der Prognose der Karzinompatienten. Bei dem Adenokarzinom der Lunge [129,130], dem duktalem Mammakarzinom [131], Glioblastoma multiforme [132,133] und Kolonkarzinom [134] ist eine höhere Axl-Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Für Gas6 ist die prognostische Datenlage weniger eindeutig. Laut Shieh et al., 2005 ist eine höhere Gas6-Protein-Expression beim Adenokarzinom der Lunge mit einer schlechteren, eine höhere Gas6-mRNA-Expression hingegen mit einer besseren Prognose assoziiert [130]. Bei der akuten myeloischen Leukämie scheint Gas6 keinen prognostischen Marker darzustellen [135]. Das lässt darauf hindeuten, dass die Gas6-unabhängige Aktivierung von Axl Therapieresistenzen und die Prognose beeinflusst [112].

1.4. Fragestellung und Zielsetzung

Axl und sein Hauptligand Gas6 stehen in Verbindung mit der Progression einer Vielzahl maligner Prozesse [79,112–121]. Ebenso scheint Axl eine Schlüsselrolle bei Therapieresistenz während der Krebstherapie zu spielen [112,120,128]. Über die Zusammenhänge der Tyrosinkinase (TK) Axl und ihres Liganden Gas6 in Bezug auf die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) liegen bisher keine Daten vor. Da die PAH und Karzinomkrankungen aber wesentliche Merkmale miteinander teilen, sollen erste Erkenntnisse über die Beziehung der TK, ihres Liganden und der PAH gesammelt werden.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit ist es deshalb, erstmalig Daten zu sammeln, indem zunächst die Expression von Axl und Gas6 im Monocrotalin-Rattenmodell durch Immunhistochemie und Immunblot ermittelt werden. In humanen erkrankten und gesunden pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (engl. *human pulmonary artery smooth muscle cells*, hPASMC) soll dies ebenfalls untersucht werden.

Ein führendes Merkmal der PAH ist die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) [1]. In diesem Zelltyp ist Axl hoch exprimiert und an einer Reihe physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. Laut Melaragno et al., 1998 spielt Axl eine entscheidende Rolle bei der Migration und Proliferation von VSMC nach Gefäßverletzungen [136]. Nach Korshunov et al., 2006 und 2007 ist Axl bedeutend für die Vorgänge beim Gefäßremodelling nach Ligatur der linken Koronararterie [104], sowie bei salzinduzierter Hypertonie bei Mäusen [105] durch Beteiligung an Apoptose und Inflammation. Melaragno et al., 2004 etablierten den Gas6/Axl/PI3K/Akt-Signalweg als Anti-Apoptosemechanismus für VSMC [100].

Ausgehend von dieser vielversprechenden Datenlage über Gas6/Axl und VSMC, ist das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit, der Rolle von Axl bezüglich der Proliferation von hPASMC nachzugehen. Dabei soll vorrangig untersucht werden, ob eine Inhibierung von Axl durch R428 einen negativen Einfluss auf die Proliferation hat bzw. ob eine Stimulierung von Axl durch Gas6 eine Proliferation in hPASMC hervorrufen kann. Als geeignete Methoden kommen das Proliferationsassay mit Bromdesoxuridin (BrdU), sowie eine Immunfluoreszenzuntersuchung mit Proliferationsmarkern in Betracht. Zusätzlich soll die Beeinflussung der Zellviabilität durch die Stimulation mit R428 bzw. Gas6 untersucht werden.

Fragestellung und Zielsetzung

Abschließend sollen die gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf eine mögliche Verwendung von Axl-Inhibitoren als kurative bzw. supportive Therapeutika bei PAH diskutiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Lösungen und weitere Reagenzien

Im Folgenden werden alle Chemikalien, Lösungen und weitere Reagenzien aufgeführt.

Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
Acrylamid [30%]	3029.1	Carl Roth, Karlsruhe
APS [10%]	A3678	Sigma, Missouri, USA
beta-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	A512.2	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	11926.03	Serva, Heidelberg
Cell Lysis Buffer (10x)	9803S	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA
Destilliertes Wasser	15230-162	Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
DMSO	D2438	Sigma, Missouri, USA
DPBS ohne Ca und Mg	P04-36500	PAN Biotech, Aidenbach
Ethanol absolut >99,8%	32205-4x2.5L-D	Sigma, Missouri, USA
Formaldehyd	252549-500ML	Sigma, Missouri, USA
Full Range Rainbow Marker	RPN800E	GE Healthcare, Illinois, USA
Glycerol	6967.1	Carl Roth, Karlsruhe
Glycin	3908.2	Carl Roth, Karlsruhe
HCl	30721-1L-GL	Sigma, Missouri, USA
Methanol	32213-25L	Sigma, Missouri, USA
Milchpulver	T145.3	Carl Roth, Karlsruhe
NaCl	S5886-500G/-1KG	Sigma, Missouri, USA

	31434-1KG-R-D	
Natriumorthovanadate	sc-24948A	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA
PMSF Lösung 200 mM in DMSO	sc482875	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA
ProLong Gold Antifade Mountant	P36930	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Proteinase Inhibitor Cocktail	11836170001	Roche, Mannheim, Deutschland
RIPA Lysis and Extraction Buffer	89901	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
Röntgenentwicklerlösung UNIMATIC-D	10091	Calbe Chemie GmbH, Salbe
Röntgenfixierlösung UNIMATIC-F	10094	Calbe Chemie GmbH, Salbe
SDS (Pulver)	L3771-100G	Sigma, Missouri, USA
SDS [20%] (Lösung)	A0675,1000	AppliChem GmbH, Darmstadt
Stripping buffer	21059	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA
TEMED	T9281-25ml	Sigma, Missouri, USA
Tergitol NP-40	NP40S	Sigma, Missouri, USA
TRIS	4855.2	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-HCl [1,5M, pH 8,9]	T2194	Sigma, Missouri, USA
Triton X-100	T8787-250ML	Sigma, Missouri, USA
Trypan Blue Solution	T8154	Sigma, Missouri, USA
Tween 20	P7949-500ML	Sigma, Missouri, USA
Ziegen Serum	G9023-10ML	Sigma, Missouri, USA

2.1.2. Kits

Tabelle 4: Kits

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	RPN2232	GE Healthcare, Illinois, USA
ApopTag Plus Fluorescein In Situ	S7111	EMD Millipore Corporation, Massachusetts, USA
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	11647229001	Roche, Mannheim, Deutschland
Cell Proliferation Reagent WST1	5015944001	Roche, Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay Kit II	500-0112	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
ImProm-II Reverse Transcription System	A3800	Promega Corporation, Wisconsin, USA
Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG	11733 – 038/046	Invitrogen Corporation, Kalifornien, USA
Precellys Keramik Beads Kit 1,4mm	91-PCS-CK14	Peqlab, VWR Life Science Competence, Erlangen
Rneasy Mini Kit	74104	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	34096	Thermo Scientific, Massachusetts, USA

2.1.3. Antikörper

2.1.3.1. Verwendete Antikörper beim Western Blotting

Tabelle 5: Primärantikörper beim Western Blotting

Primärantikörper	Firma	Produkt	Wirt	Verdünnung [verdünnt in]
-------------------------	--------------	----------------	-------------	-------------------------------------

Axl	Bioss Inc., Massachusetts, USA	bs-5180R	Hase	1:250 [5%ig BSA]
Gas6	Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA	sc-1936	Ziege	1:200 [5%ig BSA]
Pan-Actin	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA	4968	Hase	1:1000 [5%ig BSA]

Tabelle 6: Sekundärantikörper beim Western Blotting

Sekundärantikörper	Firma	Produkt	Wirt	Verdünnung [verdünnt in]
Anti-Goat IgG	Sigma, Missouri, USA	A 8919	Hase	1:8000 [5%ig Milch]
Mouse IgG HRP Linked Whole Ab	GE Healthcare, Illinois, USA	NA931	Schaf	1:10000 [5%ig Milch]
Rabbit IgG HRP Linked Whole Ab	GE Healthcare, Illinois, USA	NA934	Esel	1:10000 [5%ig Milch]

2.1.3.2. Sonstige verwendete Antikörper und Färbemittel**Tabelle 7: Sonstige Antikörper und Färbemittel**

Antikörper	Firma	Produkt	Wirt	Verwendung/ Verdünnung
Axl	Antikörper Online	ABIN421851 8	Hase	Immunhistochemie/ 1:50
DAPI	Sigma, Missouri, USA	D9542	-	Immunohistochemie
Gas6	Glory Science	glory-G41	Hase	Immunhistochemie/ 1:800-1000
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), Alexa Fluor 488	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	A11008	Ziege	Immunohistochemie

Lyophilized Rabbit Polyclonal Antibody Ki67 Antigen	Leica Biosystems, Newcastle, UK	NCL-Ki67-p	Hase	Immunohistochemie
Rhodamine Phalloidin (F-Aktin Sonde)	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	R415	-	Immunohistochemie

2.1.4. Primer

Hier aufgeführt sind die verwendeten humanen Primersequenzen.

Tabelle 8: Primersequenzen

Gen	Sequenz	Produktlänge	Temperatur
AXL tr var 1 Forward	GCA GGC TGA AGA AAG TCC CT	20	58,8 °C
AXL tr var 1 Reverse	CCT GTT CAT CCT CAC CCA GG	20	60,9 °C
Gas6 tr var 1 Forward	CCT TTC AGG TCT TCG AGG AGG	21	61,3 °C
Gas6 tr var 1 Reverse	TGG CGA AGC CTG AGT TTT TG	20	56,8 °C
GAPDH Forward*	CAG AAG ACT GTG GAT GGC CC	20	60,9 °C
GAPDH Reverse*	AGT GTA GCC CAG GAT GCC CT	20	60,9 °C

* im Labor etablierte Primersequenz.

2.1.5. Geräte

Tabelle 9: Geräte

Bezeichnung	Firma
Bio Doc Analyzer	Biometra GmbH, Göttingen
BTD fixed block system for microtubes (Heizblock)	Grant Instruments, Shepreth, UK
CELLGARD NU-480 (Sterilbank)	ibs tecnomara, Fernwald
Direct-Q® Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt
Entwicklungsmaschine CP 1000	Agfa, Mortsels, Belgien

Eppendorf Research® plus, 12-Kanal, 10 – 100 µL, gelb (Multikanalpipette)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 0.5 – 10 µL, mittelgrau (Pipette)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 10 – 100 µL, gelb (Pipette)	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Research® plus, Einkanal, 100 – 1000 µL, blau (Pipette)	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 (BIOREVO)	KEYENCE Deutschland GmbH, Neu-Isenburg
Heracell™ 150i (Zellinkubator)	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Magnetrührer IKA C-MAG HS7 (+ Heizplatte)	IKA, Staufen
Magnetrührer MR-Hei-Mix S	Heidolph, Schwabach
Magnetrührer MR-Hei-Standard (+ Heizplatte)	Heidolph, Schwabach
Magnetstäbchen	Carl Roth, Karlsruhe
Mikroplatten Lesegerät Infinite M200	TECAN, Männedorf, Schweiz
Mikroskop in Zellkultur	Leica Biosystems, Newcastle, UK
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Mx3000P qPCR System	Aligent, Kalifornien, USA
Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab, VWR Life Science Competence, Erlangen
pH-Meter 766	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin
PIPETBOY acu 2	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
PowerPac™ HC High-Current Power Supply (Stromgerät für Western Blot)	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA

Precellys 24 Homogenisator	Peqlab, VWR Life Science Competence, Erlangen
Shaker WT16	Biometra GmbH, Göttingen
Shaker WT17	Biometra GmbH, Göttingen
Sicherheits-Absaugsystem VACUSAFE Comfort	INTEGRA Biosciences GmbH, Biebertal
Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage (Präzisionswaage)	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Waage XS205 Dual Range (Analysenwaage)	Mettler Toledo, Ohio, USA
Wasserbad in Zellkultur	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Zentrifuge (Kühlzentrifuge) Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco Biofuge	Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, USA

2.1.6. Sonstige Materialien

Sonstige, bisher noch nicht aufgeführte Materialien sowie Verbrauchsmaterialien werden in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet:

Tabelle 10: Sonstige Materialien

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
15 ml Gefäß	188271	Greiner, Kremsmünster, Österreich
50 ml Gefäß	227261	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® ULTRA plus	03-0061	Langenbrink, Bern, Schweiz
Aluminiumfolie	2596.1	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Amersham Hyperfilm ECL	28906836	GE Healthcare, Illinois, USA
Deckgläser rund 12mm	01-0012/1	Langenbrink, Bern, Schweiz
Grade 3MM Chr Blotting Paper (Whatman Papier)	3030-917	GE Healthcare, Illinois, USA
Hypercassette (Entwicklerkassette)	RPN11649	GE Healthcare, Illinois, USA
Parafilm M 100mm x 38m	32436000	Bemis Company Inc., Wisconsin, USA
Pasteur-Pipetten Glas 230 mm	612-1702	VWR, Pennsylvania, USA
Pasteur-Pipetten Plastik, 5 ml einzeln steril verpackt	612-1685	VWR, Pennsylvania, USA
Pasteur-Pipetten Plastik, 5 ml lose	612-1684	VWR, Pennsylvania, USA
Pipettenspitze 10 µl, farblos	70.1130	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 100 µl, gelb	70.760.012	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 1000 µl, blau	70.762.010	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 0,5 ml	72.699	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 1,5 ml	72.690.001	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäß 2,0 ml	72.691	Sarstedt, Nümbrecht
Sarogold®-foil (Durchsichtige Folie)	9068.1	Carl Roth, Karlsruhe
Supported Nitrocellulose Membrane	1620094	Bio-Rad Laboratories, Inc., Kalifornien, USA
Zellkultur 10 cm Platten	83.3902	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur 24-Well-Platten	662160	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellkultur 6-Well-Platten	657160	Greiner, Kremsmünster, Österreich

Material und Methoden

Zellkultur 96-Well-Platten	655180	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber, klein 16 cm	831832	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, normal 25 cm	831830	Sarstedt, Nümbrecht

2.2. Methoden

2.2.1. Tiermodell

Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Gießen unter dem Aktenzeichen „GI 20/10 Nr.44/2013“ bewilligt. Die gesamte Arbeit mit den Ratten bis hin zur letztendlichen Entnahme der Lunge wurde freundlicherweise von Christina Vroom übernommen.

2.2.1.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden weiße CD[®] - Sprague-Dawley (SD) IGS - Ratten verwendet. Robert W. Dawley brachte den Stamm 1925 aus einer männlichen Hybrid-Ratte und einer weiblichen Wistar-Ratte hervor. Zuchtbetrieb und Lieferant der Ratten war die Firma Charles River Laboratories, Massachusetts, Vereinigte Staaten mit deutschem Sitz in der Stadt Sulzfeld.

2.2.1.2. Monocrotalin und das Monocrotalin-Rattenmodell

Monocrotalin (MCT) ist ein giftiges Alkaloid der Pflanze *Crotalaria spectabilis*. Die Aufnahme von Monocrotalin führt zu einer PH in verschiedenen Spezies und wurde erstmals von Kay et al., 1967 bei oraler Verabreichung von *Crotalaria spectabilis*-Samen in Ratten beschrieben ^[137]. Heute wird Monocrotalin einmalig subkutan oder intraperitoneal injiziert. Durch Cytochrom P₄₅₀ 3A4 (CYP 3A4) wird das MCT Alkaloid in der Leber zum aktiven Dehydromonocrotalin umgewandelt. Neben der induzierten PH verursacht MCT auch ein akutes Atemnotsyndrom (engl. *acute lung injury*), interstitielle pulmonale Fibrose, nekrotisierende pulmonale Arteriitis, rechtsventrikuläre Hypertrophie, Myokarditis und eine venöse okklusive Leberkrankheit ^[138–140]. Der exakte Wirkmechanismus von MCT ist bisher nicht bekannt. Jedoch wird vermutet, dass es direkten endothelialen Schaden verursacht und somit die Entwicklung und Progression einer schweren PH triggert ^[139,141]. Erste hämodynamische Veränderungen treten 1-2 Wochen nach Verabreichung auf ^[142].

An Tag 0 wurde den Ratten 60 mg/kg MCT subkutan in die Nackenfalte injiziert. Für die Kontrollgruppe wurde gleiches Volumen Kochsalzlösung verwendet. Daraufgehend wurden die Ratten einem täglichen Scoring unterzogen. Um Leiden, Schmerzen oder Schäden der Tiere frühestmöglich zu erkennen, wurden jeden Tag Körpergewicht, Allgemeinzustand und Spontanverhalten gemessen und beurteilt. An Tag 35 wurden hämodynamische Parameter (systemisch arterieller und rechtsventrikulärer Druck) gemessen, das Herzzeitvolumen berechnet und die Lunge der Tiere entnommen.

2.2.2. Zellkulturexperimente

Für die Zellkulturexperimente wurden gesunde, sowie erkrankte hPASCs verwendet. Die gesunden hPASCs wurden von der Firma Lonza, Basel, Schweiz, die erkrankten hPASCs von IPAH-Patienten von der UGMLC-Biobank, Gießen bezogen. Der Sammlung und Verwendung der Zellen wurde seitens der Ethik-Kommission der Justus-Liebig-Universität in dem Votum 15/58 zugestimmt. Die Patienten wurden über den wissenschaftlichen Verwendungszweck ihres gespendeten Materials informiert und haben ihr schriftliches Einverständnis gegeben. Die Präparation sowie Bereitstellung der Zellen erfolgte freundlicherweise durch Stephanie Viehmann.

2.2.2.1. Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten und Experimente erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank und unter Verwendung steriler Arbeitsmaterialien und Reagenzien. Die Zelllinien wurden in einem Zellinkubator bei einer Temperatur von 37,5°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert.

2.2.2.2. Medien und Reagenzien

Im Folgenden werden alle in der Zellkultur und in den zellbiologischen Experimenten genutzten Medien und Reagenzien tabellarisch aufgeführt, sofern diese nicht bereits in Abschnitt 2.1.1. genannt wurden. Genutzte Geräte und Materialien werden in den Abschnitten 2.1.5. sowie 2.1.6. aufgelistet.

Tabelle 11: Medien und Reagenzien der Zellkulturexperimente

Bezeichnung	Artikelnummer	Firma
FCS	S1810	Biowest, Nuaille, Frankreich
Gas6	885-GSB-050	R&D Systems, Minneapolis, USA
PASC-Pulmon. Art. SM Cells	cc-2581	Lonza, Basel, Schweiz
PDGF-BB	100-14B	PeproTech, Hamburg
R428	S2841	Selleckchem, München
SmBM Basal Medium	cc-3181	Lonza, Basel, Schweiz

SmGM-2 Bulletkit (+Supplementmix)	cc-3182	Lonza, Basel, Schweiz
SmGM-2 Supplement Kit	cc-4149	Lonza, Basel, Schweiz
Trypsin 0.5 %/EDTA 0.2 % in PBS	P10-024100	PAN Biotech, Aidenbach
Vitamin K2	V9378-250MG	Sigma, Missouri, USA

2.2.2.3. Vorbereitung der Medien

Das Wachstumsmedium (engl. *Growth Medium*, GM) wurde angesetzt, indem 27 ml eines Wachstumsfaktorencocktails mit humanem epidermalem Wachstumsfaktor (engl. *Epidermal Growth Factor*, hEGF), Insulin, humanem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. *Fibroblast Growth Factor*, hFGF) und fetalem Kälberserum (engl. *Fetal Calf Serum*, FCS) aus dem SmGM-2 Supplement Kit der Firma Lonza in 500 ml Basalmedium (engl. *Basal Medium*, BM) gelöst wurde. Das im Kit enthaltene Gentamicin/Amphotericin B wurde dabei verworfen.

Das Stimulationsmedium mit dem Plättchen-abgeleitetem Wachstumsfaktor (engl. *Platelet-derived growth factor*, PDGF) wurde mit PDGF-BB angesetzt. PDGF ist ein Dimer bestehend aus zwei Polypeptid-Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Homodimere bestehen aus zwei A- oder B-Polypeptiden, Heterodimere aus einem A- und einem B-Polypeptid. Während der PDGF-Rezeptor α alle PDGF-Dimere bindet, interagiert der PDGF-Rezeptor β nur mit PDGF-AB und -BB^[41]. Für das PDGF-Stimulationsmedium wurde also das PDGF-BB von 10 $\mu\text{g/ml}$ auf 30 ng/ml mit BM verdünnt.

Der Axl-Inhibitor R428 wurde vor den Experimenten von 1 mM auf 100 μM in BM vorverdünnt. Der Axl-Ligand Gas6 wurde vor jedem Experiment von 100 $\mu\text{g/ml}$ auf 2 $\mu\text{g/ml}$ in BM vorverdünnt. Eine weitere Verdünnung je nach Versuchsanordnung wurde bei R428 und Gas6 vorgenommen.

2.2.2.4. Zelltypen

Für die in Abschnitt 3.2.1. durchgeführte RNA-Isolation wurden folgende Zellen herangezogen: Die gesunden hPASC der Firma Lonza waren die Nummern 7F3560 (Passage (P.) 6), 7F3559 (P. 16), 369143 (P. 6) und 370750 (P. 6). Die erkrankten hPASC von IPA-H-Patienten waren die Nummern 250 (P. 6), 221 (P. 2), 394 (P. 7), 449 (P. 5), 453 (P. 4), 437 (P. 4), 402 (P. 5) und 428 (P. 4). Für die RNA-Isolation wurden

die hPASCs nicht stimuliert. Die in Abschnitt 3.2.2. beschriebene Protein-Isolation wurde aus den folgenden Zellen durchgeführt: Die gesunden hPASCs (Lonza) waren die Nummern 7F3560 (P. 6 + 7), 369143 (P. 6) und 370750 (P. 5). Die erkrankten hPASCs von IPAH-Patienten waren die Nummern 453 (P. 4), 437 (P. 4), 402 (P. 5) und 428 (P. 4). Das Proliferations-, sowie das Zellviabilitätsassay wurden mit gesunden hPASCs (Lonza) mit den Nummern 369143 (P. 6 - 8) und 370750 (P. 6) und mit erkrankten hPASCs mit den Nummern 221 (P. 4), 250 (P. 5), 453 (P. 4) und 449 (P. 4) durchgeführt. Die Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67 (Abschnitt 2.2.6.) wurde mit den gesunden hPASCs 369143 (P. 6) durchgeführt.

2.2.2.5. Kultivierung und Splitten der Zellen

Die hPASCs lagen kältekonserveriert in 1 ml BM mit 10 % FCS und 10 % DMSO vor und wurden kurz in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden dann in einer 10 cm Platte mit 8 ml auf 37°C erwärmten GM ausgesät und im Zellinkubator platziert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zelladhäsion wurde das GM ausgewechselt um vorhandenes DMSO zu entfernen. Das Auswechseln des GM erfolgte danach alle zwei bis drei Tage.

Nach Erreichen einer circa 80%igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellkulturplatte mit 10 ml DPBS gewaschen. Das DPBS wurde abgesaugt. Anschließend wurde die Platte mit 1,5 ml Trypsin 0.5 %/ EDTA 0.2 % für eine Minute im Zellinkubator platziert. Eine adäquate Menge FCS wurde hinzugefügt. Die in Trypsin und FCS gelösten Zellen wurden nun in ein 50 ml Gefäß überführt und bei 1000 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das auf dem Boden befindliche Zellpellets in GM durch sanfte Resuspension gelöst. Für die weitere Kultivierung wurden die Zellen anschließend auf neue 10 cm Platten verteilt. Für die jeweiligen Experimente wurden sie mithilfe einer Neubauer-Zählkammer und Trypan Blue gezählt und auf 96-Well-Platten (Proliferationsassay mit je 3.000 Zellen pro Well) oder 24-Well-Platten (Ki-67-Färbung mit je 20.000 Zellen pro Well) ausgesät. Für die RNA- und Proteinisolation ohne Stimulation wurden Zellen auf 10 cm Platten kultiviert.

Für die verschiedenen Versuchsaufbauten wurde das GM der Zellen nach 24 Stunden durch BM ersetzt (serum starvation). Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Stimulation wie in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

2.2.2.6. Stimulation der Zellen für das Proliferationsassay und das Zellviabilitätsassay

Für das Proliferations- und Zellviabilitätsassay wurden sowohl gesunde hPASMC, als auch kranke hPASMC von IPAH-Patienten mit R428 bzw. Gas6 stimuliert. Dabei kamen zwei Versuchsaufbauten zum Einsatz: Zum einen wurde als Positive Kontrollgruppe PDGF-BB in BM eingesetzt, zum anderen GM.

Stimulation mit R428:

I. Versuchsbedingungen in PDGF-BB in BM:

1. Positive Kontrollgruppe mit BM + PDGF-BB (30 ng/ml)
2. Stimulation mit 0,5 μ M R428 + PDGF-BB (30 ng/ml)
3. Stimulation mit 1 μ M R428 + PDGF-BB (30 ng/ml)
4. Stimulation mit 2,5 μ M R428 + PDGF-BB (30 ng/ml)
5. Stimulation mit 5 μ M R428 + PDGF-BB (30 ng/ml)
6. Stimulation mit 10 μ M R428 + PDGF-BB (30 ng/ml)
7. Negative Kontrollgruppe mit BM + 1% DMSO

II. Versuchsbedingungen in GM:

1. Positive Kontrollgruppe mit GM
2. Stimulation mit 0,5 μ M R428 in GM
3. Stimulation mit 1 μ M R428 in GM
4. Stimulation mit 2,5 μ M R428 in GM
5. Stimulation mit 5 μ M R428 in GM
6. Stimulation mit 10 μ M R428 in GM
7. Negative Kontrollgruppe mit BM + 1% DMSO

Stimulation mit Gas6:

1. Negative Kontrollgruppe mit BM
2. Stimulation mit 25 ng/ml Gas6 in BM
3. Stimulation mit 100 ng/ml Gas6 in BM
4. Stimulation mit 200 ng/ml Gas6 in BM

5. Stimulation mit 500 ng/ml Gas6 in BM
6. Stimulation mit 1 µg/ml Gas6 in BM
7. Stimulation mit 2 µg/ml Gas6 in BM
8. Positive Kontrollgruppe mit BM + PDGF-BB (30 ng/ml)
9. Positive Kontrollgruppe mit GM

Pro Versuchsbedingung wurden vier Wells à 100 µl Medium verwendet. Das Proliferations- und Zellviabilitätsassay wurde wie in Abschnitt 2.2.5. beschrieben vorgenommen.

2.2.2.7. Stimulation der Zellen für die Ki-67-Färbung

Für die Ki-67-Färbung wurden hPASMC ebenfalls mit R428 stimuliert. Die Versuchsbedingungen waren die folgenden:

1. Positive Kontrollgruppe mit BM + PDGF-BB (30 ng/ml)
2. Stimulation mit 0,5 µM R428 + PDGF-BB (30 ng/ml) in BM
3. Stimulation mit 1 µM R428 + PDGF-BB (30 ng/ml) in BM
4. Stimulation mit 2,5 µM R428 + PDGF-BB (30 ng/ml) in BM
5. Stimulation mit 5 µM R428 + PDGF-BB (30 ng/ml) in BM
6. Negative Kontrollgruppe mit BM

Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.6.1. beschrieben in 24-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesäht, stimuliert und gefärbt. Pro Well wurden 500 µl Medium genutzt.

2.2.3. RNA-Isolation, cDNA-Synthese und PCR

Alle Arbeitsschritte wurden an einem RNA-Arbeitsplatz durchgeführt.

2.2.3.1. RNA-Isolation aus Zellen

Zur RNA-Isolation wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Zur Vorbereitung wurde sichergestellt, dass die benötigte Zentrifuge Raumtemperatur (22°C) hat. Es wurde Eis in einem Behälter bereitgestellt. Zum RPE Buffer wurden 44 ml 99,9%iges Ethanol hinzugefügt. Vor jeder RNA-Isolation wurde eine Lösung (1) aus 1

ml RLT Buffer und 10 µl beta-Mercaptoethanol hergestellt. 70%iges Ethanol wurde hergestellt, indem 70 ml 99,9%iges Ethanol mit 30 ml ribonukleinasefreiem Wasser gemischt wurden. Eine DNase I Stock Solution wurde hergestellt, indem 550 µl ribonukleinasefreies Wasser in das Fläschen mit gefriergetrockneter DNase I injiziert und vorsichtig gemischt wurde. Die Stock Solution wurde aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Aliquots dieser Lösung wurden für die RNA-Isolation verwendet.

Das Medium der hPASCs auf den 10 cm Platten wurde entfernt. Die Zellen wurden mit DPBS gewaschen. 500 µl Lösung (1) wurde auf die Platte gegeben und die Zellen mithilfe eines Zellschabers von dem Plattenboden gelöst. Die Platte stand dabei auf Eis. Eine RNeasy Mini Spin-Säule wurde in ein 2 ml Sammelgefäß gesteckt. Das Lysat wurde hier gesammelt und zentrifugiert (zwei Minuten, 10.000 rpm). Die Spin-Säule wurde verworfen. 70%iges Ethanol wurde in einer zur Lösung (1) adäquaten Menge in das Sammelgefäß hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt. 700 µl der Probe wurden in eine weitere Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (15 Sekunden, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde verworfen. 350 µl RW1 Puffer wurden in die Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (15 Sekunden, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde verworfen. In einem ribonukleinasefreiem Gefäß wurden 10 µl DNase I Stock Solution und 70 µl RDD Puffer vorsichtig gemischt und anschließend direkt auf die Membran der Spin-Säule gegeben. Es folgte eine 15-minütige Inkubation. Anschließend wurden 350 µl RW1 Puffer auf die Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (15 Sekunden, 10.000 rpm). Der Durchfluss wurde verworfen, das Sammelgefäß wiederverwendet. 500 µl RPE Puffer wurden in die Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (15 Sekunden, 10.000 rpm). Wieder wurden 500 µl RPE Puffer in die Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (2 Minuten, 10.000 rpm). Das Sammelgefäß und der Durchfluss wurden verworfen. Die Spin-Säule wurde auf ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben und zentrifugiert (eine Minute, maximale Geschwindigkeit). Die Spin-Säule wurde in einem neuen 1,5 ml Gefäß platziert. 30 µl ribonukleinasefreies Wasser wurden direkt auf die Membran der Spin-Säule gegeben und zentrifugiert (eine Minute, 10.000 rpm). Dieser Schritt wurde wiederholt. Die RNA befand sich nun im Durchfluss.

Die RNA-Konzentration wurde mittels des Nanodrop ND-1000 Spektrophotometers gemessen.

2.2.3.2. Synthese komplementärer DNA

Komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) wurde mit Hilfe des ImProm-II Reverse Transcription System-Kits der Firma Promega hergestellt. Die cDNA-Synthese erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die RNA mit dem Primer inkubiert und

denaturiert. Dazu wurde ein Reaktionsgemisch A wie in Tabelle 12 auf Eis hergestellt.

Tabelle 12: Zusammensetzung des cDNA Reaktionsgemisches A

Komponente	Volumen
RNA [0,1 µg/µl]	8 µl
Oligo(dT)15-Primer [0,5µg/µl]	2 µl

Es folgte eine sechsminütige Inkubation bei 70°C in einem Thermocycler, ehe das Gemisch umgehend wieder auf Eis gekühlt wurde. Nach fünfminütiger Kühlung wurden die Reaktionsgefäße zehn Sekunden lang bei 6.000 rpm und RT zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurden pro Gefäß 30 µl des Reaktionsgemisches B (Tabelle 13) hinzugefügt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 40 µl Gesamtreaktionsgemisch ergab.

Tabelle 13: Zusammensetzung des cDNA Reaktionsgemisches B

Komponente	Volumen	Endkonzentration
nukleasefreies Wasser	13 µl	-
Reaktionspuffer [5x]	8 µl	1x
MgCl ₂ [25 mM]	4 µl	2,5 mM
dNTP-Mix [10 mM]	2 µl	0,5 mM
Ribonuklease-Inhibitor [40 U/µl]	1 µl	1 U/µl
Reverse Transkriptase	2 µl	-

Das Gesamtreaktionsgemisch wurde in folgender Reihenfolge im Thermocycler inkubiert: fünf Minuten bei 25 °C, dann eine Stunde bei 42 °C, zuletzt 15 Minuten bei 70 °C.

2.2.3.3. Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Für die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) wurde das Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG der Firma Invitrogen verwendet. Pro Primer wurde ein Teilreaktionsgemisch wie in Tabelle 14, ausgenommen der cDNA, hergestellt. 24 µl dieses Teilreaktionsgemisches wurde dann in bis zu acht eisgekühlte qRT-PCR-Streifen aufgeteilt und mit 1 µl cDNA versetzt.

Tabelle 14: Komponenten des PCR-Reaktionsgemisches

Komponente	Volumen
Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG	12,5 µl
MgCl ₂ [50 mM]	1 µl
Forward Primer [10 µM]	0,5 µl
Reverse Primer [10 µM]	0,5 µl
ROX Reference Dye	0,1 µl
cDNA	1 µl
nukleasefreies Wasser	8,4 µl

Alle Proben wurden hierbei doppelt angesetzt. Nach kurzem Zentrifugieren (30 Sekunden, 6.000 rpm, RT), erfolgte das Überführen in das qRT-PCR-Gerät „MxPro Mx3000P qPCR System“ der Firma Aligent. Das Programm für die qRT-PCR ist in Tabelle 15 aufgeführt. Die Anlagerungstemperatur richtete sich jeweils nach den in Tabelle 8 aufgeführten Hybridisierungstemperaturen. Die Aufzeichnung und Analysierung der Daten erfolgte mit dem Computer-Programm „MxPro Mx3000P 4.1“ der Firma Aligent.

Tabelle 15: qRT-PCR-Programm

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	35
Anlagerung	*	40 s	
Elongation	72 °C	1 min	
finale Verlängerung	59-95 °C	2 min	1
Abkühlung	25 °C	-	-
* siehe Tabelle 8			

2.2.3.4. Auswertung

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte freundlicherweise durch Dr. Tatyana Novoyatleva.

2.2.4. Proteinisolation und Western Blot

2.2.4.1. Zusammensetzung der einzelnen Komponenten

In den folgenden Tabellen sind die Zusammensetzungen aller für die Proteinisolation und Western Blot genutzten Komponenten aufgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, handelt es sich bei H₂O um Reinstwasser, das mittels eines Wasseraufbereitungssystems aus Leitungswasser hergestellt wurde.

Tabelle 16: Zusammensetzung des fünffachen SDS-Probenpuffers

Komponente	Masse / Volumen für 10 ml	Endkonzentration
TRIS-HCl [0,5M, pH 6,8]	1,875 ml	375 mM
SDS (Pulver)	1 g	10 %
Glycerol	5 ml	50 %
beta-Mercaptoethanol	1,25 ml	13 %
Bromphenolblau	ca. 2 mg	ca. 0,02 %
H ₂ O	1,875 ml	-

Tabelle 17: Zusammensetzung des Laufpuffers

Komponente	Masse / Volumen für 1 L	Endkonzentration
TRIS	3 g	25 mM
Glycin	14,4 g	192 mM
SDS [10%] (Lösung)	10 ml	0,1 %

Aus der 20%igen SDS-Lösung wurde durch Hinzufügen gleicher Teile H₂O eine 10%ige Lösung hergestellt.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Blottingpuffers

Komponente	Masse / Volumen für 1 L	Endkonzentration
TRIS	6 g	25 mM
Glycin	3 g	80 mM
Methanol	200 ml	20 %

H ₂ O	800 ml	-
------------------	--------	---

Das für die Gelelektrophorese verwendete Acrylamid-Gel war ein Zweiphasengel, welches aus einem 10%igen Trenngel und einem 6%igen Sammelgel bestand.

Tabelle 19: Zusammensetzung des 10%igen Trenngels

Komponente	Masse / Volumen	Endkonzentration
TRIS-HCl [1,5M, pH 8,9]	2,25 ml	375 mM
Acrylamid [30%]	3 ml	10 %
SDS [10%]	90 µl	0,1 %
APS [10%]	45 µl	0,05 %
TEMED	9 µl	0,1 %
H ₂ O	3,6 ml	-

Tabelle 20: Zusammensetzung des 6%igen Sammelgels

Komponente	Masse / Volumen	Endkonzentration
TRIS-HCl [1,5M, pH 8,9]	633 µl	125 mM
Acrylamid [30%]	500 µl	6 %
SDS [10%]	25 µl	0,1 %
APS [10%]	12,5 µl	0,05 %
TEMED	2,5 µl	0,1 %
H ₂ O	1,35 ml	-

Die Herstellung einer 20fachen Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gepufferten Salzlösung (engl. *TRIS buffered saline*, TBS) erfolgte wie in den folgenden Tabellen:

Tabelle 21: Zusammensetzung des 20fachen TBS

Komponente	Masse / Volumen für 1 L	Endkonzentration
TRIS	48,4 g	400 mM
NaCl	160 g	2,74 M

H ₂ O	ca. 790 ml	-
Einstellen des pH-Wertes von 7,6 mit HCl mithilfe eines pH-Meters		

Tabelle 22: Zusammensetzung des einfachen TBST

Komponente	Masse / Volumen für 1 L
20x TBS	50 ml
Tween 20	1 ml
H ₂ O	949 ml

2.2.4.2. Proteinisolation aus Gewebe

Für die Proteinisolation aus Gewebe wurde ein Radioimmunpräzipitations (RIPA) - Assay verwendet. Die Herstellung des RIPA-Lysepuffers erfolgte aus 1 ml RIPA-Puffer, 10 µl in DMSO gelöstes Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, 200mM), 10 µl Natriumorthovanadate (100 mM) und 40 µl Protease Inhibitor Cocktail. Die Gewebeprobe wurde in ein eisgekühltes 2 ml Gefäß zusammen mit zehn Keramik-Kügelchen aus dem Precellys Keramik Beads Kit 1,4mm und 500 µl RIPA-Lysepuffer gegeben. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte nun für 20 Sekunden in einem Homogenisierungsgerät. Die Proben wurden anschließend für 30 Minuten bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert, der Überstand in ein gekühltes 1,5 ml Gefäß überführt und wieder auf Eis gelegt.

2.2.4.3. Proteinisolation aus Zellen

Zur Proteinisolation aus Zellen wurden 2 ml einfach konzentrierter Zellysepuffer aus 200 µl zehnfachen Cell Lysis Buffer (Cell Signaling), 1700µl destilliertem Wasser (Firma gibco), 20 µl Phenylmethylsulfonylfluorid und 80 µl Proteinase Inhibitor Cocktail hergestellt. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen mit Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS) gewaschen. Anschließend wurden 400 µl einfacher Lysepuffer auf die Platten aufgetragen und diese für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen nun von der Platte gelöst und in ein gekühltes 1,5 ml Gefäß transferiert. In einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge wurde das Lysat nun bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und weiterverarbeitet.

2.2.4.4. Konzentrationsbestimmungen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das DC Protein Assay Kit II verwendet. Das hier verwendete H₂O war gebrauchsfertiges destilliertes Wasser der Firma gibco. Es wurde, wenn nicht anders erwähnt, auf Eis gearbeitet. Es wurden vier BSA-Standards angelegt: Vier 1,5 ml Gefäße wurden vorbereitet. In das erste Gefäß wurde 100 µl BSA Standardlösung mit einer Konzentration von 2 µg/µl gegeben. In das zweite Gefäß wurden ebenfalls 100 µl BSA Standardlösung, sowie 100 µl H₂O gegeben, es ergab sich eine Konzentration von 1 µg/µl. Aus diesem Gefäß wurde nun nach ausreichendem Mischen durch einen Vortexer 100 µl entnommen, in das dritte Gefäß überführt und mit 100 µl H₂O gemischt, sodass sich eine Konzentration von 0,5 µg/µl ergab. Auch dieses Gefäß wurde gut gemischt, 100 µl entnommen, in das vierte Gefäß überführt und ebenfalls mit H₂O gemischt. Es ergab sich eine Konzentration von 0,25 µg/µl.

Eine Vorverdünnung der Proteinproben schloss sich an, indem pro Gewebeprobe 4 µl Protein mit 76 µl H₂O, und pro Zellprobe 4 µl Protein mit 6 µl H₂O gemischt wurden. Eine entsprechende Kontrolllösung mit Zelllysepuffer wurde bereitgestellt. Reagenz A wurde hergestellt aus 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz S. Dieses wurde nicht auf Eis gestellt.

Nun erfolgte das Überführen in eine 96-Well-Platte bei Raumtemperatur. Pro Proteinprobe wurden zwei nebeneinanderliegende Wells genutzt. 200 µl Reagenz B und 25 µl Reagenz A wurden in jedes Well vorgelegt und nun mit je 5 µl Kontrolllösung, BSA-Standard oder verdünnter Proteinlösung aufgefüllt. Die 96-Well-Platte wurde anschließend in das Mikroplatten Lesegerät überführt. Es wurde die Software „i-control“, eine Microplatten-Lesesoftware der Firma TECAN, genutzt. Nach einer 15-minütigen Schüttelphase wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm die Lichtabsorption gemessen. Das Angleichen der Proteinproben erfolgte je nach vorheriger Verdünnung mit Zelllysepuffer durch Verdünnung mit H₂O. Ein Viertel des 5fachen SDS-Probenpuffers wurde pro einem Teil Probe hinzugefügt und anschließend bei 95°C für fünf Minuten denaturiert. Die Proben wurden nun bei -80°C eingefroren oder auf Eis gekühlt, um sie direkt weiterzuverwenden.

2.2.4.5. Vorbereitung der Materialien

Die Arbeitsfläche wurde mit 70%igem Ethanol gereinigt. Der fünffache SDS-Probenpuffer, sowie der Lauf- und Blottingpuffer wurden wie o.g. vorbereitet. Eine 5%ige Milchlösung ergab sich aus Lösen von 5 g Milchpulver in 100 ml 1x TBST; Eine 5%ige BSA-Lösung ergab sich aus Lösen von 5 g BSA in 100 ml 1x TBST.

Aus dem Mini-PROTEAN Tetra Cell System der Firma Bio-Rad wurden die Glaskassetten gesäubert, mit Ethanol gereinigt und mithilfe der beigegefügt Klammern zusammengesetzt.

Die Lösungen für das 10%ige Trenngel, sowie für das 6%ige Sammelgel wurden in einem 50 ml Gefäß angesetzt, wobei das 10%ige Ammoniumpersulfat (APS), sowie N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) erst kurz vor der Weiterverarbeitung hinzugefügt wurden. Circa 5 ml des fertigen Trenngels wurden in die vorbereiteten Glaskassetten gefüllt und mit 1 ml H₂O aufgeossen. Nach 30-minütiger Auspolymerisierung des Trenngels wurde das Wasser abgegossen und bis zum Oberrand des Kammersystems mit dem 6%igen Sammelgel aufgefüllt. Sofort wurde ein Well-Kamm in dem Gel platziert. Das Sammelgel polymerisierte ebenfalls für 30 Minuten aus.

2.2.4.6. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, Blotting und Antikörperinkubation

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Platten in die Elektroden-Fertigung und in den Tank überführt. Die Kammern des Systems wurden innen und außen mit Laufpuffer gefüllt. Nun erfolgte das Beladen der Gelkammern angefangen mit 5µl Rainbow-Proteinmarker im ersten Well, gefolgt von gleichen Volumina Proteinproben in den folgenden Wells. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch Anschluss des Systems an das PowerPac™ HC High-Current Power Supply-Stromgerät. Eine Spannung von 100 V für circa 30 Minuten wurde angelegt, bis die Proben vom Sammel- zum Trenngel übergetreten waren, anschließend folgte die Erhöhung der Spannung auf 130 V für circa eine Stunde. Der Proteinmarker galt dabei als Richtwert.

Das Blotting erfolgte mit einem Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Systems der Firma Bio-Rad. Kurz vor Ende der SDS-PAGE wurden hierfür auf 7 x 9 cm zugeschnittene Nitrocellulose Membrane, sowie zwei Whatman-Papiere und Schwämme in Blottingpuffer eingelegt. Die Kammern des Mini Trans-Blot® Cell Systems wurden vorbereitet, indem sie mit einem Kühlakku, sowie einem Magnetrührer ausgestattet wurden. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gelkammern vorsichtig aufgehebelt, zugeschnitten und ebenfalls in Blottingpuffer eingelegt. Anschließend wurden die Blotting-Kassetten in folgender Anordnung vorbereitet: weiße Kassettenseite, Schwamm, Whatman-Papier, Membran, Gel, Whatman-Papier, Schwamm, schwarze Kassettenseite. Die Kassetten wurden festgeklemmt und in die Transferkammern eingesetzt, welche nun bis zum Rand des Systems mit Blottingpuffer befüllt wurden. Das Transfersystem wurde nun auf einen aktiven Magnetrührer gestellt

und an das Stromgerät angeschlossen. Die eingestellte Spannung betrug 100 V für eine Dauer von einer Stunde.

Nach dem Blotting wurden die Membranen aus den Blotting-Kassetten genommen und mit dem noch darauf befindlichen Gel zurechtgeschnitten. Das Gel wurde verworfen, die Membranen in 5%iger Milch in TBST gegeben und für eine Stunde auf einem langsamen Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen für drei Mal zehn Minuten mit TBST gewaschen. Das TBST wurde nach jedem Waschschrift verworfen. Für die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte das Mischen von 5%iger Milch oder 5%igem BSA in dem optimalen Verdünnungsverhältnis zum Primärantikörper (siehe Tabelle 5: Primärantikörper beim Western Blotting) in einem 15 ml Gefäß. Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C auf einem langsamen Schüttler mit dem jeweiligen verdünnten Primärantikörper inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die in Milch oder BSA gelösten Primärantikörper in einem 15 ml Falcon gesammelt und die Membranen drei Mal fünf Minuten mit TBST gewaschen. Das Ansetzen des Sekundärantikörpers erfolgte durch Verdünnung in 5%iger Milch (Verdünnungsverhältnisse siehe Tabelle 6: Sekundärantikörper beim Western Blotting). Nach dem Waschen wurden die Membranen in der zum Primärantikörper jeweiligen Sekundärantikörper-Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem langsamen Schüttler inkubiert. Die Sekundärantikörper-Milchlösung wurde anschließend verworfen. Es schloss sich weiteres Waschen mit TBST für vier Mal 15 Minuten, sowie mit TBS für ebenfalls vier Mal 15 Minuten an.

Zur Lumineszenz wurden zwei verschiedene Kits (siehe Tabelle 4: Kits) verwendet. Für die Antikörper gegen Gas6, Cyclin E sowie Cyclin D1 wurde das SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate - Kit verwendet, für alle anderen das Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent - Kit. Aus den jeweiligen Kits wurden 1,5 ml Reagenz A mit 1,5 ml Reagenz B in einem durch Aluminiumfolie lichtgeschützten 15 ml Gefäß gemischt und für fünf Minuten auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Derweil wurde die Arbeitsfläche mit 70 % Ethanol gereinigt und ca. 15 cm x 30 cm durchsichtige Folie faltenfrei auf die Arbeitsfläche aufgelegt. Die Membran wurde durch Aufstellen und Abtropfen möglichst vollständig von TBST befreit und auf die Folie gelegt. Nun wurde die Lumineszenzlösung zügig und gleichmäßig auf die Membran aufgebracht und lichtgeschützt für fünf Minuten inkubiert. Ein zweites Stück durchsichtige Folie mit einer Fläche von ca. 20 cm x 40 cm wurde faltenfrei auf die Arbeitsfläche aufgelegt. Anschließend wurde die Membran von der Lumineszenzlösung durch Aufstellung und Abtropfen befreit und zügig auf das zweite Stück Folie gelegt. Diese wurde gefaltet, die

Seiten eingeschlagen und in eine Entwicklerkassette gelegt. Die Entwicklung wurde mit Amersham Hyperfilm ECL-Filmen und der Entwicklungsmaschine CP 1000 der Firma Agfa mit Fixier- und Entwicklerlösung, sowie mit Leitungswasser in einer Dunkelkammer vorgenommen.

2.2.4.7. Stripping

Um bereits verwendete Membranen mit einem anderen Primärantikörper zu hybridisieren, wurden diese gestrippt. Zum Strippen wurden die Membranen mit einem Strippingpuffer für eine Stunde und 45 Minuten bei Raumtemperatur langsam geschüttelt. Der Puffer wurde anschließend verworfen, die Membran einminütig mit TBST gewaschen und anschließend für eine Stunde mit 5%iger Milch bei Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte die erneute Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper erfolgen.

2.2.4.8. Auswertung

Als Ladekontrolle wurde das Housekeeping-Gen Pan-Actin verwendet. Der Primärantikörper detektiert alle Isoformen des Aktins, welches als Teil des Zytoskeletts der Zelle ubiquitär vorkommt und durch die Versuchsbedingungen nicht beeinflusst wurde. Für die Auswertung der Protein-Banden wurden der BioDoc Analyzer und die Software BioDoc Analyze 2.1 der Firma Biometra verwendet. Von den Filmen wurden Bilddateien erstellt, die mittels der Software „ImageJ“ quantifiziert und in Microsoft Excel zu Pan-Actin normiert wurden.

2.2.5. Proliferations- und Zellviabilitätsassay

BrdU ist ein Pyrimidinanalogon und kann von vitalen Zellen aufgenommen werden. Während der S-Phase des Zellzyklus kann es anstelle von Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut werden. Durch ein Immunoassay kann das BrdU nachgewiesen werden. Es ist somit ein Maß für Proliferation. WST-1 ist ein Tetrazoliumsalz. Es wird von Dehydrogenasen der Atmungskette gespalten und zu Formazan, einem roten Farbstoff reduziert. Die Bildung von Formazan korreliert also direkt mit der Anzahl an vitalen Zellen. Demnach gibt das WST-1-Assay Anhalt für die Zellviabilität.

Die Aussaat der Zellen, sowie die Vorbereitungen für die Stimulationsphase mit der beinhaltenden serum starvation erfolgte wie in den Abschnitten 2.2.2.5. und 2.2.2.7. beschrieben. Nachdem die Zellen für 24 Stunden stimuliert wurden, begann das eigentliche Proliferationsassay mit dem Cell Proliferations ELISA, BrdU - Kit von Roche;

Für die Messung der Zellviabilität wurde das Cell Proliferation Reagent WST-1, ebenfalls von Roche verwendet. Beide sind colorimetrische, nicht-radioaktive Assays, deren Versuchsabläufe sich kombinieren lassen.

2.2.5.1. Inhalt der Kits und Vorbereitung der Lösungen

In den folgenden Tabellen werden die in den Kits enthaltenen Lösungen aufgeführt, sowie deren Weiterverarbeitung für die eigentlichen Assays beschrieben.

Tabelle 23: Inhalt des BrdU-Kits

Flasche	Bezeichnung	Anmerkung
1	BrdU labeling solution	1000fach konzentriert
2	FixDenat	gebrauchsfertig
3	Anti-BrdU-POD	-
4	Antibody dilution solution	gebrauchsfertig
5	Washing buffer	10fach konzentriert
6	Substrate solution	gebrauchsfertig

Die BrdU Labeling Working Solution wurde vor jedem Versuch frisch hergestellt, indem die im Kit enthaltene BrdU Labeling solution (Flasche 1) mit einem Faktor 1:100 in BM verdünnt wurde. Die Anti-BrdU POD Stock Solution ist bei 4°C im Kühlschrank lagerbar und wird hergestellt, indem 1,1 ml destilliertes Wasser in die Anti-BrdU-POD (Flasche 3) enthaltene Flasche hinzugefügt und gut gemischt werden. Der Waschpuffer wurde hergestellt, indem das in Flasche 5 enthaltene Konzentrat 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde.

Tabelle 24: Inhalt des WST-1-Kits

Flasche	Bezeichnung	Anmerkung
7	Cell Proliferation Reagent WST-1	gebrauchsfertig

Die Pipettierschritte in Raumtemperatur wurden mit einer Multichannel-Pipette vorgenommen.

2.2.5.2. Vorgehen beim Proliferations- sowie beim Zellviabilitätsassay

10 µl BrdU Labeling Working Solution wurde zu jedem Well hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C im Zellinkubator wurden pro Well 10 µl Cell Proliferation Reagens WST-1 (Flasche 7) hinzugegeben. Nach weiteren zwei Stunden Inkubation im Zellinkubator war eine Rotfärbung der Wells zu verzeichnen und die Platte wurde in das Mikroplatten-Lesegerät überführt. Ab diesem Zeitpunkt wurden alle weiteren Schritte bei Raumtemperatur, außerhalb der Sterilbank vorgenommen. Mit dem Computer-Programm „i-control“, einer Mikroplatten-Lesesoftware der Firma TECAN, wurde nach 30 Sekunden leichtem Schütteln die Lichtabsorption bei 450 nm und 650 nm gemessen (Zellviabilitätsassay). Anschließend wurden alle Wells der 96-Well-Platte vorsichtig geleert und für eine Minute mit 100 µl DPBS gewaschen. Nach Verwerfen des DPBS wurden die Zellen für 30 Minuten mit 200 µl FixDenat (Flasche 2) fixiert. Aus der Anti-BrdU POD Stock Solution wurde eine Anti-BrdU POD Working Solution hergestellt, indem die Antibody dilution solution (Flasche 4) mit einem Faktor 1:100 in Anti-Body POD Stock Solution verdünnt wurde. Die 96-Well-Platte wurde nun geleert und 100 µl Anti-BrdU POD Working Solution in jedes Well pipettiert. Nach eineinhalbstündiger Inkubation im Dunkeln erfolgten vier Waschschriffe mit zweimaligem Waschen mit DPBS und zweimaligem Waschen mit Waschpuffer. Die Wells wurden geleert und 100 µl Substrate solution (Flasche 6) in jedes Well gegeben. Nach fünf- bis zehnminütiger Inkubation im Dunkeln war nun eine Grünfärbung der Wells wahrzunehmen. Die Platte wurde wieder das Mikroplatten-Lesegerät überführt. Mittels „i-control“ wurde abschließend die Platte für eine Minute geschüttelt, ehe die Lichtabsorption bei 370 nm und 492 nm gemessen wurde (Proliferationsassay). Für die anschließende Auswertung erfolgte die Ermittlung der relativen Proliferation bzw. Zellviabilität in Prozent.

2.2.6. Immunfluoreszenz mit Ki-67

Ki-67 ist ein nukleares Antigen, das während der G1-, S-, G2-, sowie der Mitose-Phase vorhanden ist. Da es während der G0-Phase fehlt, ist es strikt mit Zellproliferation assoziiert. Es wird als Marker für zelluläre Proliferation genutzt.

2.2.6.1. Vorbereitung der Materialien

Für die Ki-67-Färbung wurden gesunde hPASC auf mit Gelatine beschichtete Deckgläschen in 24-Well-Platten gesät. Dazu wurde zunächst in jedes Well der Platte ein im Durchschnitt 12 mm großes Deckgläschen platziert. Die Gelatine wurde in einem 37°C warmen Wasserbad verflüssigt. 500 µl Gelatine wurde in jedes Well pipettiert, ehe die Platte in den Inkubator überführt wurde. Nach zweistündiger Inkubation wurde die

Gelatine mithilfe einer Pasteur-Pipette aus den Wells gesaugt. Die Platte wurde anschließend für eine Stunde unter UV-Licht gestellt. Währenddessen wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.5. beschrieben gesplittet, gezählt und anschließend auf den Deckgläschen in der 24-Well-Platte kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.5 erläutert auf serum starvation gesetzt, ehe nach weiteren 24 Stunden die Stimulation der Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.8 beschrieben, vorgenommen wurde. Die Platte wurde in den Zellinkubator überführt.

Eine 3,75%ige Fixierungslösung aus Formaldehyd wurde hergestellt, indem 37,5%iges Formaldehyd zehnfach mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Ein Permeabilitätspuffer wurde aus DBPS und 0,5%igem Triton X-100 angefertigt; Ein Blockingpuffer aus DPBS, 5%igem Ziegen Serum und 0,2%igem Tween 20. Der Waschpuffer bestand aus DPBS und 0,1%igem NP-40.

2.2.6.2. Fixierung und Färbung der Zellen

24 Stunden nach der Stimulation wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Die 15-minütige Fixierung der Zellen erfolgte mittels 500 µl Fixierungslösung pro Well. Das Formaldehyd wurde abgesaugt und die Wells mit DPBS gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit DPBS über Nacht bei 4°C gelagert.

Alle nun folgenden Schritte wurden außerhalb der Sterilbank vorgenommen. Am nächsten Tag wurde das DPBS entfernt und in jedes Well 500 µl Permeabilitätspuffer gegeben. Nach 10-minütiger Inkubation wurde der Permeabilitätspuffer entfernt und 500 µl Blockingpuffer in jedes Well gegeben. Während der 30-minütigen Inkubation mit dem Blockingpuffer wurde eine Ki-67-Antikörperlösung hergestellt, indem der Ki-67-Antikörper 1:500 in Blockingpuffer verdünnt wurde. Der Blockingpuffer wurde aus den Wells entfernt und 200 µl der Antikörperlösung in jedes Well pipettiert. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur oder aber eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Nach Entfernen der Antikörperlösung schlossen sich Waschgänge mit drei Mal fünfminütigem Waschen mit Waschpuffer an. Eine zweite Antikörperlösung aus Blockingpuffer wurde mit dem sekundären Antikörper Goat anti-Rabbit IgG (Verdünnung 1:200) und Rhodamine Phalloidin (Verdünnung 1:20) hergestellt.

Die nachfolgenden Schritte wurden mit geringem Lichtanteil durchgeführt. Die Deckgläschen wurden vorsichtig aus den Wells gelöst und auf dem mit Parafilm bespannten Deckel der Platte platziert. 70 µl der zweiten Antikörperlösung wurden auf jedes Deckgläschen pipettiert und für 45 Minuten im Dunkeln inkubiert. 500 µl einer Waschlösung aus DPBS und 0,1%igem Triton X-100 wurde in jedes Well vorgelegt. Die

Deckgläschen wurden nach der Inkubation wieder in die Wells rücküberführt. 0,5 µg/ml 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) wurden in jedes Well gegeben und für zehn Minuten im Dunkel inkubiert. Anschließend wurden die Wells geleert und mit destilliertem Wasser befüllt.

Die Deckgläschen wurden nun aus den Wells entnommen und umgedreht mithilfe des ProLong Gold Antifade Mountant auf einen Mikroskop-Objektträger geklebt. Über Nacht wurde der Kleber bei Raumtemperatur und im Dunkel trocknen gelassen. Die Objektträger wurden anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.6.3. Auswertung

Die Objektträger wurden mit dem BZ-9000 Fluoreszenzmikroskop der Firma KEYENCE unter Durchlicht betrachtet. Die genutzte Software waren BZ-II Viewer, sowie BZ-II Analyzer. Pro Kondition wurden vier Aufnahmen gemacht. Die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen wurde prozentual zu der Gesamtanzahl der Zellen, gefärbt durch DAPI berechnet. Mittels GraphPad Prism 7 wurde daraus ein Graph erstellt.

2.2.7. Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Microsoft Excel für Mac 2017 und Graph Pad Prism 7. Die einfaktorielle Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*, ANOVA) der normalverteilten, unabhängigen Stichproben erfolgte in fast allen Fällen. Es schloss sich ein Student-Newman-Keuls Test an. Bei der Analyse der mRNA von Axl und Gas6 wurde ein zweiseitiger t-Test vorgenommen. Das Signifikanzniveau α lag bei 0,05. Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (engl. *standard error of the mean*, MW \pm SEM) angegeben. Signifikante Gruppenunterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ oder $p < 0,0001$ in Bezug auf die Ablehnung einer richtigen Nullhypothese wurden in den erstellten Abbildungen mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) oder **** ($p < 0,0001$) markiert. Entsprechendes gilt für die Verwendung des Zeichens †.

3. Ergebnisse

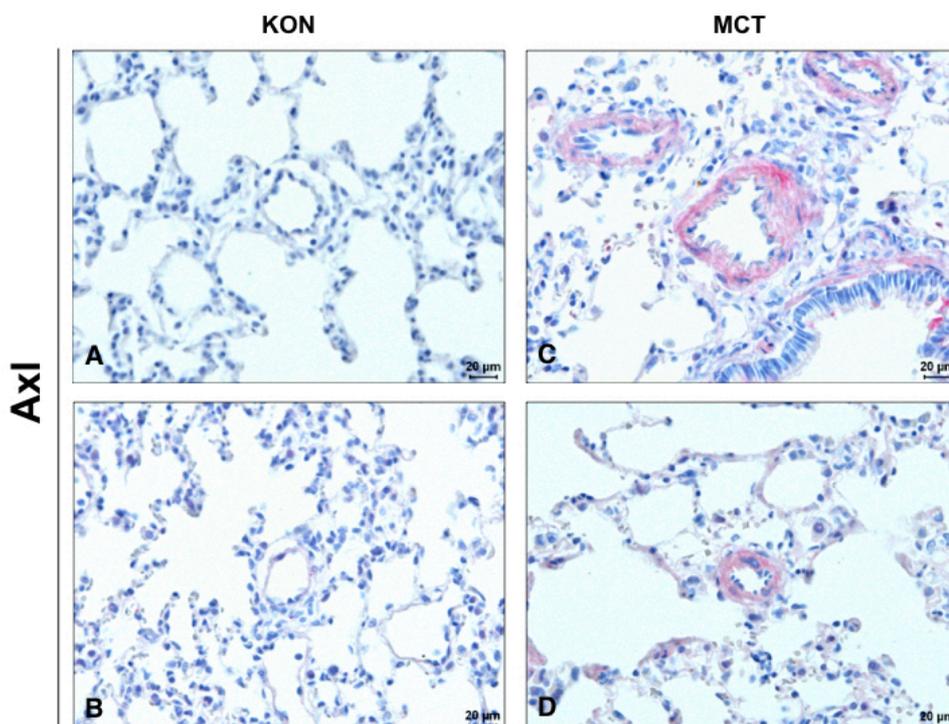
Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von Axl und Gas6 im MCT-Rattenmodell und gesunden und erkrankten hPASMC durch Immunhistochemie und Immunblot ermittelt.

3.1. Axl- und Gas6-Expression im Monocrotalin-Rattenmodell

3.1.1. Histologische Untersuchung der Rattenlunge

Da die vorliegende Arbeit die erste war, in der die Axl- und Gas6-Expression in MCT-Rattenlungen überprüft werden sollte, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Diese sollte die Verteilung und Stärke der Axl- und Gas6-Expression aufzeigen.

Die untersuchten Gefäßwände in den Kontrollgruppen stellten sich dünnwandig dar; Eine Axl- oder Gas6-Expression war hier kaum zu verzeichnen (Abbildung 3 - A. + B. + E. + F.). Die Gefäßwände der MCT-Ratten waren deutlich verdickt. Für Axl zeigte sich hier eine verstärkte Immunreaktion, die sich in allen Gefäßwänden gleichmäßig darstellte und am stärksten in der Tunica media vorhanden war (Abbildung 3 - C. + D.). Auch für Gas6 war die Immunreaktion in der MCT-Gruppe verstärkt, jedoch weniger stark ausgeprägt als für Axl (Abbildung 3 - G. + H.). Im übrigen Lungengewebe bestand keine positive Reaktion für Gas6 bzw. Axl.



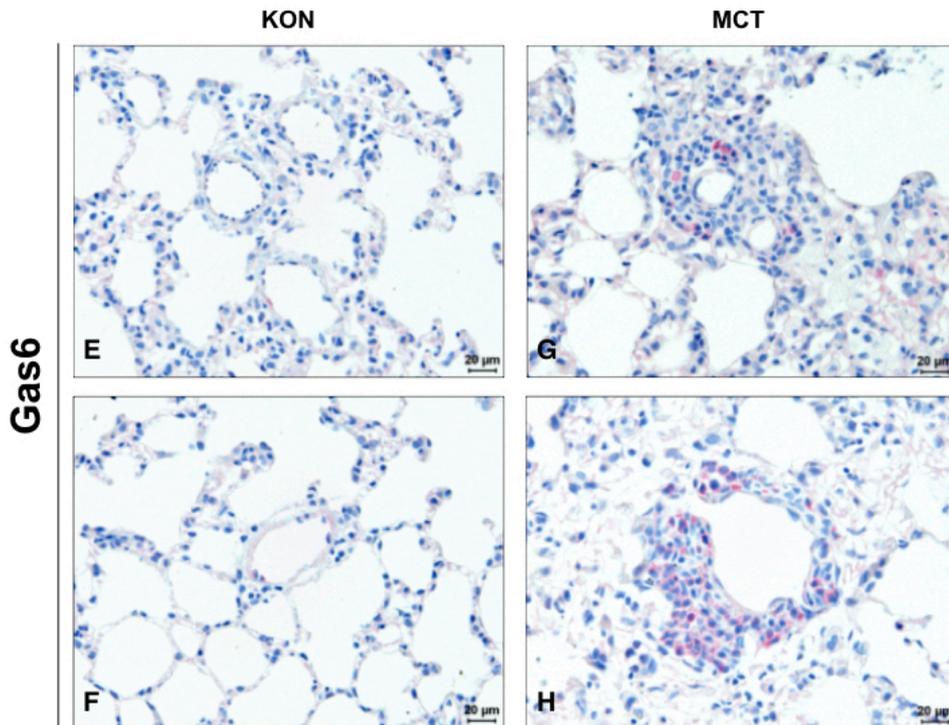
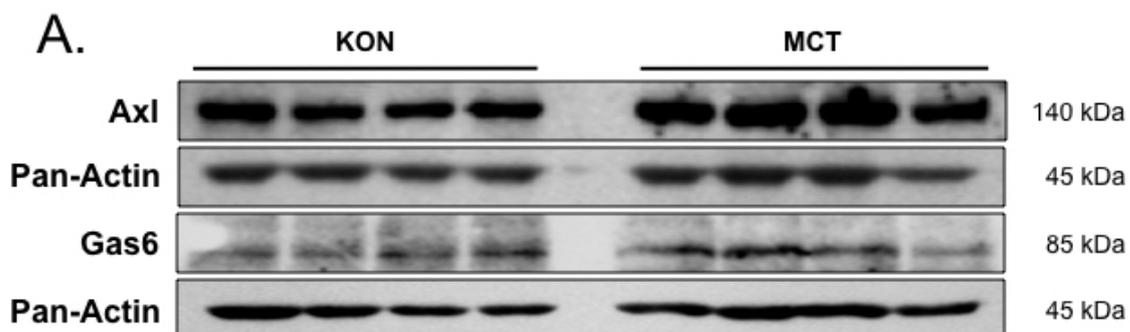


Abbildung 3: Histologische Untersuchung der Axl- und Gas6-Expression in Lungengewebschnitten der Ratte. A. + B. Axl-Expression der Kontrollgruppe (KON). C. + D. Axl-Expression der MCT-Gruppe (MCT). E. + F. Gas6-Expression der Kontrollgruppe. G. + H. Gas6-Expression der MCT-Gruppe. Repräsentative Schnitte. Maßstabsbalken: 20 µm. n = 3. Die abgebildeten Schnitte wurden freundlicherweise von Ewa Bieniek aufgenommen und zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Proteinexpression in Lungenhomogenaten

Abbildung 4 - A. zeigt die Expression von Axl- und Gas6 auf Proteinebene in Lungenhomogenaten der Ratte untersucht durch Western Blotting mit Pan-Actin als Ladekontrolle. Die Axl-Expression der MCT-Gruppe war signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe gesteigert ($0,84 \pm 0,06$ vs $1,15 \pm 0,03$, KON vs MCT). Die Gas6-Expression war nicht signifikant gesteigert, sondern leicht verringert ($1,04 \pm 0,26$ vs $1,01 \pm 0,14$, KON vs MCT).



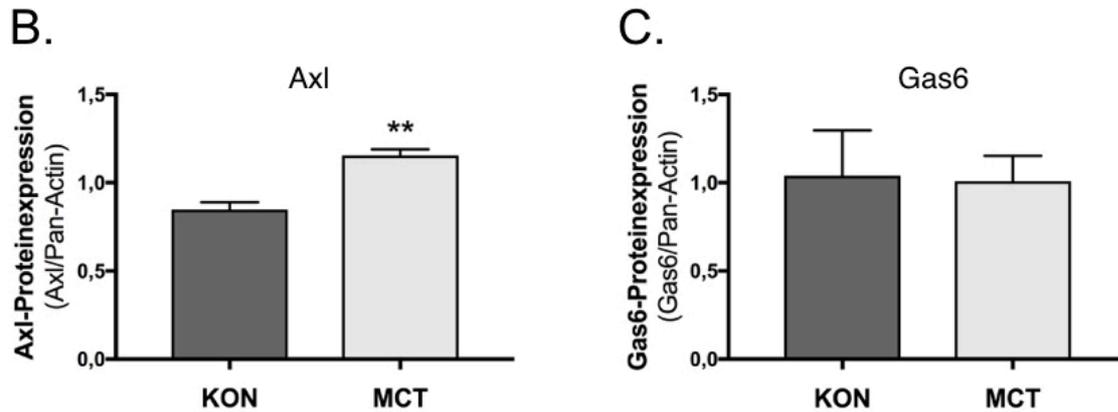


Abbildung 4: Axl- und Gas6-Proteinexpression in Lungenhomogenaten des MCT-Modells. **A.** Repräsentative Blots von Kontroll- und MCT-Ratten mit Pan-Actin als Ladekontrolle. **B. + C.** Densitometrische Quantifikation der Axl- und Gas6-Expression normiert mit Pan-Actin. ** $p < 0,01$ vs KON, $n = 4$ in jeder Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3.1.3. Proteinexpression in Ratten-PASMC

Die Axl-Expression in Ratten-PASMCs der MCT-Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht ($0,84 \pm 0,11$ vs $1,19 \pm 0,18$, KON vs MCT). Die Gas6-Expression der MCT-Gruppe war zwar erhöht, jedoch war keine Signifikanz nachweisbar ($0,59 \pm 0,05$ vs $1,52 \pm 0,36$, KON vs MCT).

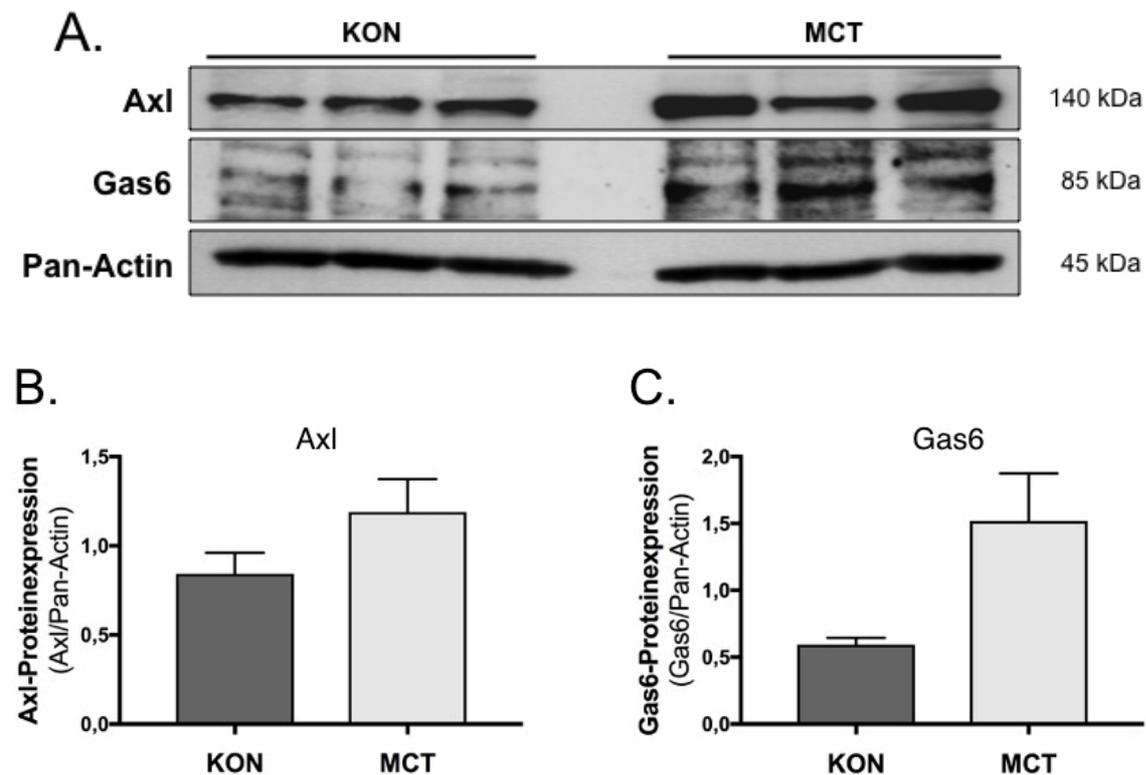


Abbildung 5: Axl- und Gas6-Proteinexpression in Ratten-PASMC des MCT-Modells. **A.** Repräsentative Blots von Kontroll- und MCT-Ratten mit Pan-Actin als Ladekontrolle. **B. + C.**

Densitometrische Quantifikation der Axl- und Gas6-Expression normiert mit Pan-Actin. $n = 3$ in jeder Gruppe. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3.2. Axl- und Gas6-Expression in humanen PASMC

Es sollten nun auch die Axl- und Gas6-Expression in humanen PASMCs untersucht werden. Dafür wurde eine Biobank angelegt und RNA, sowie Proteine aus gesunden Spender-hPASMCs sowie aus erkrankten IPAH-hPASMC gesammelt. Die Auflistung der gesammelten Proben und dazugehörigen Listennummern sind in Abschnitt 2.2.2.4. aufgeführt.

3.2.1. mRNA-Expression

Mithilfe der qRT-PCR wurde die Expression von Axl und Gas6 auf mRNA-Ebene untersucht. Für das Axl-Gen zeigte sich eine signifikant nachweisbare Erhöhung der mRNA-Expression von gesunden Spender-hPASMC vs erkrankten IPAH-hPASMC ($1,00 \pm 0,16$ vs $1,57 \pm 0,07$, Spender vs IPAH). Für das Gas6-Gen zeigte sich eine nahezu Vervielfachung der mRNA-Expression von gesunden hPASMC auf IPAH-hPASMC ($1,00 \pm 0,27$ vs $3,89 \pm 0,93$), die signifikant nachweisbar war.

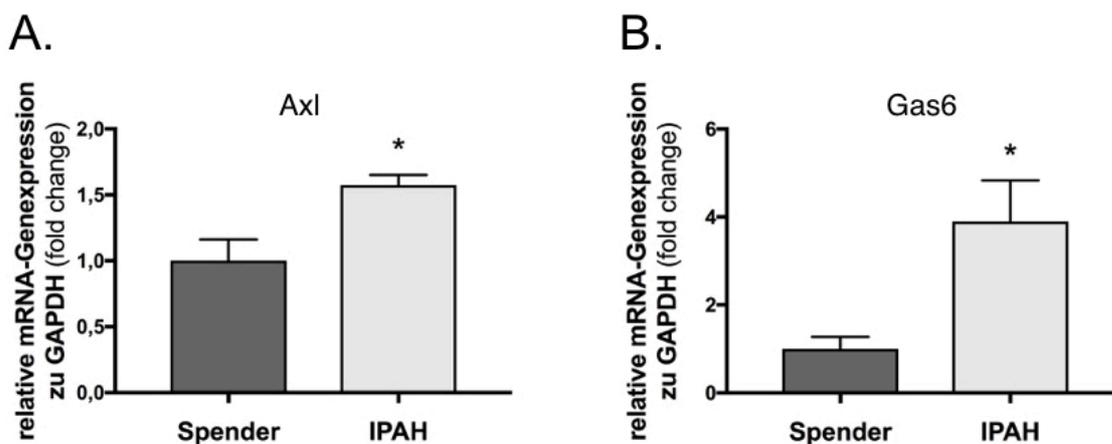


Abbildung 6: Axl- und Gas6-mRNA-Expression in humanen PASMC. A. Axl-mRNA-Expression in Relation zu GAPDH (fold change) von gesunden Spender-hPASMC und erkrankten IPAH-hPASMC. B. Gas6-mRNA-Expression in Relation zu GAPDH (fold change) von gesunden Spender-hPASMC und erkrankten IPAH-hPASMC. * $p < 0,05$ vs Spender, Axl: $n = 3$ (Spender), $n = 4$ (IPAH), Gas6: $n = 4$ (Spender), $n = 6$ (IPAH). Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3.2.2. Proteinexpression

Die Axl-Expression in den erkrankten IPAH-hPASMC war gegenüber der Expression der gesunden Spender-hPASMC nicht signifikant erhöht ($0,70 \pm 0,17$ vs $1,21 \pm 0,38$, Spender vs IPAH). Die Gas6-Expression der IPAH-hPASMC zeigte eine signifikante

Erhöhung gegenüber der Expression der Spender-hPASMC ($0,27 \pm 0,08$ vs $1,5 \pm 0,10$, Spender vs IPAH).

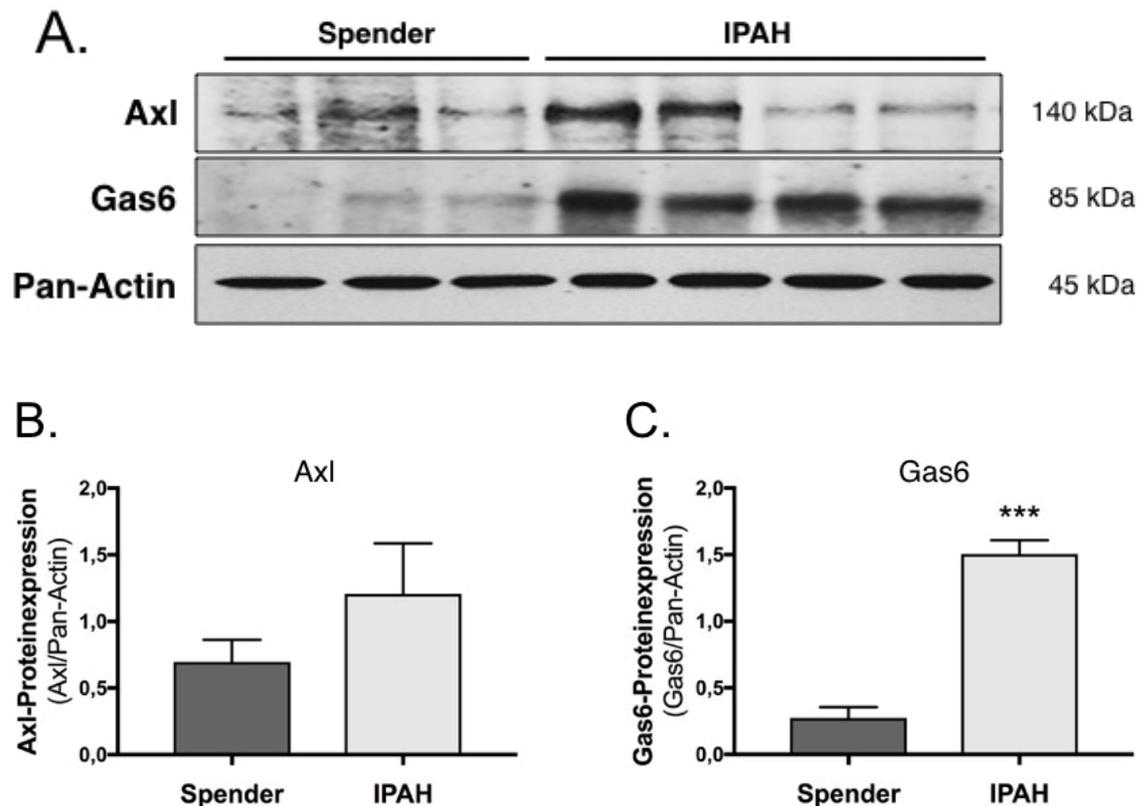


Abbildung 7: Axl- und Gas6-Proteinexpression in humanen PASMC. **A.** Repräsentative Blots von gesunden Spender-hPASMC und erkrankten IPAH-hPASMC mit Pan-Actin als Ladekontrolle. **B. + C.** Densitometrische Quantifizierung der Axl- und Gas6-Expression normiert mit Pan-Actin. *** $p < 0,001$ vs Spender, $n = 3$ (Spender), $n = 4$ (IPAH). Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3.3. Proliferation der humanen PASMC

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Rolle von Gas6/Axl bezüglich der Proliferation von hPASMC nachgegangen. Dabei galt es zu untersuchen, ob eine Inhibierung von Axl durch R428 einen negativen Einfluss auf die Proliferation hat bzw. ob eine Stimulierung durch Gas6 eine Proliferation hervorrufen kann.

Die Proliferation bzw. Aktivierung des Zellzyklus wurde mittels BrdU-Aufnahme, WST-1-Spaltung, Western Blotting, sowie Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67 untersucht. Für nähere Informationen zu den verwendeten Methoden siehe Abschnitte 2.2.4., 2.2.5. sowie 2.2.6.

3.3.1. Effekt von R428 auf die Proliferation und Zellviabilität

Im Proliferations- und Zellviabilitätsassay wurden die BrdU-Aufnahme, sowie die WST-1-Spaltung der hPASMC unter Stimulation mit R428 bestimmt. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.7. beschrieben stimuliert.

3.3.1.1. Effekt von R428 auf die Proliferation und Zellviabilität gesunder Spender-hPASMC

Sowohl durch die Stimulation durch GM, als auch durch 30 ng/ml PDGF-BB konnte eine signifikante Steigerung der Proliferation induziert werden (siehe Abbildung 8 - A. und - B.) Durch GM wurde eine Steigerung der Proliferation um das 2,7fache ausgelöst (Ausgangswert $36,6 \pm 7,5$ %), durch PDGF-BB eine Steigerung um das 1,8fache (Ausgangswert $55,5 \pm 7,9$ %). Die Behandlung mit R428 zeigte in beiden Versuchen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferationsrate, die bei 5 und 10 μM signifikant zur Behandlung mit GM bzw. PDGF-BB war (5 μM : $51,8 \pm 10,5$ % unter GM, $58,5 \pm 8,6$ % unter PDGF-BB; 10 μM : $39,1 \pm 8,2$ % unter GM, $53,9 \pm 9,3$ % unter PDGF-BB). Die Behandlung mit 0,5 μM unter GM zeigte hier eine Ausnahme ($119,4 \pm 14$ %).

R428 zeigte in den Konzentrationen 2,5 μM , 5 μM und 10 μM einen signifikant nachweisbaren Einfluss auf die Zellviabilität unter PDGF-BB (Abbildung 8 - C., 2,5 μM : $62,5 \pm 0,5$ %, 5 μM : $46,0 \pm 0,8$ %, 10 μM : $27,8 \pm 5,3$ %).

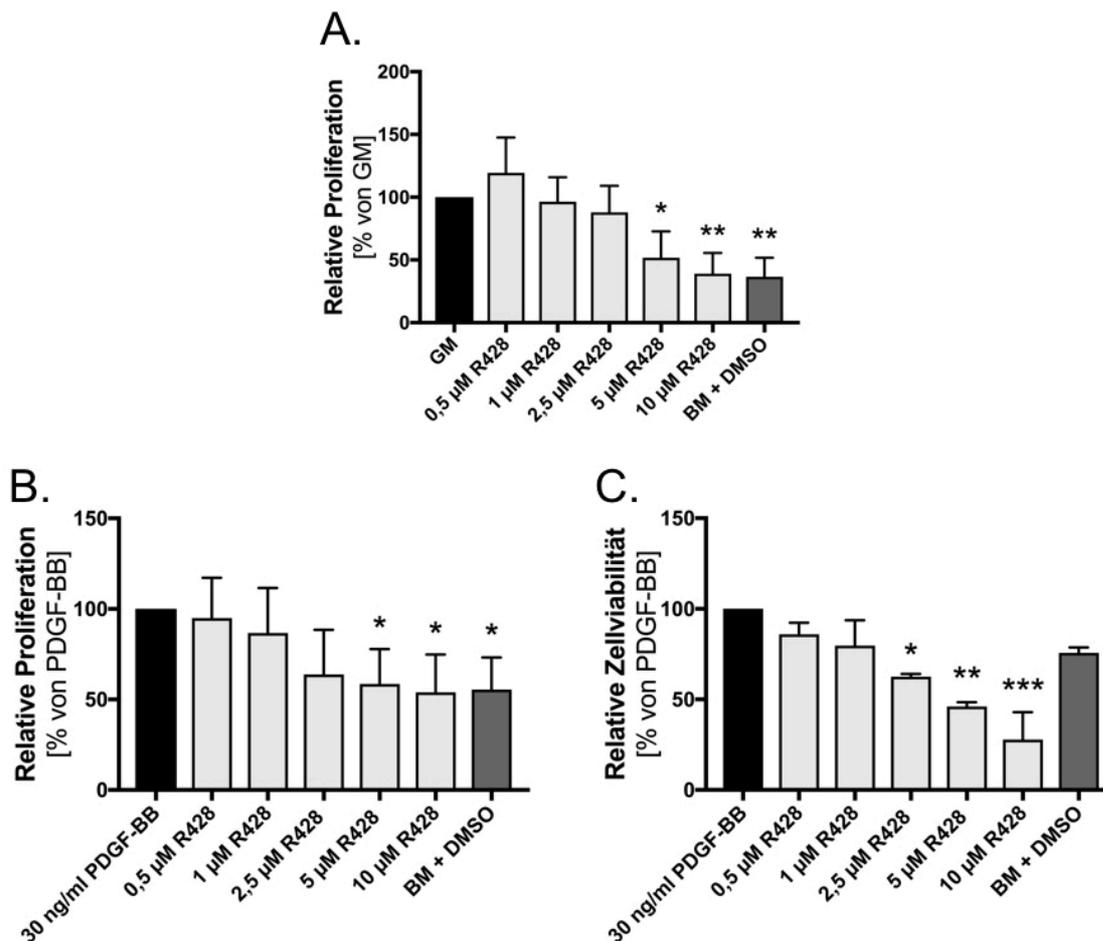


Abbildung 8: Auswirkung der R428-Stimulation auf gesunde Spender-hPASMC. A. + B. BrdU-Assay. Auswirkung von R428 auf die Proliferation der hPASMC. C. WST-1-Assay. Auswirkung von R428 auf die Zellviabilität. * $p < 0,05$ vs GM bzw. 30 ng/ml PDGF-BB, ** $p < 0,01$ vs GM bzw. 30 ng/ml PDGF-BB, * $p < 0,001$ vs 30 ng/ml PDGF-BB, $n = 4$ (A.), $n = 5$ (B.), $n = 2$ (C.). Berechnung der relativen Proliferation bzw. Zellviabilität zu GM bzw. 30 ng/ml PDGF-BB. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.**

3.3.1.2. Effekt von R428 auf die Proliferation und Zellviabilität erkrankter IPAH-hPASMC

Durch GM bzw. PDGF-BB konnte eine 3,5 bzw. 1,3fache Steigerung der Proliferation bewirkt werden (Abbildung 9 - A. und -C., Ausgangswert $28,7 \pm 4,9$ % für GM, $76,9 \pm 1,8$ % für PDGF-BB). Diese wurde durch Stimulation mit R428 konzentrationsabhängig beeinflusst und bei 10 μ M unter GM signifikant gesenkt ($33,9 \pm 6,6$ %). Die anderen Konzentrationen konnten keine signifikante Senkung der Proliferation hervorrufen.

Die Zellviabilität wurde durch BM + DMSO signifikant herabgesetzt (Abbildung 9 - B. $49,3 \pm 7,9$ %, Abbildung 9 - D. $56,9 \pm 4,4$ %). Auch R428 beeinflusste die Viabilität der IPAH hPASMC konzentrationsabhängig. Unter GM ergab sich für 10 μ M eine signifikante Senkung auf $39,0 \pm 4,9$ %. Unter PDGF-BB senkten Konzentrationen ab 2,5 μ M die Zellviabilität signifikant (2,5 μ M: $68,5 \pm 3,5$ %, 5 μ M: $48,8 \pm 5,3$ %, 10 μ M: $35,9 \pm 2,1$ %).

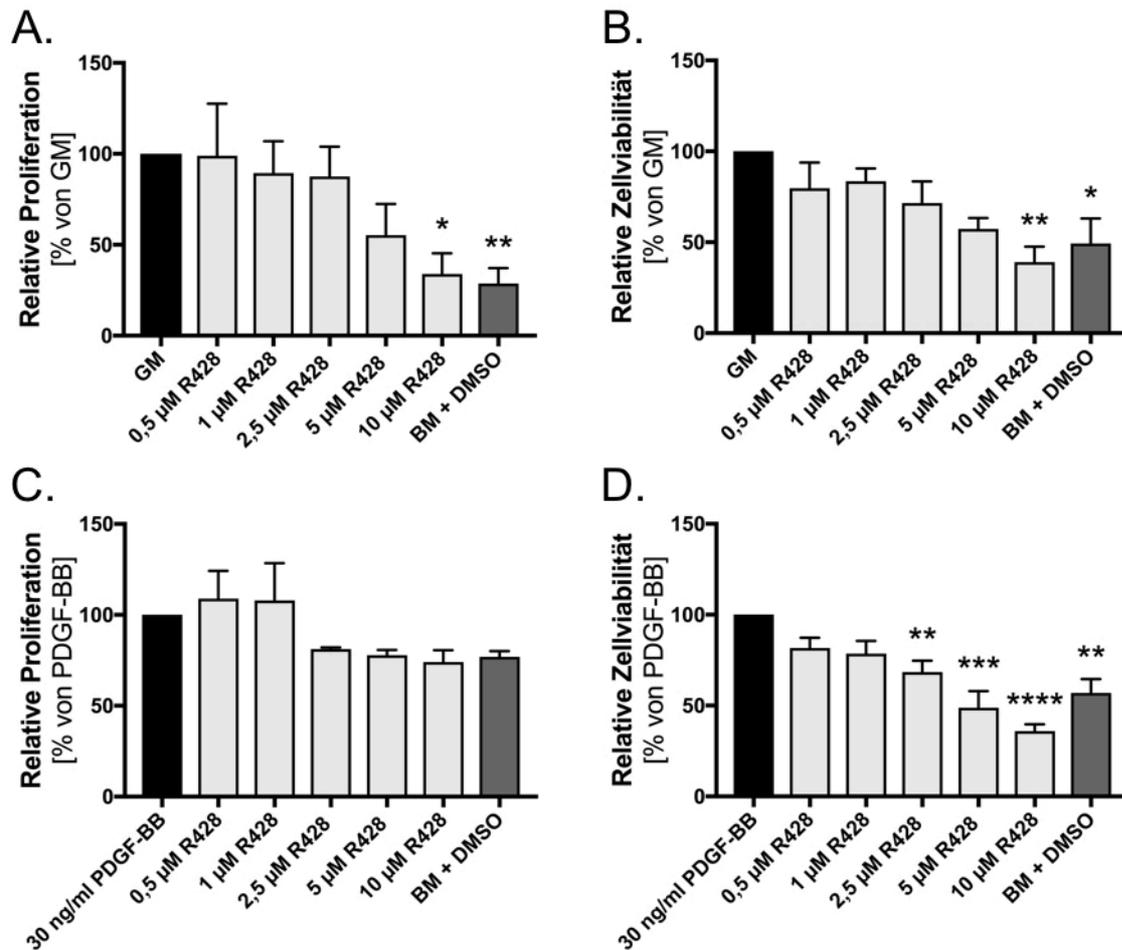


Abbildung 9: Auswirkung der R428-Stimulation auf erkrankte IPAH-hPASMC. A. + C. BrdU-Assay. Auswirkung von R428 auf die Proliferation der hPASMC. **B. + D.** WST-1-Assay. Auswirkung von R428 auf die Zellviabilität. * $p < 0,05$ vs GM, ** $p < 0,01$ vs GM bzw. 30 ng/ml PDGF-BB, *** $p < 0,001$ vs 30 ng/ml PDGF-BB, **** $p < 0,0001$ vs 30 ng/ml PDGF-BB, $n = 3$ (A., B., D.), $n = 2$ (C.). Berechnung der relativen Proliferation bzw. Zellviabilität zu GM bzw. 30 ng/ml PDGF-BB. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

3.3.3. Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67

Für die Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67 wurden gesunde hPASMC wie in den Abschnitten 2.2.2.8. und 2.2.6. beschrieben mit R428 stimuliert und anschließend gefärbt. Repräsentative Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen der Stimulation mit 0,5 µM, 1 µM und 5 µM, sowie die Kontrollgruppen mit PDGF-BB und BM wurden in Abbildung 11 - A. dargestellt. Die graphische Auswertung der Ki-67-positiven Zellen in Relation zur Anzahl der DAPI-positiven Zellen, als Maß für die Gesamtzellanzahl, wurde in 11 - B. abgebildet. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Ki-67-positiven Zellen, die ab 1 µM signifikant nachweisbar wurde (1 µM: $5,6 \pm 1,6$ %, 2,5 µM: $3,2 \pm 1,3$ %, 5 µM: $1,1 \pm 0,9$ %). Bei 10 µM waren keine Ki-67-positiven Zellen vorhanden. Für BM ergab sich eine signifikante Reduktion der Ki-67-positiven Zellen von $0,3 \pm 0,2$ % vs

12,6 ± 0,6 % unter 30 ng/ml PDGF-BB. Es zeigte sich ebenfalls eine R428-konzentrationsabhängige Abnahme der DAPI-positiven Zellen.

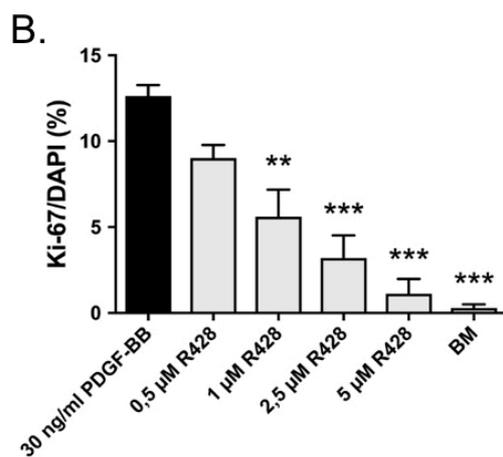
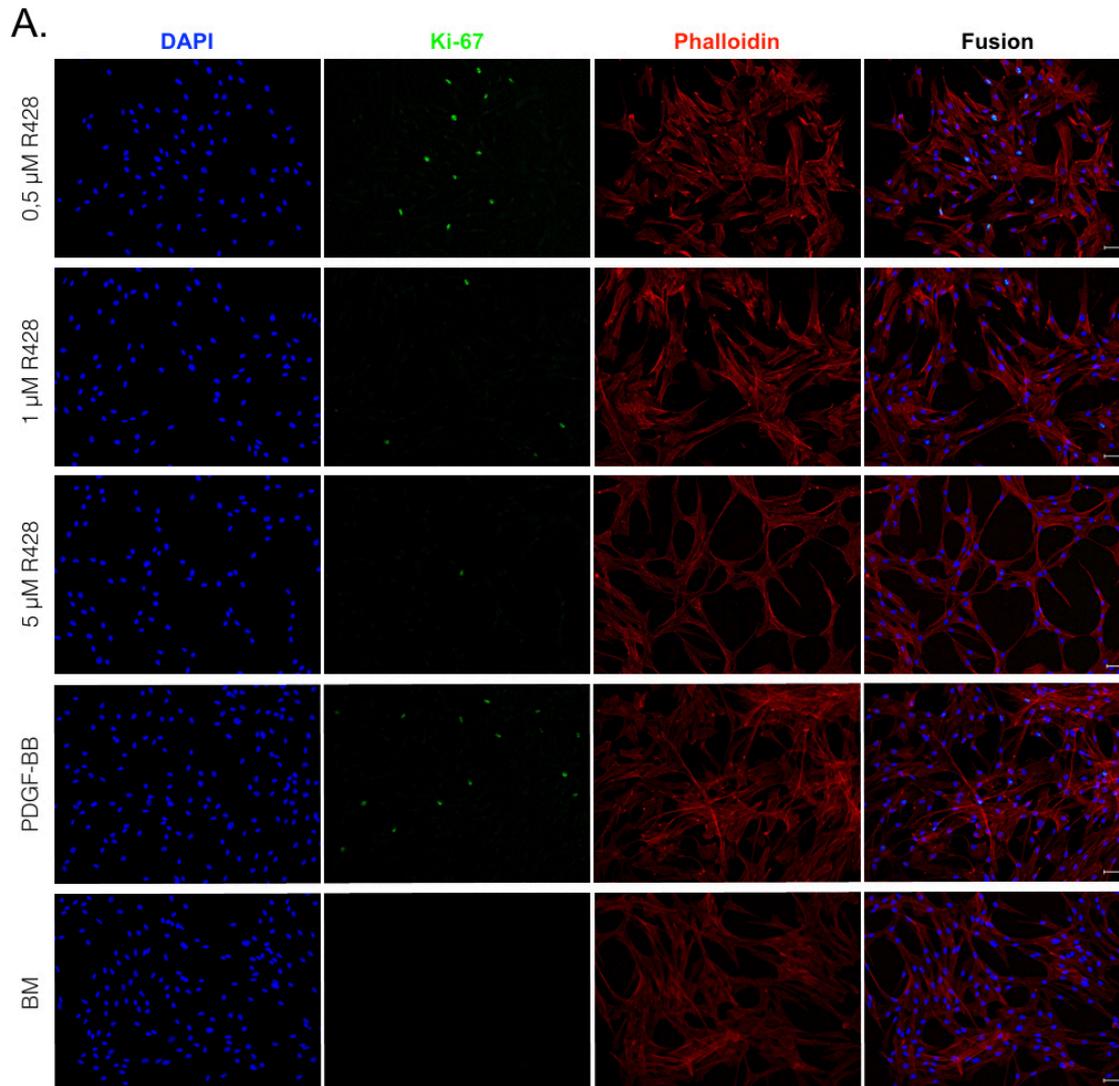


Abbildung Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67 unter R428-Stimulation. **A.** Repräsentative Fluoreszenzaufnahmen, blau: DAPI, grün: Ki-67, rot: Phalloidin. 20-fache Vergrößerung, Maßstabsbalken: 50 µm. **B.** Graphische Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung mit prozentualem Anteil der Ki-67-positiven Zellen an DAPI-positiven Zellen. ** $p < 0,01$ vs 30 ng/ml PDGF-BB, *** $p < 0,001$ vs 30 ng/ml PDGF-BB, $n=3$. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben

3.3.4. Effekt von Gas6 auf die Proliferation und Zellviabilität

Abschließend sollte die Auswirkung von Gas6 auf die Proliferation und die Zellviabilität gesunder hPASCs untersucht werden. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.2.7. beschrieben stimuliert. Durch Gas6 wurde die Proliferation der hPASCs im Vergleich zu BM nicht angeregt. Die relative Proliferationsrate für BM war $22,71 \pm 1,97\%$; Die Werte für Gas6 variierten zwischen $21,07 \pm 1,54\%$ (200 ng/ml) und $23,55 \pm 0,63\%$ (1 $\mu\text{g/ml}$). Die Proliferation induziert durch 30 ng/ml PDGF-BB und GM war gegenüber BM und den Stimulationsgruppen mit Gas6 signifikant erhöht (PDGF-BB: $55,74 \pm 1,63\%$, GM: 100%). Die Zellviabilität wurde weder durch BM (78,77%), Gas6 (Mittelwert von $86,91 \pm 0,76\%$) noch PDGF-BB ($95,88 \pm 4,25\%$) oder GM (100%) signifikant beeinflusst.

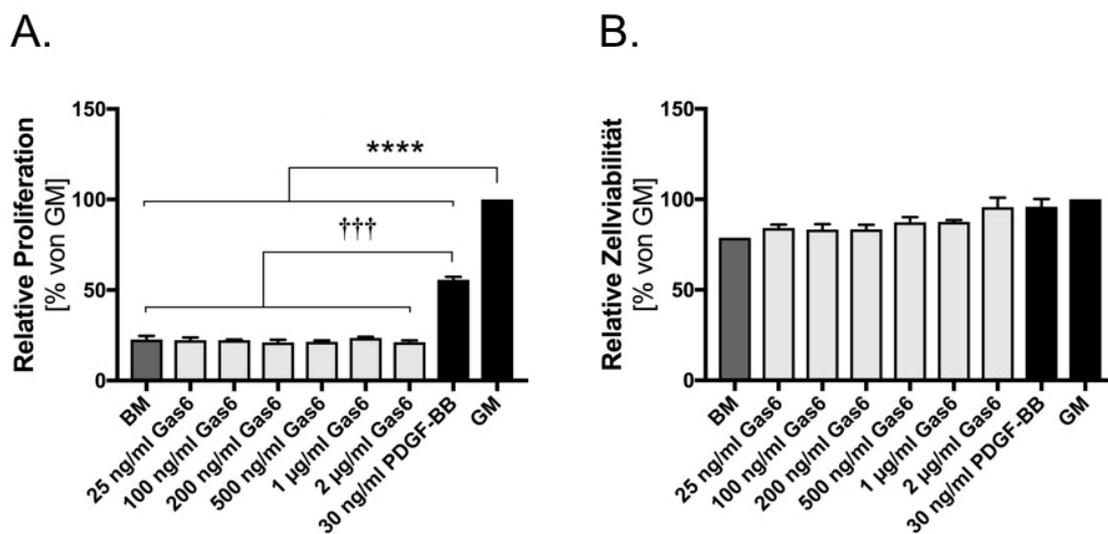


Abbildung 11: Auswirkung der Gas6-Stimulation auf gesunde hPASCs. A. BrdU-Assay. Effekt von Gas6 auf die Proliferation. B. WST-1-Assay. Zellviabilität unter BM, Gas6, PDGF-BB und GM. ††† $p < 0,001$ vs 30 ng/ml PDGF-BB, ** $p < 0,0001$ vs GM, $n = 2$ je Versuch. Berechnung der relativen Proliferation bzw. Zellviabilität zu GM. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.**

4. Diskussion

Mit 1% betroffenen Patienten weltweit ist die PH eine häufige Erkrankung. Bei den über 65-Jährigen sind sogar bis zu 10% betroffen ^[5]. Die PAH, als erste Gruppe der PH ^[4], ist eine komplexe und progressive Erkrankung mit einer bundesweiten Inzidenz von 3,9 pro eine Millionen Einwohner in 2014. Die Prävalenz lag im selben Jahr bei 25,9 pro eine Millionen Einwohner ^[7]. Eine kurative Therapie existiert bis dato nicht und Therapieziel ist derzeit „die Krankheitskontrolle, also eine Stabilisierung des Patienten auf einem guten klinischen Niveau [...], ohne Zeichen der Rechtsherzinsuffizienz und möglichst ohne Krankheitsprogression“ ^[8]. Die 5-Jahres-Überlebensrate der PAH liegt bei 67,2% ^[143]. Kennzeichnende Charakteristika sind exzessive pulmonale Vasokonstriktion, Inflammation und abnormales vaskuläres Remodeling in allen Gefäßwandschichten ^[1,11,12]. Weitere pathophysiologische Merkmale wie eine erhöhte, teils monoklonale Proliferationsrate ^[65–68,144] auch unter Hypoxie ^[60], Apoptoseresistenz ^[63,68,144], Angiogenese ^[45,46], die Fähigkeit zur Migration ^[67] bzw. Invasion ^[1] sowie metabolische Veränderungen ^[53,61,145] in der PAH machen diese zu einer karzinomähnlichen Erkrankung. Auch wenn die PAH und Karzinome nicht vollends in ihrer Pathologie übereinstimmen, öffnen diese Ähnlichkeiten neue Türen und Wege, antiproliferative bzw. onkologische Therapeutika bei der PAH-Behandlung zu nutzen ^[74]. In diesem Zusammenhang wurden bereits einige Substanzen, wie beispielsweise TKI, die aus der Karzinomtherapie bekannt sind, auch bei sogenannten benignen proliferativen Erkrankungen, wie der PAH getestet ^[146]. Imatinib, ein TKI prominent aus der Therapie der CML ^[147] und des gastrointestinalen Stromatumors ^[148], ist ein Hemmstoff der BCR-ABL-Kinase, der TK c-Kit und des PDGF-Rezeptors ^[149]. Wegen des großen Einflusses von PDGF auf die PAH, versprach man sich von einer PDGF-Antagonisierung einen therapeutischen Nutzen ^[146,150]. In der IMPRES (Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension, a Randomized, Efficacy Study)-Studie konnte durch Imatinib zwar die körperliche Belastbarkeit sowie die Hämodynamik der Patienten mit fortgeschrittener PAH verbessert werden, leider traten in der Imatinib-Gruppe aber auch häufiger als in der Placebo-Gruppe Nebenwirkungen wie Übelkeit und Diarrhoe, periphere Ödeme, Anämie und sogar subdurale Hämatome auf ^[151]. Somit wurde Imatinib als potentiell PAH-Therapeutikum nicht weiterverfolgt. Auch Sorafenib, ein Serin/Threonin-Kinase- bzw. VEGF-R2- und PDGF-Rezeptor-Inhibitor durchlief eine Phase-Ib-Studie ^[152] und ist in weiterer klinischer Erprobung ^[153].

Die Inhibierung von TK stellt also in gutartig proliferierenden Erkrankungen wie der PAH ein attraktives Therapieziel dar.

4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Bisher liegen keine Daten zum Zusammenhang der TAM-Rezeptor-Familie, bzw. ihres Hauptrezeptors Axl und der PH vor. In dieser Arbeit wurde erstmalig ein Bezug zwischen der TK Axl und ihrem Liganden Gas6 und der PAH hergestellt.

Die Expression von Axl und Gas6 war sowohl in den arteriellen Gefäßen des MCT-Rattenmodells als auch in arteriellen Gefäßen von humanen IPAH-Proben teils signifikant gegenüber der gesunden Kontrollgruppe erhöht. In verschiedenen Proliferationsmodellen (BrdU- und WST-Assay, sowie Immunfluoreszenz mit Ki-67) konnte eine dosisabhängige Senkung der Proliferations- und auch Zellviabilitätsrate in gesunden und IPAH-hPASMC durch den Axl-Hemmstoff R428 induziert werden. Gas6 zeigte in gesunden hPASMC keine Stimulation der Proliferation.

4.2. Diskussion der Methoden

4.2.1. Die Monocrotalin-induzierte PH der Ratte und Vergleichbarkeit zur PAH des Menschen

Tiermodelle verschiedener Erkrankungen existieren, um die Pathogenese der Erkrankung besser untersuchen zu können, sowie um neue Therapieansätze zu etablieren. Für die PH existieren zwei Haupttiermodelle: Das chronische Hypoxie-Modell, sowie das MCT-Modell.

Im chronischen Hypoxie-Modell wird durch normo- und hypobare Hypoxie eine PH induziert. Innerhalb einer Spezies ist die Reaktion auf die Hypoxie gut reproduzierbar und beinhaltet strukturelle Veränderungen wie die Muskularisierung von kleinen, normalerweise nicht-muskularisierten Arteriolen. Auch erscheinen smooth muscle actin-exprimierende Zellen in diesen Gefäßen. Anschließend verdicken die präkapillären pulmonalen Arterien ^[139]. In Ratten scheint auch Inflammation eine Rolle bei der Ausbildung der PH zu spielen ^[154]. Weiterhin verdicken und versteifen die großen proximalen Pulmonalarterien ^[139,155]. All diese Veränderungen führen dazu, dass bereits nach 2 Wochen Hypoxie eine moderate PH in Ratten vorherrscht. Diese ist messbar durch verdoppelten mPAP, der mit der Progression der strukturellen Veränderungen zu korrelieren scheint. Auch eine rechtsventrikuläre Hypertrophie kann auftreten, rechtsventrikuläres Versagen weniger. Bei sog. fawn-hooded-Ratten bildet sich zudem eine systemische Hypertonie aus, welche bei Menschen mit PAH in der Regel nicht vorkommt ^[139]. Mäuse entwickeln unter chronischer Hypoxie ebenfalls eine Steigerung

des pulmonalarteriellen Drucks, jedoch ist diese weniger mit vaskulärem Remodelling verbunden als in Ratten [139,156–158].

Die in der PAH bei Menschen auftretende nicht-reversible Intimafibrose, sowie die plexiformen Läsionen treten in chronischen Hypoxiemodellen nicht auf. Dies stellt somit eine Limitierung des Tiermodells dar [139,159–163]. Auch wird das Remodelling nicht ausschließlich durch die Hypoxie allein verursacht, sondern scheint auch hämodynamische Ursachen zu haben [164] und ist teilweise abhängig von Inflammation und Progenitor-Zellrekrutierung [139,165]. Alles in allem scheint das chronische Hypoxiemodell vornehmlich ein Modell für eine schwächere Form der PH zu sein als für die meist schwer verlaufende PAH. Das Modell hat eher Relevanz für Gruppe 3 der PH „Pulmonale Hypertonie infolge von Lungenerkrankungen und/oder Hypoxie“ aufgrund von Schlafapnoe-Syndrom, chronisch obstruktiver oder interstitieller Lungenerkrankung [139].

Das toxische Alkaloid MCT bzw. die Verstoffwechslung durch CYP 3A4 zum aktiven Dehydromonocrotalin verursacht bei unterschiedlichen Tierspezies eine PH. Eine einzige subkutane Verabreichung von MCT („single hit“) genügt hierfür bei Ratten schon, was dieses Tiermodell einfach und technisch unkompliziert macht. Die Abhängigkeit vom CYP 3A4-Stoffwechsel birgt hier hingegen Nachteile. So metabolisieren Mäuse MCT anders als andere Tierspezies und reagieren selbst bei direkter Verabreichung des Dehydromonocrotalin unterschiedlich. Sieben bis zehn Tage nach Injektion entwickeln Mäuse Zeichen eines akuten Atemnotsyndroms (engl. *acute lung injury*) mit Lungenödem, Hypoxämie und reduzierter Lungencompliance. Nach 28 Tagen bildet sich eine Lungenfibrose aus und keine sichtbare PH [166]. Präferierte Spezies für das MCT-Modell bleibt also die Ratte [139]. Wie in Abschnitt 2.2.1.2. bereits erwähnt, ist der exakte Wirkmechanismus von MCT bisher nicht bekannt. Jedoch wird vermutet, dass es direkten endothelialen Schaden verursacht und so die Entwicklung und Progression einer schweren PH triggert [139,141], da das strukturelle Remodelling und die Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks erst ein bis zwei Wochen nach MCT-Gabe einsetzen [142]. Diese Veränderungen können andererseits auch verursacht sein durch die starke Akkumulation von mononukleären Entzündungszellen in der Adventitia [167], die sowohl pulmonalarteriell als auch –venös auftreten. Diese und andere venöse Veränderungen stellen das MCT-Modell als Modell der PAH in Frage [167,168]. Weiterhin treten wie oben genannt neben der induzierten PH, auch ein akutes Atemnotsyndrom, interstitielle pulmonale Fibrose, nekrotisierende pulmonale Arteriitis, rechtsventrikuläre Hypertrophie, Myokarditis und eine venöse okklusive Leberkrankheit auf [138–140]. Die rechtsventrikuläre Hypertrophie und Dysfunktion sind Gemeinsamkeiten des

Tiermodells mit der humanen Form der PAH. Die durch MCT verursachte Myokarditis hingegen erschwert die Untersuchung dieser Zusammenhänge ^[139]. Auch beim MCT-Modell wurden bisher wie beim chronischen Hypoxie-Modell keine plexiformen Läsionen gefunden, dafür aber ein alveoläres Ödem, Hyperplasie der Alveolarsepten und Okklusion der pulmonalen Venen ^[166,169]. Aufgrund der akuten, teils subakuten Schädigungen der peripheren Lungengefäße und auch anderer Organe (Herz, Leber und Nieren) wird das MCT-Tiermodell daher von einigen Forschern eher als akut toxisches Krankheitsmodell angesehen ^[139]. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der humanen PAH und den zwei hier beschriebenen Tiermodellen findet sich in Tabelle 25.

Tabelle 25: Vergleich zwischen Tiermodell und humaner PAH

		Tiermodell		
		humane PAH	chronisch-hypoxisch	MCT
Merkmal	Krankheit/ Modell			
	Präkapilläre Arteriopathie	Ja	Ja	Ja
	Alveoläre Hypoxie	Nein	Ja	Nein
	Plexiforme Läsionen	Ja	Nein	Nein
	Vaskuläre/perivaskuläre Inflammation	Ja	Ja	Ja
	Langsamer klinischer Beginn (Monate/Jahre) und chronischer Ablauf mit Krankheitsprogression	Ja	Nein	Nein
	Gleiche Reaktion auf Therapeutika (PDE5 Inhibitoren, ERAs, Prostacyclinanaloga)	Ja	Ja	Ja
<i>Ja = Ja/ Vorhanden oder ähnlich, Nein = Nein/ Nicht vorhanden, ERA = Endothelin-Rezeptor-Antagonisten, PDE5 = Phosphodiesterase 5; modifiziert nach Stenmark et al., 2009 ^[139], Table 5.</i>				

Auch scheint die „single hit“-MCT-induzierte PH durch eine große Zahl an Substanzen, die in Tabelle 25 aufgeführt sind, behandelbar ^[170–192], teils präventabel ^[193–198] oder sogar reversibel ^[48,63,194,197,199–203]. Die Liste beinhaltet interessanterweise auch zwei Substanzen (Dexfenfluramin und Elastase), die in Ratten die MCT-induzierte PH verbessern ^[181,184], im Menschen allerdings eine PAH auslösen bzw. mit der Pathogenese im Zusammenhang stehen (Dexfenfluramin ^[6], Elastase ^[204]). Wahrscheinlich lässt sich das MCT-Modell aufgrund seines akuten bzw. subakuten Charakters therapeutisch einfach behandeln, im Gegensatz zur menschlichen PAH.

Tabelle 26: Zusammenstellung der Substanzen, die einen Effekt auf die MCT-induzierte PH der Ratte haben

		„single hit“-MCT-induzierter PH wird vorgebeugt, behandelt oder geheilt
Therapeutikum		Literaturnachweise
ACE-Inhibitoren	Captopril	[172]
	Enalapril	[180]
	CGS13945 und CGS16617	[185]
Angiotensin-Rezeptor-Antagonist	Olmesartan	[182]
Dichloroacetat		[201]
Elastase		[181]
Elastase Inhibitor	M249314/ZD0892	[199]
Endothelin-Rezeptor-Antagonist	Bosentan	[173]
	Bosentan + Sildenafil	[173]
	CPU0213	[174]
	LU 135252	[198]
	YM598	[202]
EGF-Rezeptor-Inhibitor	PKI166	[183]
Gen-Therapie		[63,195]
Guanylatzyklase-Aktivatoren		[200]
HMG-CoA Reduktase Inhibitor	Simvastatin	[175,186,188]
Immunsuppressivum/ mTOR-Inhibitor	Sirolimus (Rapamycin)	[192]
PDE4-Inhibitor	Roflumilast	[177]
PDE5-Inhibitor	DA-8159	[178]
	Sildenafil	[197]
PDGF-Rezeptor-Antagonist	Imatinib	[48]
Prostazyklin-Analogon	Beraprost	[176]
	Beraprost + Simvastatin	[188]
	ONO-1301MS	[187]
Phytoalexin	Resveratrol	[193]
Rho-Kinase-Inhibitor	Fasudil	[170]
	Fasudil + Beraprost	[190]
Serin/Threonin-Kinase-Inhibitor	Sorafenib	[196]
Serotonin-Antagonist	Fluoxetin	[194]

Serotonin-Reuptake-Inhibitor / Appetitzügler	Dexfenfluramin	[184]
Stammzell-Therapie		[171,179,191,203]
Thyreostatika	Propylthiouracil	[189]
<i>Modifiziert nach Stenmark et al., 2009^[139], Table 4</i>		

Es lässt sich zusammenfassen, dass das MCT-Modell weiterhin aufschlussreiche Erkenntnisse liefert, aber nicht vollends geeignet ist, wenn es darum geht, die ganze Charakteristik der PAH darzustellen. Es bleibt, wie (fast) alle Tiermodelle limitiert.

In dieser Arbeit wurde sich dennoch für das MCT-Modell entschieden, weil es ein technisch einfaches, leicht zu induzierendes Modell ist, das es ermöglichte, erste Einblicke in Bezug auf Gas6/Axl und die PH zu erlangen. In Zukunft könnten weitere Tiermodelle ergänzend zur Erforschung von Gas6/Axl und PH herangezogen werden.

4.2.2. Untersuchung von SMC

In der histologischen Untersuchung der Rattenlungen (Abbildung 3) zeigte sich eine verstärkte Immunreaktion gegen Gas6 und Axl insbesondere in der Tunica media. Diese besteht vor allem aus VSMC, Kollagen und elastischen Fasern. Um die VSMC in Abbildung 3 tatsächlich als solche identifizieren zu können, wäre eine Markierung mit alpha-smooth muscle actin oder anderen Antikörpern^[205] nötig. Zusammen mit der Tatsache, dass die VSMC-Proliferation eines der Hauptcharakteristika der PAH ist^[1], wurde sich dennoch dafür entschieden, der Rolle von Gas6/Axl bei VSMC nachzugehen. Um die Ergebnisse der Untersuchungen auf die humane PH übertragen zu können, wurden folgend hPASMC aus IPAH-Patienten herangezogen.

4.2.3. Inhibierung von Axl durch R428

Eine Vielzahl von Axl-Inhibitoren wird derzeit in klinischen Studien erprobt. Dabei spielen vor allem sogenannte Multikinase-Inhibitoren, also TKI, die mehrere TK inhibieren, eine Rolle. Eine Zusammenstellung von derzeit in klinischen Studien befindlichen Axl-Inhibitoren bzw. bereits zugelassenen Therapeutika findet sich in Tabelle 27.

R428 ist eine niedermolekulare Substanz mit oraler Bioverfügbarkeit und selektiver Inhibierung von Axl. In verschiedenen Tiermodellen konnte R428 das Wachstum von Tumoren hemmen^[124,206]. Weiterhin inhibiert R428 die Axl-Signalkaskade in VSMC potent^[207].

Tabelle 27: In klinischen Studien befindliche bzw. zugelassene Axl-Inhibitoren

Substanz	Zielmoleküle	Phase der klinischen Studie	Indikation
R428 (BGB324)	Axl	Phase I/II NCT02424617	NSCLC (+ Erlotinib)
		Phase Ib/II NCT02488408	AML oder MDS (+ Cytarabin oder Decitabin)
Bosutinib	Src/Abl, Axl	zugelassen	Ph(+)-CML
Cabozantinib	VEGFR, MET, c-KIT, Axl	zugelassen	medulläres Schilddrüsenkarzinom, Nierenzellkarzinom
		Phase II NCT01639508	NSCLC
		Phase II NCT01708954	NSCLC (+ Erlotinib)
		Phase II NCT01866410	
		Phase I NCT02008383	CRC (+ Panitumumab)
MGCD265	MET, Axl	Phase I NCT00697632	fortgeschrittene Karzinome
<i>NSCLC = nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom, AML = akute myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, Ph(+)-CML = Philadelphia-Chromosom-positive chronisch myeloische Leukämie, VEGFR = Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor (engl. Vascular endothelial growth factor), MET = HGFR (Hepatozyten-Wachstumsfaktor Rezeptor), CRC = Kolorektales Karzinom, modifiziert nach Gay et al., 2009^[112], Table 1</i>			

Substanzen die ausschließlich Axl inhibieren sind GL21.T, TP-0903 und R428 (BGB324). Da R428 der einzige Hemmstoff unter ihnen ist, der bereits in klinischen Studien erprobt ist, wurde sich in der vorliegenden Arbeit dafür entschieden, diese Substanz für die Axl-Inhibierung zu verwenden.

4.2.4. Verwendung von PDGF neben und anstelle von GM

Für die Herstellung von GM wurde das im Set enthaltene Supplementkit „SmGM-2 Supplement Kit“ der Firma Lonza verwendet. Das im Kit enthaltene Gentamicin/Amphotericin B wurde wie in Abschnitt 2.2.2.3. beschrieben verworfen. Das Kit enthält neben humanem epidermalem Wachstumsfaktor (hEGF), Insulin und humanem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (hFGF) auch fetales Kälberserum (FCS). FCS wird durch kardiale Punktion lebendiger, nicht-anästhesierter, mindestens 3 Monate alter Kalbsföten gewonnen, die aus deren schwangeren Mütterkühen im Schlachthaus extrahiert werden ^[208]. Dies birgt nicht nur starke ethische Konflikte, sondern die

Verwendung von FCS ist auch aus wissenschaftlicher Sicht umstritten. Es enthält eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und anderer Proteine, von denen ein Teil bis heute nicht vollends definiert ist. Dies kann unvorhersehbare Effekte auf die Zellkultur haben.

PDGF fördert die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen ^[209] und steht in Verbindung mit Gefäßremodelling bzw. der Pathogenese der PH ^[48,210,211]. Zudem ist die Expression von PDGF und seinem Rezeptor in den Lungen von PAH-Patienten erhöht ^[47–49]. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Proliferation der VSMC neben bzw. anstelle von GM auch mit PDGF untersucht. Die Konzentration von PDGF-BB fiel dabei auf 30 ng/ml, da diese in der Arbeitsgruppe bereits etabliert ist ^[212].

4.2.5. Methoden zur Untersuchung der Proliferation

Die Proliferation bzw. Aktivierung des Zellzyklus wurde mit mehreren Methoden untersucht: mittels BrdU-Aufnahme, WST-1-Spaltung, sowie Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67. Für nähere Informationen zu den verwendeten Methoden siehe Abschnitte 2.2.4., 2.2.5. sowie 2.2.6. Die Untersuchung der WST-1-Spaltung in Kombination mit der BrdU-Aufnahme wurde hier genutzt, um eine Beeinflussung der Zellviabilität durch R428 bzw. Gas6 auszuschließen.

4.3. Diskussion der Ergebnisse

4.3.1. Die Rolle von Gas6 und Axl in der MCT-Ratte und in IPAH-Patienten

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression von Gas6 und besonders von Axl in den erkrankten, strukturell veränderten, muskulären, arteriellen Schichten der pulmonal hypertensiven Lungen der MCT-Ratte verstärkt ist. Dies lässt eine bedeutende Rolle für Gas6/Axl bei vaskulären Umbauprozessen nach Gefäßverletzungen bzw. im Zuge des vaskulären Remodelling bei der PH vermuten. Diese Prozesse benötigen eine effiziente Migration und Proliferation von Zellen, die durch Wachstumsfaktoren bzw. RTK vermittelt wird ^[79]. Es migrieren und proliferieren im PH-Remodelling vor allem VSMC ^[1]. Die Gas6/Axl-Expression in der histologischen Untersuchung (Abbildung 3) war besonders prominent in der Tunica media nachzuweisen, die vor allem aus VSMC besteht. Die verstärkte Gas6/Axl-Proteinexpression der erkrankten Ratten-PASMC (Abbildung 5) bestätigt diese Beobachtung.

Hochregulierung von Gas6 und nachfolgende Axl-Aktivierung sind ein Aspekt der Antwort auf Gefäßverletzungen ^[79]. Bereits 1995 wurde das Potential von Gas6/Axl in Bezug auf Blutgefäße und Gefäßverletzungen beschrieben. Nakano et al., 1995 isolierten in konditioniertem Medium (engl. *conditioned medium*) von Ratten-VSMC ein

Protein, das die Antwort auf Wachstumsfaktoren bei naiven VSMC verstärkte, die mit Thrombin und Angiotensin II stimuliert wurden. Sie identifizierten dieses Protein später als Gas6 [213]. Melaragno et al., 1999 beschrieben die Verteilungsmuster von Gas6/Axl in den Karotiden von Ratten nach Ballon-Verletzung. Nach sieben Tagen waren in der Tunica media und sich neuformierenden Neointima erhöhte Axl-RNA- und Proteinlevel nachweisbar. Nach 14 Tagen begrenzte sich die erhöhte Expression fast ausschließlich auf die Neointima. Gas6 war hingegen bereits 24 Stunden nach Gefäßverletzung auf Proteinlevel vor allem in den luminal gelegenen VSMC der Tunica media nachweisbar, später begrenzte sich die erhöhte Expression ebenfalls auf die Neointima [214]. Dass Axl eine bedeutende Rolle im flussabhängigen Remodelling spielt, vermuteten Korshunov et al., 2006. Axl-knockout-Mäuse ($Axl^{-/-}$) entwickelten nach Ligation der linken Koronararterie eine signifikant dünnere Intima und Media als der Wildtyp ($Axl^{+/+}$) (31 ± 4 versus $42 \pm 6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$). Auch Veränderungen der Zelltypen wurden beobachtet. So waren unter anderem VSMC in den knockout-Mäusen vermindert [104]. Dies bekräftigt die These, dass eine erhöhte Gas6/Axl-Expression mit einem veränderten VSMC-Phänotyp einhergeht und Gas6/Axl eine wichtige Rolle bei der Proliferation bzw. Migration von VSMC spielt.

Der genauen Funktion von Gas6/Axl in Bezug auf die PH sollte weiter nachgegangen werden. Jedoch korrelieren die Erkenntnisse aus dem MCT-Tiermodell auch mit denen der IPAH-Patienten: Axl und insbesondere Gas6 sind im erkrankten Zustand hochreguliert. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Battle et al., 2014, laut jenen die myokardiale Expression und Serumkonzentration von Axl bzw. sAxl in Patienten mit Herzinsuffizienz gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ist. Weiterhin korreliert sAxl mit Parametern, die mit einer Progression der Herzinsuffizienz einhergehen, sodass laut Battle et al., 2014 sAxl als prognostischer Marker herangezogen werden könnte [215]. Da auch eine PH zu Herzinsuffizienz führen kann, stellt sAxl hier ebenfalls einen möglichen prognostischen Marker dar.

Diese Zusammenhänge und Ergebnisse unterstreichen die klinische Relevanz von Gas6/Axl in der PH.

4.3.2. R428 nicht aber Gas6 beeinflusst die Proliferation und Zellviabilität konzentrationsabhängig

Wie oben bereits erwähnt ist die Migration bzw. Proliferation von VSMC Teil des vaskulären Remodelling und prominentes Charakteristikum der PH. Antiproliferative Therapieansätze mit TKI wie Imatinib (PDGF-Rezeptor-Antagonist) und PKI166 (EGFR-

Antagonist) lieferten in der Vergangenheit zumindest im Tiermodell vielversprechende Ergebnisse ^[48,183]. Auch in frühen klinischen Studien werden Ansätze mit beispielsweise Fasudil (Rho-Kinase-Inhibitor) erprobt ^[216].

In der vorliegenden Arbeit konnte durch den Axl-Inhibitor R428 eine signifikante, konzentrationsabhängige Senkung der Proliferation sowohl in gesunden Spender-hPASC, als auch in erkrankten IPA-hPASC induziert werden (siehe Abschnitte 3.3.1.1. und 3.3.1.2.). Jedoch wurde die Zellviabilität in den WST-Assays ebenfalls konzentrationsabhängig gesenkt. Es ist also fraglich, ob der Effekt durch R428 tatsächlich durch Senkung der Proliferation hervorgerufen wird, oder durch Auslösung einer Apoptose in den hPASC. So war beispielsweise in den Immunfluoreszenzfärbungen mit Ki-67 (siehe Abbildung 11) die Gesamtanzahl der DAPI-positiven Zellen bei höheren R428-Konzentrationen vermindert im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch nahm in den WST-Assays die Zellviabilität bei hohen R428-Konzentrationen soweit ab, dass sie unter derjenigen der Negativkontrolle (BM + DMSO) lag (siehe Abbildungen 8 und 9). Vouri et al., 2015 beobachteten ebenfalls zytotoxische Effekte von R428 auf Glioblastoma multiforme-Zelllinien, allerdings ab Konzentrationen ab 50µM ^[217]. Holland et al., 2010 beobachteten in ihren *in vivo*-Experimenten eines Brustkrebsmetastasenmodells bei Mäusen zwar eine seltenere Entwicklung von Lungenmetastasen bei höheren R428-Konzentrationen (25 mg/kg vs. 7 mg/kg Körpergewicht), allerdings war das Gesamtüberleben in der 25 mg/kg-Gruppe auch verringert im Vergleich zur 7 mg/kg-Gruppe ^[124]. Eine mögliche toxische Wirkung von R428 muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Laut Healy et al., 2001 erhöht Gas6 die Zellviabilität von humanen pulmonalarteriellen Endothelzellen und fördert die Proliferation ^[99]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine zunächst vermutete Steigerung der Proliferation und Zellviabilität in hPASC durch Gas6 nicht induziert werden (siehe Abbildung 12). Die in Abschnitt 3.3.4. gezeigten Versuche mit Gas6 zur Proliferationsanregung wurden mit BM plus Gas6 in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2.7.). Gas6 scheint unterschiedliche Wirkmechanismen zu haben, je nach Bedingungen im Zellmedium. So wirkt Gas6 in serumfreien Medien nach Bellosta et al., 1997 als antiapoptotischer Faktor. In Bedingungen mit niedrigem Serum allerdings, induziert es nach Goruppi et al., 1996 den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus ^[99,218,219]. Unter geeigneten Bedingungen könnten die Versuche zur Proliferationsanregung durch Gas6 mit niedrigen Serumkonzentrationen wiederholt werden. Auch auf den Schutz vor Apoptose könnte bei weiteren Versuchsreihen näher eingegangen werden. O'Donnell et al., 1999 zeigten, dass Gas6 humane umbilikalvenöse Endothelzellen vor der TNF α -induzierten Apoptose

schützt ^[106]. Melaragno et al., 2004 untersuchten die Mechanismen, welche der Regulation des VSMC-Wachstum durch Axl zugrunde liegen, mit Fokus auf die Inhibierung der Apoptose. Durch serumfreies Medium ausgelöste Apoptose konnte durch Gas6 von $19,8 \pm 1,4$ % auf $8,9 \pm 0,7$ % apoptotische Zellen gesenkt werden. Sie etablierten den Gas6/Axl/PI3K/Akt-Signalweg als einen antiapoptotischen Signalweg für VSMC ^[100]. Auch beim vaskulären Remodelling durch salzinduzierte Hypertonie bei Mäusen schützt Axl vor Apoptose. Axl-knockout-Mäuse (Axl^{-/-}) zeigten höhere vaskuläre Apoptose als der Wildtyp ^[105].

So scheint im Großen und Ganzen Gas6/Axl in VSMC weniger eine Proliferationssteigerung, als eher einen Apoptoseschutz zu gewährleisten. Mit geeigneten Methoden sollte dem in Zukunft nachgegangen werden.

4.4. Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen Gas6/Axl und der PH besteht. Es konnten erste Daten über die Expression von Gas6/Axl in Bezug auf das MCT-Tiermodell der Ratte (Abschnitt 3.1.) und auch in Bezug auf die humane IPAH (Abschnitt 3.2.) gesammelt werden. In den Untersuchungen der Proliferationsauswirkung von R428 auf hPASMC konnte nicht abschließend geklärt werden, ob der Effekt von R428 aufgrund einer toxischen Wirkung oder von einem direkten Einfluss auf die Proliferation ausgeht. Gas6 scheint in den Versuchsreihen mit serumfreiem Medium keinen Einfluss auf die Proliferation oder Zellviabilität von hPASMC zu haben.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass Gas6/Axl in der PH, wie auch in anderen Erkrankungen mit vaskulärem Remodelling, eine tragende Rolle bei den Vorgängen des Umbaus spielt. Den genauen Effekten von Gas6/Axl und auch R428 sollte in Zukunft weiter nachgegangen werden.

4.4.1. Anregungen für weitere Untersuchungen in Bezug auf Gas6/Axl und R428

in vitro: Der Schutz vor Apoptose wurde oben bereits diskutiert und sollte in Bezug auf Gas6/Axl und PH mit geeigneten Methoden untersucht werden. Laut Fridell et al., 1998 induziert Gas6 die gerichtete Migration von Ratten- und humanen VSMC ^[102]. Da die Migration ein wichtiger Teil des Prozesses des vaskulären Remodelling ist, lohnt sich die Untersuchung des Einflusses von Gas6/Axl auf die Migration von VSMC bei der PH. Es wäre interessant zu klären, ob R428 die Migration von IPAH-hPASMC hemmt. Weitere

Untersuchungen werden benötigt um die Downstream-Signalwege von Gas6/Axl in der PAH zu klären. Auch bei anderen, bei der PAH beteiligten Zelltypen, wie beispielsweise Endothelzellen, könnten diese Punkte adressiert werden.

in vivo: Im MCT-Rattenmodell könnte der Einfluss von R428 auf die Ausbildung der MCT-induzierten PH untersucht werden. Auch andere, für die PH etablierte Tiermodelle könnten herangezogen werden. In etablierten PH-Mausmodellen könnte untersucht werden, inwieweit sich das vaskuläre Remodelling durch Axl-knockout ändert.

Die Rolle von Gas6/Axl in der PH sollte aufgrund der therapeutischen Möglichkeiten durch TKI weiter untersucht werden.

4.4.2. Axl-Inhibitoren als kurative oder supportive Therapeutika bei PH

Aufgrund der weittragenden Rolle von Axl in diversen Malignomkrankungen, ist dessen Inhibierung ein attraktives und vielversprechendes Therapieziel geworden. Axl ist überexprimiert in einer Vielzahl von Tumoren und zeigt Zusammenhänge mit Therapieresistenzen, unter anderem in GIST-Tumoren [127,220] und CML [128] mit Imatinib-Resistenz, in Lungenkarzinomen mit erworbener Erlotinib-Resistenz [79,120] und in weiteren Malignomen [121,125,126,221,222]. Durch selektives Axl-Knockdown bzw. durch Axl-Inhibierung, konnte die Chemosensitivität wiederhergestellt [128,222,223] und Tumorwachstum eingeschränkt, bzw. –Apoptose induziert werden [124,206,224,225]. Die derzeit in klinischen Studien erprobten bzw. bereits zugelassene Substanzen (siehe Tabelle 27), zielen jedoch nicht ausschließlich auf Axl ab, sondern auch auf andere RTK (Multikinase-Inhibitoren). Es ist also unwahrscheinlich, dass die alleinige Axl-Inhibierung eine wirksame Monotherapie gegen Karzinome sein wird; jedoch könnte die selektive Axl-Inhibierung bei Chemotherapieresistenzen effektiv sein [79].

Auch für gutartig proliferierende Erkrankungen wie die PAH befinden sich Multikinase-Inhibitoren wie beispielweise Sorafenib in klinischer Erprobung [152,153]. Bosutinib oder Cabozantinib als Multikinase-Inhibitoren gegen unter anderem Axl und Src, bzw. VEGF-Rezeptor sind beispielweise für das medulläre Schilddrüsenkarzinom oder die CML bereits zugelassen und könnten in der PH erprobt werden. Durch selektive Axl-Inhibierung durch R428 könnte in Kombination mit anderen, bereits etablierten Mitteln, eine Reduktion des Krankheitsbildes der PH erreicht werden.

Zusammenfassung

Hintergrund und Zielsetzung: Die pulmonal arterielle Hypertonie (PAH) ist mit einer erhöhten Proliferationsrate, Apoptoseresistenz, Angiogenese, der Fähigkeit zur Migration bzw. Invasion und weiteren metabolischen Veränderungen eine karzinomähnliche Erkrankung. Die Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) Axl und sein Ligand Gas6 regulieren unterschiedlichste Zellprozesse wie die Proliferation, Zellüberleben, Migration und Apoptoseschutz und stehen in maligner Umgebung in Kontext mit Tumorprogression, Invasion, Metastasenbildung und Therapieresistenz. Über den Zusammenhang zwischen der Pulmonalen Hypertonie (PH) und Gas6/Axl ist bisher nichts bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher erste Daten erhoben.

Methodik: Die Expression von Gas6 und Axl wurde zunächst im etablierten PH-Modell der Monocrotalin-Ratte erhoben und folgend für die idiopathische PAH (IPAH) des Menschen. Es erfolgte zunächst die immunhistochemische Untersuchung mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion und Immunblot. Auf Zellebene wurde dann mit Proliferations- und Zellviabilitätsassay (BrdU- und WST-Assay), sowie mittels Immunfluoreszenzfärbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 die Auswirkung der Inhibierung bzw. Stimulierung von Axl durch R428 bzw. Gas6 auf humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen untersucht.

Ergebnisse: Sowohl in den pulmonalarteriellen Gefäßen des MCT-Rattenmodells als auch in pulmonalarteriellen Gefäßen der humanen IPAH-Proben zeigten sich Gas6 und Axl teils signifikant erhöht gegenüber den gesunden Kontrollgruppen. In den verschiedenen Proliferationsmodellen (BrdU- und WST-Assay, sowie Immunfluoreszenz mit Ki-67) konnte eine dosisabhängige Senkung der Proliferation- und auch Zellviabilitätsrate in gesunden und IPAH-humanen pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen durch den Axl-Hemmstoff R428 induziert werden. Gas6 zeigte in gesunden hPASMC keine Stimulation der Proliferation.

Schlussfolgerung: Die vorliegende Arbeit stellt erstmalig einen Zusammenhang zwischen Gas6/Axl und der PH dar. Die gezielte Axl-Inhibierung könnte eine Therapie der PH supportiv ergänzen. Weiterführende Untersuchungen sollten die genauen Effekte der Axl-Stimulierung und -Inhibierung, sowie die dahinterstehenden Signalwege klären.

Summary

Background and aim of this study: Characteristics such as increased proliferation, resistance to apoptosis, angiogenesis, ability to migrate or to invade and further metabolic switches are similarities between pulmonary arterial hypertension (PAH) and malignancies. The receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 regulate diverse cellular processes like proliferation, cell survival, migration and protection from apoptosis. In malignant surrounding they regulate tumor progression, invasion, metastasis and therapeutic resistance. So far there is nothing known about the relation between pulmonary hypertension (PH) and Gas6/Axl. This study is the first to present data about Gas6/Axl and PH.

Methods: First, the expression of Gas6 and Axl was examined in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and subsequent in human idiopathic PAH (IPAH). This was tested with immunohistochemistry and following with polymerase chain reaction and immunoblotting. Second, on cellular level, the impact of Axl inhibition and stimulation on human pulmonary artery smooth muscle cells with R428 and Gas6, respectively, was investigated with proliferation and cell viability assay (BrdU and WST assay), and immunofluorescence with proliferation marker Ki-67.

Results: Both in pulmonary artery vessels of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats and in pulmonary artery vessels of human IPAH-patients, Gas6 and Axl expression was increased in comparison to control. The investigated models of proliferation (BrdU and WST assay, and immunofluorescence with Ki-67) showed decrease of proliferation and cell viability in healthy and IPAH pulmonary artery smooth muscle cells in a dose dependent manner by Axl inhibitor R428. Proliferation could not be induced by Axl ligand Gas6.

Conclusion: The present study is the first to establish a connection between Gas6/Axl and PH. Specific inhibition of Axl could be a supportive therapy for PH. Further investigation should target on the exact effects on stimulation and inhibition of Axl and on underlying signal pathways.

Abkürzungsverzeichnis

±	Plus/Minus
<	kleiner
>	größer
≤	kleiner oder gleich
≥	größer oder gleich
ALK1	Activin A Rezeptor ähnliche Kinase (engl. <i>Activin A receptor-like kinase 1</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser, aqua bidestillata
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
BM	Basalmedium (engl. <i>Basal Medium</i>)
BMPR2	Knochenmorphogenetisches Protein Rezeptor Typ 2 (engl. <i>bone morphogenetic protein receptor type 2</i>)
BrdU	Bromdesoxuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CAV1	Caveolin-1
cDNA	Komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CML	chronisch myeloische Leukämie
CYP 3A4	Cytochrom P ₄₅₀ 3A4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Dulbeccos phosphate buffered saline</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EIF2AK4	eukaryotische Translationsinitiations Faktor-2 alpha Kinase-4 (engl. <i>Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4</i>)
engl.	auf Englisch
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FCS	Fetales Kälberserum (engl. <i>Fetal Calf Serum</i>)

Abkürzungsverzeichnis

GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GM	Wachstumsmedium (engl. <i>Growth Medium</i>)
H ₂ O	Wasser
hEGF	humaner epidermaler Wachstumsfaktor (engl. <i>Epidermal Growth Factor</i>)
hFGF	humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl. <i>Fibroblast Growth Factor</i>)
hPASMC	humane pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. <i>human pulmonary artery smooth muscle cells</i>)
IPAH	Idiopathische pulmonale Hypertonie
KCNK3	Mitglied 3 der Kaliumkanal Unterfamilie K (engl. <i>Potassium channel subfamily K member 3</i>)
kDa	Kilodalton
KON	Kontrollgruppe
MCT	Monocrotalin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule
mPAP	mittlerer pulmonal arterieller Druck
NO	Stickstoffmonoxid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
o.g.	oben genannt
P.	Passage
PAH	pulmonal arterielle Hypertonie
PASMC	pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (engl. <i>Pulmonary artery smooth muscle cells</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
PGDF	Plättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (engl. <i>Platelet-derived growth factor</i>)
PH	pulmonale Hypertonie
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
RIPA	Radioimmunpräzipitations- Assay
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>Ribonucleic acid</i>)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>rounds per minute</i>)
RSTK	Rezeptor-Serin/Threoninkinase(n)

Abkürzungsverzeichnis

RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase(n)
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler (engl. <i>standard error of the mean</i>)
TBS	TRIS buffered saline
TBST	TRIS buffered saline in TWEEN 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGF-b	Transforming growth factor b
TGF-beta	transformierender Wachstumsfaktor (engl. <i>Transforming growth factor beta receptors</i>)
TK	Tyrosinkinase(n)
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor(en)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TWEEN 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
VEGF	Gefäßendothelialer Wachstumsfaktor (engl. <i>Vascular endothelial growth factor</i>)
vFGF	Basic fibroblast growth factor
vs	versus
VSMC	glatte Gefäßmuskelzelle(n)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau der TAM-Rezeptoren und ihres Liganden Gas6.	11
Abbildung 2: Die Aktivierung von Axl durch Gas6 führt zu Homodimerisierung und Aktivierung von Downstream-Signalkaskaden mit den jeweiligen funktionalen Konsequenzen.	14
Abbildung 3: Histologische Untersuchung der Axl- und Gas6-Expression in Lungengewebschnitten der Ratte.....	48
Abbildung 4: Axl- und Gas6-Proteinexpression in Lungenhomogenaten des MCT-Modells.....	49
Abbildung 5: Axl- und Gas6-Proteinexpression in Ratten-PASMC des MCT-Modells.	49
Abbildung 6: Axl- and Gas6-mRNA-Expression in humanen PASMC.	50
Abbildung 7: Axl- und Gas6-Proteinexpression in humanen PASMC.	51
Abbildung 8: Auswirkung der R428-Stimulation auf gesunde Spender-hPASMC.....	53
Abbildung 9: Auswirkung der R428-Stimulation auf erkrankte IPAH-hPASMC.....	54
Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung mit Ki-67 unter R428-Stimulation	55
Abbildung 11: Auswirkung der Gas6-Stimulation auf gesunde hPASMC.	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2013).....	4
Tabelle 2: Axl Tyrosinphosphorylierungsstellen und jeweilige Bindungspartner	12
Tabelle 3: Chemikalien, Puffer und Lösungen	18
Tabelle 4: Kits.....	20
Tabelle 5: Primärantikörper beim Western Blotting.....	20
Tabelle 6: Sekundärantikörper beim Western Blotting	21
Tabelle 7: Sonstige Antikörper und Färbemittel	21
Tabelle 8: Primersequenzen	22
Tabelle 9: Geräte.....	22
Tabelle 10: Sonstige Materialien	24
Tabelle 11: Medien und Reagenzien der Zellkulturexperimente	28
Tabelle 12: Zusammensetzung des cDNA Reaktionsgemisches A	34
Tabelle 13: Zusammensetzung des cDNA Reaktionsgemisches B	34
Tabelle 14: Komponenten des PCR-Reaktionsgemisches	35
Tabelle 15: qRT-PCR-Programm.....	35
Tabelle 16: Zusammensetzung des fünffachen SDS-Probenpuffers	36
Tabelle 17: Zusammensetzung des Laufpuffers	36
Tabelle 18: Zusammensetzung des Blottingpuffers	36
Tabelle 19: Zusammensetzung des 10%igen Trenngels	37
Tabelle 20: Zusammensetzung des 6%igen Sammelgels	37
Tabelle 21: Zusammensetzung des 20fachen TBS	37
Tabelle 22: Zusammensetzung des einfachen TBST	38
Tabelle 23: Inhalt des BrdU-Kits.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 24: Inhalt des WST-1-Kits.....	43
Tabelle 25: Vergleich zwischen Tiermodell und humaner PAH	60
Tabelle 26: Zusammenstellung der Substanzen, die einen Effekt auf die MCT-induzierte PH der Ratte haben	61
Tabelle 27: In klinischen Studien befindliche bzw. zugelassene Axl-Inhibitoren	63

Literaturverzeichnis

- [1] Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2011;8:443–55. doi:10.1038/nrcardio.2011.87.
- [2] Kovacs G, Berghold A, Scheidl S, Olschewski H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: A systematic review. *Eur Respir J* 2009;34:888–94. doi:10.1183/09031936.00145608.
- [3] Hoeper MM, Bogaard HJ, Condliffe R, Frantz R, Khanna D, Kurzyna M, et al. Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:D42–50. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.032.
- [4] Galiè N, Humbert M, Vachiéry J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* 2016;37:67–119. doi:10.1093/eurheartj/ehv317.
- [5] Hoeper MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med* 2016;4:306–22. doi:10.1016/S2213-2600(15)00543-3.
- [6] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.029.
- [7] Hoeper MM, Huscher D, Pittrow D. Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension in Germany. *Int J Cardiol* 2017;203:612–3. doi:10.1016/j.ijcard.2015.11.001.
- [8] Hoeper MM, Ghofrani H-A, Grünig E, Klose H, Olschewski H, Rosenkranz S. Pulmonale Hypertonie. *Dtsch Arztebl Int* 2017;73–84. doi:10.3238/arztebl.2016.0073.
- [9] Herold G und M. Pulmonale Hypertonie (PH) und Cor Pulmonale Chronicum (CPC). *Inn. Medizin* 2013, Köln: Herold, G.; 2013, p. 407 – 410.
- [10] Ehlken N, Lichtblau M, Klose H, Weidenhammer J, Fischer C, Nechwatal R, et al. Exercise training improves peak oxygen consumption and haemodynamics in patients with severe pulmonary arterial hypertension and inoperable chronic

- thrombo-embolic pulmonary hypertension: A prospective, randomized, controlled trial. *Eur Heart J* 2016;37:35–44. doi:10.1093/eurheartj/ehv337.
- [11] Tuder RM, Archer SL, Dorfmueller P, Erzurum SC, Guignabert C, Michelakis E, et al. Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.025.
- [12] Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. *Annu Rev Pathol* 2007;2:369–99. doi:10.1146/annurev.pathol.2.010506.092033.
- [13] Rosenkranz S. Pulmonale Hypertonie. *Klin. Kardiol.*, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Erdmann, E.; 2011, p. 309–34. doi:10.1007/978-3-642-16481-1_11.
- [14] Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, et al. An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 1992;327:70–5. doi:10.1056/NEJM199207093270202.
- [15] Galiè N, Manes A, Branzi A. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2004;61:227–37. doi:10.1016/j.cardiores.2003.11.026.
- [16] Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1377–83. doi:10.1164/rccm.200712-1807OC.
- [17] Girerd B, Montani D, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Coulet F, et al. Absence of influence of gender and BMPR2 mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. *Respir Res* 2010;11:73. doi:10.1186/1465-9921-11-73.
- [18] Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, et al. Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:S32–42. doi:10.1016/j.jacc.2009.04.015.
- [19] Thomson J, Machado R, Pauciulo M, Morgan N, Humbert M, Elliott G, et al. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF- β family. *J Med Genet* 2000;37:741–5. doi:10.1136/jmg.37.10.741.

- [20] Harrison R, Flanagan J, Sankelo M, Abdalla S, Rowell J, Machado R, et al. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet* 2003;40:865–71. doi:10.1136/jmg.40.12.865.
- [21] Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2014;46:65–9.
- [22] Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, et al. A Novel Channelopathy in Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2013;369:351–61. doi:10.1056/NEJMoa1211097.
- [23] Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grünig E, Aldred M, Geraci M, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.035.
- [24] Rich S, Kaufmann E, Levy PS. The Effect of High Doses of Calcium-Channel Blockers on Survival in Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 1992;327:76–81. doi:10.1056/NEJM199207093270203.
- [25] Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, Iosif V, Hamid AM, Provencher S, et al. Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2005;111:3105 LP-3111.
- [26] Galiè N, Olschewski H, Oudiz RJ, Torres F, Frost A, Ghofrani HA, et al. Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2008;117:3010 LP-3019.
- [27] Channick RN, Simonneau G, Sitbon O, Robbins IM, Frost A, Tapson VF, et al. Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebocontrolled study. *Lancet* 2001;358:1119–23. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(01)06250-X.
- [28] Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galiè N, Black CM, Keogh A, et al. Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2002;346:896–903. doi:10.1056/NEJMoa012212.
- [29] Humbert M, Barst RJ, Robbins IM, Channick RN, Galiè N, Boonstra A, et al. Combination of bosentan with epoprostenol in pulmonary arterial hypertension:

- BREATHE-2. *Eur Respir J* 2004;24:353 LP-359.
- [30] Galiè N, Rubin LJ, Hoeper MM, Jansa P, Al-Hiti H, Meyer GMB, et al. Treatment of patients with mildly symptomatic pulmonary arterial hypertension with bosentan (EARLY study): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2008;371:2093–100. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60919-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60919-8).
- [31] Mehta S, Sastry BKS, Souza R, Torbicki A, Ghofrani H-A, Channick RN, et al. Macitentan Improves Health-Related Quality of Life for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: Results From the Randomized Controlled SERAPHIN Trial. *Chest* 2017;151:106–18. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2016.08.1473>.
- [32] Wharton J, Strange JW, Møller GMO, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, et al. Antiproliferative Effects of Phosphodiesterase Type 5 Inhibition in Human Pulmonary Artery Cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:105–13. doi:10.1164/rccm.200411-1587OC.
- [33] Tantini B, Manes A, Fiumana E, Pignatti C, Guarnieri C, Zannoli R, et al. Antiproliferative effect of sildenafil on human pulmonary artery smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol* 2005;100:131–8. doi:10.1007/s00395-004-0504-5.
- [34] Ghofrani H-A, Galiè N, Grimminger F, Grünig E, Humbert M, Jing Z-C, et al. Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N Engl J Med* 2013;369:330–40. doi:10.1056/NEJMoa1209655.
- [35] Galiè N, Humbert M, Vachiéry J-L, Vizza C, Kneussl M, Manes A, et al. Effects of beraprost sodium, an oral prostacyclin analogue, in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1496–502. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(02\)01786-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(02)01786-2).
- [36] Barst RJ, McGoon M, McLaughlin V, Tapson V, Oudiz R, Shapiro S, et al. Beraprost therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:2119–25. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(03\)00463-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(03)00463-7).
- [37] Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, et al. A Comparison of Continuous Intravenous Epoprostenol (Prostacyclin) with Conventional Therapy for Primary Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 1996;334:296–301. doi:10.1056/NEJM199602013340504.

- [38] Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, et al. Inhaled Iloprost for Severe Pulmonary Hypertension. *N Engl J Med* 2002;347:322–9. doi:10.1056/NEJMoa020204.
- [39] McLaughlin V V, Oudiz RJ, Frost A, Tapson VF, Murali S, Channick RN, et al. Randomized Study of Adding Inhaled Iloprost to Existing Bosentan in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1257–63. doi:10.1164/rccm.200603-358OC.
- [40] Müller-Newen G, Heinrich PC, Hermanns HM, Schaper F, Gerhard Müller-Newen, Peter C. Heinrich, Heike M. Hermanns FS. 33 Prinzipien zellulärer Kommunikation. Löffler / Petrides *Biochem. und Pathobiochemie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve; 2014, p. 393–406. doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- [41] Peter C. Heinrich, Serge Haan, Heike M. Hermanns, Gerhard Müller-Newen FS. Rezeptoren und ihre Signaltransduktion. Löffler/Petrides *Biochem. und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve; 2014, p. 411–41. doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- [42] Robinson DR, Wu Y-M, Lin S-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000;19:5548–57. doi:10.1038/sj.onc.1203957.
- [43] von Bubnoff N, Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107:114–21. doi:10.3238/arztebl.2010.0114.
- [44] Peter C. Heinrich, Serge Haan, Heike M. Hermanns, Gerhard Müller-Newen FS. Mediatoren. Löffler/Petrides *Biochem. und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve; 2014, p. 407–10. doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- [45] Geiger R, Berger RM, Hess J, Bogers AJ, Sharma HS, Mooi WJ. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *JPathol* 2000;191:202–7.
- [46] Tuder RM, Chacon M, Alger L, Wang J, Taraseviciene-stewart L, Kasahara Y, et al. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: Evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol* 2001;195:367–74. doi:10.1002/path.953.

- [47] Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, et al. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J* 1998;11:554 LP-559.
- [48] Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–21. doi:10.1172/JCI24838.
- [49] Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselien I, Tcherakian C, Le Pavec J, et al. Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:81–8. doi:10.1164/rccm.200707-1037OC.
- [50] Benisty JI, McLaughlin V V, Landzberg MJ, Rich JD, Newburger JW, Rich S, et al. Elevated Basic Fibroblast Growth Factor Levels in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2004;126:1255–61. doi:http://dx.doi.org/10.1378/chest.126.4.1255.
- [51] Le Cras TD, Hardie WD, Fagan K, Whitsett JA, Korfhagen TR. Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor- α . *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L1046 LP-L1054.
- [52] Warburg O. Warburg Report on the Metabolism of Tumors. *J Chem Educ* 1930;7:179–80.
- [53] Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 2007;104:1342–7. doi:10.1073/pnas.0605080104.
- [54] Hirota S, Ohashi A, Nishida T, Isozaki K, Kinoshita K, Shinomura Y, et al. Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor α gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125:660–7. doi:https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01046-1.
- [55] Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, et al. Amplification and/or Overexpression of Platelet-derived Growth Factor Receptors and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Glial Tumors. *Cancer Res* 1992;52:4550 LP-4553.

- [56] Kumabe T, Sohma Y, Kayama T, Yoshimoto T YT. Amplification of alpha-platelet-derived growth factor receptor gene lacking an exon coding for a portion of the extracellular region in a primary brain tumor of glial origin. *Oncogene* 1992;7:627–33.
- [57] Puputti M, Tynninen O, Sihto H, Blom T, Mäenpää H, Isola J, et al. Amplification of KIT, PDGFRA, VEGFR2, and EGFR in Gliomas. *Mol Cancer Res* 2006;4:927 LP-934.
- [58] Smith JS, Wang XY, Qian J, Hosek SM, Scheithauer BW, Jenkins RB JC. Amplification of the platelet-derived growth factor receptor-A (PDGFRA) gene occurs in oligodendrogliomas with grade IV anaplastic features. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:495–503.
- [59] Dewaele B, Floris G, Finalet-Ferreiro J, Fletcher CD, Coindre J-M, Guillou L, et al. Coactivated Platelet-Derived Growth Factor Receptor α and Epidermal Growth Factor Receptor Are Potential Therapeutic Targets in Intimal Sarcoma. *Cancer Res* 2010;70:7304 LP-7314.
- [60] Fijalkowska I, Xu W, Comhair SAA, Janocha AJ, Mavrakis LA, Krishnamachary B, et al. Hypoxia inducible-factor1 alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *Am J Pathol* 2010;176:1130–8. doi:10.2353/ajpath.2010.090832.
- [61] Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1alpha-Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Hear Circ Physiol* 2008;294:H570-8. doi:10.1152/ajpheart.01324.2007.
- [62] Burkhard Brandt PEP. Spezifische Tumore – Entstehung, Progression und Therapie. Löffler / Petrides *Biochem. und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve; 2014, p. 649–59. doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- [63] McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, et al. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2005;115:1479–91. doi:10.1172/JCI23203.

- [64] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70. doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
- [65] Yeager ME, Halley GR, Golpon HA, Voelkel NF, Tudor RM. Microsatellite Instability of Endothelial Cell Growth and Apoptosis Genes Within Plexiform Lesions in Primary Pulmonary Hypertension. *Circ Res* 2001;88:e2 LP-e11.
- [66] Dewachter L, Adnot S, Fadel E, Humbert M, Maitre B, Barlier-Mur A-M, et al. Angiopoietin/Tie2 Pathway Influences Smooth Muscle Hyperplasia in Idiopathic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:1025–33. doi:10.1164/rccm.200602-304OC.
- [67] Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol* 1997;150:1349–60.
- [68] Masri FA, Xu W, Comhair SAA, Asosingh K, Koo M, Vasanji A, et al. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:L548 LP-L554.
- [69] Tudor RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994;144:275–85.
- [70] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [71] Friedl P, Bröcker EB. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:41–64. doi:10.1007/s000180050498.
- [72] Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003;3:362–74. doi:10.1038/nrc1075.
- [73] Hanahan D, Folkman J. Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch during Tumorigenesis. *Cell* 2017;86:353–64. doi:10.1016/S0092-8674(00)80108-7.
- [74] Gomberg-Maitland M, Bull TM, Saggar R, Barst RJ, Elgazayerly A, Fleming TR,

- et al. New trial designs and potential therapies for pulmonary artery hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2013;62. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.026.
- [75] O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11:5016–31. doi:10.1128/MCB.11.10.5016.Updated.
- [76] Liu E, Hjelle B, Bishop JM. Transforming genes in chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:1952–6.
- [77] Ohashi K, Mizuno K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T. Cloning of the cDNA for a novel receptor tyrosine kinase, Sky, predominantly expressed in brain. *Oncogene* 1994;3:699–705.
- [78] Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell Growth Differ* 1994;5:647–57.
- [79] Axelrod H, Pienta KJ. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget* 2014;5:8818–52. doi:10.18632/oncotarget.2422.
- [80] Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988;54:787–93. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(88)91065-3.
- [81] Müller-Newen G, Petrides PE. *Blut – Thrombocyten und Leukocyten*. Löffler/Petrides *Biochem. und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg: Peter C. Heinrich, Matthias Müller, Lutz Graeve; 2014, p. 877–92. doi:10.1007/978-3-642-17972-3.
- [82] Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 1993;13:4976–85.
- [83] Hafizi S, Dahlbäck B. Gas6 and protein S: Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J* 2006;273:5231–44. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05529.x.

- [84] Friedman PA, Przysiecki CT. Vitamin K-dependent carboxylation. *Int J Biochem* 1987;19:1–7.
- [85] Ekman C, Stenhoff J, Dahlbäck B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J Thromb Haemost* 2010;8:838–44. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03752.x.
- [86] Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlbäck B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1280–6. doi:10.1161/01.ATV.0000163845.07146.48.
- [87] Griffin JH, Gruber A, Fernandez JA. Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood* 1992;79:3203 LP-3211.
- [88] Burchert a, Attar EC, McCloskey P, Fridell YW, Liu ET. Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 1998;16:3177–87. doi:10.1038/sj.onc.1201865.
- [89] Bellosta P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Mol Cell Biol* 1995;15:614–25.
- [90] Pierce A, Bliesner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S, et al. Axl and Tyro3 Modulate Female Reproduction by Influencing Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Survival and Migration. *Mol Endocrinol* 2008;22:2481–95. doi:10.1210/me.2008-0169.
- [91] Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *J Immunol* 2007;178:5635 LP-5642.
- [92] Meyer AS, Miller MA, Gertler FB, Lauffenburger DA. The Receptor AXL Diversifies EGFR Signaling and Limits the Response to EGFR-Targeted Inhibitors in Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Sci Signal* 2013;6:ra66-ra66. doi:10.1126/scisignal.2004155.
- [93] Konishi A, Aizawa T, Mohan A, Korshunov VA, Berk BC. Hydrogen peroxide activates the Gas6-Axl pathway in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2004;279:28766–70. doi:10.1074/jbc.M401977200.

- [94] Huang J-S, Cho C-Y, Hong C-C, Yan M-D, Hsieh M-C, Lay J-D, et al. Oxidative stress enhances Axl-mediated cell migration through an Akt1/Rac1-dependent mechanism. *Free Radic Biol Med* 2013;65:1246–56. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.011>.
- [95] Ruan G-X, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt. *EMBO J* 2012;31:1692–703. doi:10.1038/emboj.2012.21.
- [96] Braunger J, Schleithoff L, Schulz a S, Kessler H, Lammers R, Ullrich a, et al. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene* 1997;14:2619–31. doi:10.1038/sj.onc.1201123.
- [97] Son B-K, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ota H, et al. Statins Protect Human Aortic Smooth Muscle Cells From Inorganic Phosphate-Induced Calcification by Restoring Gas6-Axl Survival Pathway. *Circ Res* 2006;98:1024 LP-1031.
- [98] D’Arcangelo D, Ambrosino V, Giannuzzo M, Gaetano C, Capogrossi MC. Axl receptor activation mediates laminar shear stress anti-apoptotic effects in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2006;71:754–63. doi:10.1016/j.cardiores.2006.06.002.
- [99] Healy AM, Schwartz JJ, Zhu X, Herrick BE, Varnum B, Farber HW. Gas 6 promotes Axl-mediated survival in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L1273 LP-L1281.
- [100] Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai L-K, Jin Z-G, Haendeler J, et al. Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:881–7. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2004.06.018>.
- [101] Hasanbasic I, Cuerquis J, Varnum B, Blostein MD. Intracellular signaling pathways involved in Gas6-Axl-mediated survival of endothelial cells. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 2004;287:H1207 LP-H1213.
- [102] Fridell YW, Villa JJ, Attar EC, Liu ET. GAS6 Induces Axl-mediated Chemotaxis of Vascular Smooth Muscle Cells * 1998;273:7123–6.
- [103] Cavet ME, Smolock EM, Menon P, Konishi A, Korshunov VA, Berk BC. Gas6-Axl pathway: The role of redox-dependent association of Axl with non-muscle myosin IIB. *Hypertension* 2010;56:105–11.

doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.144642.

- [104] Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA, Berk BC. Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* 2006;98:1446–52. doi:10.1161/01.RES.0000223322.16149.9a.
- [105] Korshunov VA, Daul M, Massett MP, Berk BC. Axl Mediates Vascular Remodeling Induced by Deoxycorticosterone Acetate–Salt Hypertension. *Hypertension* 2007;50:1057 LP-1062.
- [106] O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of Receptor Tyrosine Kinase Axl and its Ligand Gas6 in Rheumatoid Arthritis : Evidence for a Novel Endothelial Cell Survival Pathway. *Am J Pathol* 1999;154:1171–80.
- [107] Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J Clin Invest* 2005;115:237–46. doi:10.1172/JCI200522079.
- [108] Saller F, Burnier L, Schapira M, Angelillo-Scherrer A. Role of the growth arrest-specific gene 6 (gas6) product in thrombus stabilization. *Blood Cells, Mol Dis* 2006;36:373–8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bcmed.2005.12.038.
- [109] Cosemans JMEM, Van Kruchten R, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix ICA, et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *J Thromb Haemost* 2010;8:1797–808. doi:10.1111/j.1538-7836.2010.03935.x.
- [110] Singh R, Goff D, Yu J, Holland, Heckrodt, Ding P. Polycyclic heteroaryl substituted triazoles useful as Axl inhibitors. United States patent 20080188455., 2011. doi:10.1016/j.(73).
- [111] Feneyrolles C, Spenlinhauer A, Guiet L, Fauvel B, Daydé-Cazals B, Warnault P, et al. Axl Kinase as a Key Target for Oncology: Focus on Small Molecule Inhibitors. *Mol Cancer Ther* 2014;13:2141 LP-2148.
- [112] Gay CM, Balaji K, Byers LA. Giving AXL the axe: targeting AXL in human malignancy. *Br J Cancer* 2017;116:415–23. doi:10.1038/bjc.2016.428.
- [113] Zhang Y, Tang Y-J, Man Y, Pan F, Li Z-H, Jia L-S. Knockdown of AXL Receptor

- Tyrosine Kinase in Osteosarcoma Cells Leads to Decreased Proliferation and Increased Apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013;26:179–88. doi:10.1177/039463201302600117.
- [114] Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol* 2005;204:36–44. doi:10.1002/jcp.20265.
- [115] Paccetz JD, Vasques GJ, Correa RG, Vasconcellos JF, Duncan K, Gu X, et al. The tyrosine receptor kinase of Axl is an essential regulator of prostate cancer proliferation and tumor growth and represents a new therapeutic target. *Oncogene* 2013;32:689–98. doi:10.1038/onc.2012.89.
- [116] Ou W-B, Corson JM, Flynn DL, Lu W-P, Wise SC, Bueno R, et al. AXL regulates mesothelioma proliferation and invasiveness. *Oncogene* 2011;30:1643–52.
- [117] Cui Z-L, Han F-F, Peng X-H, Chen X, Luan C-Y, Han R-C, et al. Yes-Associated Protein 1 Promotes Adenocarcinoma Growth and Metastasis through Activation of the Receptor Tyrosine Kinase Axl. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2012;25:989–1001. doi:10.1177/039463201202500416.
- [118] Yuen H-F, McCrudden CM, Huang Y-H, Tham JM, Zhang X, Zeng Q, et al. TAZ Expression as a Prognostic Indicator in Colorectal Cancer. *PLoS One* 2013;8:e54211. doi:10.1371/journal.pone.0054211.
- [119] Byers LA, Diao L, Wang J, Saintigny P, Girard L, Peyton M, et al. An epithelial-mesenchymal transition (EMT) gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res* 2013;19:279–90. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1558.
- [120] Zhang Z, Lee JC, Lin L, Olivas V, Au V, LaFramboise T, et al. Activation of the AXL Kinase Causes Resistance to EGFR-Targeted Therapy in Lung Cancer. *Nat Genet* 2012;44:852–60. doi:10.1038/ng.2330.
- [121] Asiedu MK, Beauchamp-perez FD, Ingle JN, Behrens MD, Radisky DC, Knutson KL, et al. AXL induces epithelial to mesenchymal transition and regulates the function of breast cancer stem cells. *Oncogene* 2014;33:1316–24. doi:10.1038/onc.2013.57.

- [122] Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S, Eastham-Anderson J, Kallop D, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene* 2010;29:5254–64.
- [123] Li Y, Ye X, Tan C, Hongo J-A, Zha J, Liu J, et al. Axl as a potential therapeutic target in cancer: role of Axl in tumor growth, metastasis and angiogenesis. *Oncogene* 2009;28:3442–55.
- [124] Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:1544–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2997.
- [125] Heckmann D, Maier P, Laufs S, Li L, Sleeman JP, Trunk MJ, et al. The Disparate Twins: A Comparative Study of CXCR4 and CXCR7 in SDF-1 α -Induced Gene Expression, Invasion and Chemosensitivity of Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:604 LP-616.
- [126] Kim KC, Baek SH, Lee C. Curcumin-induced downregulation of Axl receptor tyrosine kinase inhibits cell proliferation and circumvents chemoresistance in non-small Lung cancer cells. *Int J Oncol* 2015;47:2296–303. doi:10.3892/ijo.2015.3216.
- [127] Mahadevan D, Theiss N, Morales C, Stejskal AE, Cooke LS, Zhu M, et al. Novel receptor tyrosine kinase targeted combination therapies for imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors (GIST). *Oncotarget* 2015;6:1954–66.
- [128] Dufies M, Jacquel A, Belhacene N, Robert G, Cluzeau T, Luciano F, et al. Mechanisms of AXL overexpression and function in Imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells. *Oncotarget* 2011;2:874–85.
- [129] Ishikawa M, Sonobe M, Nakayama E, Kobayashi M, Kikuchi R, Kitamura J, et al. Higher Expression of Receptor Tyrosine Kinase Axl, and Differential Expression of its Ligand, Gas6, Predict Poor Survival in Lung Adenocarcinoma Patients. *Ann Surg Oncol* 2013;20:467–76. doi:10.1245/s10434-012-2795-3.
- [130] Shieh Y-S, Lai C-Y, Kao Y-R, Shiah S-G, Chu Y-W, Lee H-S, et al. Expression of Axl in Lung Adenocarcinoma and Correlation with Tumor Progression. *Neoplasia* 2005;7:1058–64.

- [131] Tanaka K, Tokunaga E, Inoue Y, Yamashita N, Saeki H, Okano S, et al. Impact of Expression of Vimentin and Axl in Breast Cancer. *Clin Breast Cancer* 2016;16:520–526.e2. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.clbc.2016.06.015>.
- [132] Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, et al. Axl and Growth Arrest–Specific Gene 6 Are Frequently Overexpressed in Human Gliomas and Predict Poor Prognosis in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Clin Cancer Res* 2008;14:130 LP-138.
- [133] Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle H-H, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, et al. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:5799–804. doi:10.1073/pnas.0510923103.
- [134] Dunne PD, McArt DG, Blayney JK, Kalimutho M, Greer S, Wang T, et al. AXL is a key regulator of inherent and chemotherapy-induced invasion and predicts a poor clinical outcome in early stage colon cancer. *Clin Cancer Res* 2014;20:10.1158/1078-0432.CCR-13-1354. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1354.
- [135] Ben-batalla I, Schultze A, Wroblewski M, Erdmann R, Heuser M, Waizenegger S, et al. Axl , a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells with bone marrow stroma Axl , a prognostic and therapeutic target in acute myeloid leukemia mediates paracrine crosstalk of leukemia cells w 2013;122:2443–52. doi:10.1182/blood-2013-03-491431.
- [136] Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, et al. Increased Expression of Axl Tyrosine Kinase After Vascular Injury and Regulation by G Protein–Coupled Receptor Agonists in Rats. *Circ Res* 1998;83:697 LP-704.
- [137] Kay JM, Harris P, Heath D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* 1967;22:176–9.
- [138] Gomez-Arroyo JG, Farkas L, Alhussaini AA, Farkas D, Kraskauskas D, Voelkel NF, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2012;302:L363 LP-L369. doi:10.1152/ajplung.00212.2011.
- [139] Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and

- pharmacological cure. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L1013 LP-L1032. doi:10.1152/ajplung.00217.2009.
- [140] Roth RA, Dotzlaw LA, Baranyi B, Kuo C-H, Hook JB. Effect of monocrotaline ingestion on liver, kidney, and lung of rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1981;60:193–203. doi:https://doi.org/10.1016/0041-008X(91)90223-2.
- [141] Jasmin J-F, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a Nonselective ET-A/B and a Selective ET-A Antagonist in Rats With Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2001;103:314 LP-318.
- [142] Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* 1980;239:H692–702.
- [143] Hecker FK. Mortalität und prognostische Parameter bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie. Justus-Liebig-Universität Gießen, 2013.
- [144] Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Dartevelle P, Simonneau G, et al. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:311–22. doi:10.1165/rcmb.2010-0317OC.
- [145] Michelakis ED, McMurtry MS, Wu X-C, Dyck JRB, Moudgil R, Hopkins TA, et al. Dichloroacetate, a Metabolic Modulator, Prevents and Reverses Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation* 2002;105:244 LP-250.
- [146] Grimminger F, Schermuly RT, Ghofrani HA. Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors 2010;9. doi:10.1038/nrd3297.
- [147] Hochhaus AA, Baerlocher G, Brümmendorf TH, Coutre P, Dölken G, Thiede C, et al. Chronische Myeloische Leukämie (CML). *Onkopedia* 2013:1–28.
- [148] Dagher, R., Cohen, M., Williams, G., Rothmann, M., Gobburu, J., Robbie, G., Rahman, A., Chen, G., Staten, A., Griebel, D., Pazdur R. Approval summary: Imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 2002;8:3034–8.
- [149] Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov*

2002;1:493.

- [150] Grimminger F, Schermuly RT. PDGF Receptor and its Antagonists: Role in Treatment of PAH. In: Yuan JX-J, Ward JPT, editors. *Membr. Recept. Channels Transp. Pulm. Circ.*, Totowa, NJ: Humana Press; 2010, p. 435–46. doi:10.1007/978-1-60761-500-2_28.
- [151] Hoepfer MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, et al. Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Randomized IMPRES Study. *Circulation* 2013;127:1128 LP-1138.
- [152] M Gombert-Maitland, ML Maitland, RJ Barst, L Sugeng, S Coslet, TJ Perrino L, Bond, ME LaCouture, SL Archer MR. A Dosing/Cross-Development Study of the Multikinase Inhibitor Sorafenib in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87:303–10. doi:10.1038/clpt.2009.217.A.
- [153] Kimura G, Kataoka M, Inami T, Fukuda K, Yoshino H, Satoh T. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics Sorafenib as a potential strategy for refractory pulmonary arterial hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 2017;44:46–9. doi:10.1016/j.pupt.2017.03.009.
- [154] Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD, et al. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L238 LP-L250. doi:10.1152/ajplung.90591.2008.
- [155] Drexler ES, Bischoff JE, Slifka AJ, McCowan CN, Quinn TP, Shandas R, et al. Stiffening of the Extrapulmonary Arteries From Rats in Chronic Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J Res Natl Inst Stand Technol* 2008;113:239–49. doi:10.6028/jres.113.018.
- [156] Dempsey EC, Wick MJ, Karoor V, Barr EJ, Tallman DW, Wehling CA, et al. Nephrysin Null Mice Develop Exaggerated Pulmonary Vascular Remodeling in Response to Chronic Hypoxia. *Am J Pathol* 2009;174:782–96. doi:10.2353/ajpath.2009.080345.
- [157] Frank DB, Lowery J, Anderson L, Brink M, Reese J, de Caestecker M. Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in *Bmpr2* mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2008;294:L98 LP-L109.

- [158] Nozik-Grayck E, Suliman HB, Majka SM, Albiets J, Van Rheen Z, Roush K, et al. Lung EC-SOD Overexpression Attenuates Hypoxic Induction of Egr-1 and Chronic Hypoxic Pulmonary Vascular Remodeling. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol* 2008.
- [159] Bauer NR, Moore TM, Mcmurtry IF. Rodent models of PAH: are we there yet? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;293:580–2. doi:10.1152/ajplung.00281.2007.
- [160] Heath D. The rat is a poor animal model for the study of human pulmonary hypertension. *Cardioscience* 1992;3:1–6.
- [161] Voelkel NF, Tuder RM. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J Clin Invest* 2000;106:733–8.
- [162] White RJ. Pulmonary arterial hypertension: building a better mouse trap for 2010. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2004;1:351–9. doi:https://doi.org/10.1016/j.ddstr.2004.11.008.
- [163] Zaiman A, Fijalkowska I, Hassoun PM, Tuder RM. One Hundred Years of Research in the Pathogenesis of Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33:425–31. doi:10.1165/rcmb.F307.
- [164] Rondelet B, Kerbaul F, Motte S, van Beneden R, Rimmelink M, Brimiouille S, et al. Bosentan for the Prevention of Overcirculation-Induced Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* 2003;107:1329 LP-1335.
- [165] Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, et al. Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Requires Recruitment of Circulating Mesenchymal Precursors of a Monocyte/Macrophage Lineage. *Am J Pathol* 2006;168:659–69. doi:10.2353/ajpath.2006.050599.
- [166] Dumitrascu R, Koebrich S, Dony E, Weissmann N, Savai R, Pullamsetti SS, et al. Characterization of a murine model of monocrotaline pyrrole-induced acute lung injury. *BMC Pulm Med* 2008;8:25. doi:10.1186/1471-2466-8-25.
- [167] Wilson DW, Segall HJ, Pan LCW, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 1989;38:57–80. doi:https://doi.org/10.1016/0026-2862(89)90017-4.

- [168] Meyrick BO, Reid LM. Crotalaria-induced pulmonary hypertension. Uptake of 3H-thymidine by the cells of the pulmonary circulation and alveolar walls. *Am J Pathol* 1982;106:84–94.
- [169] JL L, WD J, TJ R, RC S. Fibrin thrombosis in monocrotaline pyrrole-induced cor pulmonale in rats. *Arch Pathol Lab Med* 1977;101:69–73.
- [170] Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, et al. Long-Term Treatment With a Rho-Kinase Inhibitor Improves Monocrotaline-Induced Fatal Pulmonary Hypertension in Rats. *Circ Res* 2004;94:385 LP-393.
- [171] Baber SR, Deng W, Master RG, Bunnell BA, Taylor BK, Murthy SN, et al. Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Circ Physiol* 2007;292:H1120–8. doi:10.1152/ajpheart.00173.2006.
- [172] Richard C. Baybutt, Betty L. Herndon, Joshua Umbehr, Jonathan Mein, Yuan Xue, Sara Reppert, Christine Van Dillen, Robin Kamal, Anirudha Halder AM. Effects on Cytokines and Histology by Treatment with the Ace Inhibitor Captopril and the Antioxidant Retinoic Acid in the Monocrotaline Model of Experimentally Induced Lung Fibrosis. *Curr Pharm Des* 2007;13:1327–33. doi:10.2174/138161207780618803.
- [173] Clozel M, Hess P, Rey M, Iglarz M, Binkert C QC. Bosentan, sildenafil, and their combination in the monocrotaline model of pulmonary hypertension in rats. *Exp Biol Med* 2006;231:967–73.
- [174] Cui B, Cheng Y-S, Dai D-Z, Li N, Zhang T-T, Dai Y. CPU0213, A NON-SELECTIVE ET_A/ET_B RECEPTOR ANTAGONIST, IMPROVES PULMONARY ARTERIOLAR REMODELING OF MONOCROTALINE-INDUCED PULMONARY HYPERTENSION IN RATS. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:169–75. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.05044.x.
- [175] Hsu H-H, Ko W-J, Hsu J-Y, Chen J-S, Lee Y-C, Lai I-R, et al. Simvastatin ameliorates established pulmonary hypertension through a heme oxygenase-1 dependent pathway in rats. *Respir Res* 2009;10:32. doi:10.1186/1465-9921-10-32.
- [176] Itoh T, Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Nakanishi N, Hamada K, et al. A Combination of Oral Sildenafil and Beraprost Ameliorates Pulmonary Hypertension in Rats. *Am*

- J Respir Crit Care Med 2004;169:34–8. doi:10.1164/rccm.200303-346OC.
- [177] Izikki M, Raffestin B, Klar J, Hatzelmann A, Marx D, Tenor H, et al. Effects of Roflumilast, a Phosphodiesterase-4 Inhibitor, on Hypoxia- and Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2009;330:54 LP-62.
- [178] Kang KK, Ahn GJ, Sohn YS, Ahn BO, Kim WB. DA-8159, a New PDE5 Inhibitor, Attenuates the Development of Compensatory Right Ventricular Hypertrophy in a Rat Model of Pulmonary Hypertension. *J Int Med Res* 2003;31:517–28. doi:10.1177/147323000303100608.
- [179] Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, Kishida K, Watanabe F, Furuya E, et al. Implantation of Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase Improves Right Ventricular Impairments Caused by Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2006;114:I-181 LP-I-185.
- [180] Kanno S, Wu Y-JL, Lee PC, Billiar TR, Ho C. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Preserves p21 and Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression in Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circulation* 2001;104:945 LP-950.
- [181] Kato T, Kitamura H, Kanisawa M. Comparative effects of isosorbide dinitrate, prednisolone, indomethacin, and elastase on the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Exp Mol Pathol* 1989;50:303–15. doi:[https://doi.org/10.1016/0014-4800\(89\)90040-3](https://doi.org/10.1016/0014-4800(89)90040-3).
- [182] Kato T, Nasu T, Sonoda H, Ito KM, Ikeda M, Ito K. Evaluation of Olmesartan Medoxomil in the Rat Monocrotaline Model of Pulmonary Hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2008;51:18–23.
- [183] Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal Growth Factor Receptor Blockade Mediates Smooth Muscle Cell Apoptosis and Improves Survival in Rats With Pulmonary Hypertension. *Circulation* 2005;112:423 LP-431.
- [184] Mitani Y, Mutlu A, Russell JC, Brindley DN, DeAlmeida J, Rabinovitch M. Dexfenfluramine protects against pulmonary hypertension in rats. *J Appl Physiol* 2002;93:1770–8. doi:10.1152/jappphysiol.00500.2002.
- [185] Molteni A, Ward WF, Ts'ao C SN. Monocrotaline-induced cardiopulmonary injury

- in rats: modification by the nonthiol ACE inhibitors CGS13945 and CGS16617. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1988;291:21–40.
- [186] Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, Vaszar LT, Qiu D, Pearl RG, et al. Simvastatin attenuates smooth muscle neointimal proliferation and pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166. doi:10.1164/rccm.200203-268OC.
- [187] Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, Takeshita S, Mori H, Kodama M, et al. Single Injection of a Sustained-release Prostacyclin Analog Improves Pulmonary Hypertension in Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:195–201. doi:10.1164/rccm.200703-349OC.
- [188] Satoh M, Satoh A. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-COA reductase inhibitors and phosphodiesterase type V inhibitors attenuate right ventricular pressure and remodeling in a rat model of pulmonary hypertension. *J Pharm Pharm Sci* 2008;11:118s–130s.
- [189] Sun C-K, Yuen C-M, Kao Y-H, Chang L-T, Chua S, Sheu J-J, et al. Propylthiouracil Attenuates Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Circ J* 2009;73:1722–30. doi:10.1253/circj.CJ-09-0074.
- [190] Tawara S, Fukumoto Y, Shimokawa H, Tawara, Shunsuke MS; Fukumoto, Yoshihiro MD, PhD; Shimokawa, Hiroaki MD P. Effects of Combined Therapy With a Rho-Kinase Inhibitor and Prostacyclin on Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2007;50:195–200.
- [191] Xia L, Fu G-S, Yang J-X, Zhang F-R, Wang X-X. Endothelial progenitor cells may inhibit apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells: new insights into cell therapy for pulmonary arterial hypertension. *Cytotherapy* 2017;11:492–502. doi:10.1080/14653240902960460.
- [192] Zhou H, Liu H, Porvasnik SL, Terada N, Agarwal A, Cheng Y, et al. Heme oxygenase-1 mediates the protective effects of rapamycin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Lab Invest* 2006;86. doi:10.1038/labinvest.3700361.
- [193] Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, et al. Resveratrol Prevents Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Hypertension* 2009;54:668 LP-675. doi:https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.133397.

- [194] Guignabert C, Raffestin B, Benferhat R, Raoul W, Zadigue P, Rideau D, et al. Serotonin Transporter Inhibition Prevents and Reverses Monocrotaline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats. *Circulation* 2005;111:2812 LP-2819.
- [195] Ito T, Okada T, Mimuro J, Miyashita H, Uchibori R, Urabe M, et al. Adenoassociated Virus–Mediated Prostacyclin Synthase Expression Prevents Pulmonary Arterial Hypertension in Rats. *Hypertension* 2007;50:531 LP-536.
- [196] Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, et al. Combined Tyrosine and Serine/Threonine Kinase Inhibition by Sorafenib Prevents Progression of Experimental Pulmonary Hypertension and Myocardial Remodeling. *Circulation* 2008;118:2081 LP-2090.
- [197] Hao Liu, Zhi-yong Liu QG. Oral sildenafil prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6:608–613.
- [198] Stéphane Prié, Tack Ki Leung, Peter Cernacek, James W. Ryan JD. The orally active ET(A) receptor antagonist (+)-(S)-2-(4,6-dimethoxy-pyrimidin-2-yloxy)-3-methoxy-3,3-diphenyl-propionic acid (LU 135252) prevents the development of pulmonary hypertension and endothelial metabolic dysfunction in monocrotaline-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;282:1312–8.
- [199] Cowan KN, Heilbut A, Humpl T, Lam C, Ito S, Rabinovitch M. Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 2000;6:698. doi:10.1038/76282.
- [200] Dumitrascu R, Weissmann N, Ghofrani HA, Dony E, Beuerlein K, Schmidt H, et al. Activation of Soluble Guanylate Cyclase Reverses Experimental Pulmonary Hypertension and Vascular Remodeling. *Circulation* 2006;113:286 LP-295.
- [201] McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JRB, Haromy A, Hashimoto K, et al. Dichloroacetate Prevents and Reverses Pulmonary Hypertension by Inducing Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Apoptosis. *Circ Res* 2004;95:830 LP-840.
- [202] Yuyama H, Fujimori A, Sanagi M, Koakutsu A, Sudoh K, Sasamata M, et al. The orally active nonpeptide selective endothelin ETA receptor antagonist YM598 prevents and reverses the development of pulmonary hypertension in monocrotaline-treated rats. *Eur J Pharmacol* 2004;496:129–39. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.06.021>.

- [203] Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension Using Bone Marrow-Derived Endothelial-Like Progenitor Cells. *Circ Res* 2005;96:442 LP-450.
- [204] Rabinovitch M. Elastase and the Pathobiology of Unexplained Pulmonary Hypertension. *Chest* 2017;114:213S–224S. doi:10.1378/chest.114.3_Supplement.213S.
- [205] Rensen SSM, Doevendans P, van Eys G. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Hear J* 2007;15:100–8.
- [206] Ghosh AK, Secreto C, Boysen J, Sassoon T, Shanafelt TD, Mukhopadhyay D, et al. The novel receptor tyrosine kinase Axl is constitutively active in B-cell chronic lymphocytic leukemia and acts as a docking site of nonreceptor kinases: Implications for therapy. *Blood* 2011;117:1928–37. doi:10.1182/blood-2010-09-305649.
- [207] Smolock EM, Korshunov VA. Pharmacological inhibition of Axl affects smooth muscle cell functions under oxidative stress. *Vascul Pharmacol* 2010;53:185–92. doi:10.1016/j.vph.2010.07.002.
- [208] Jochems C, Valk J van der, Stafleu F, Baumans V. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 2002;30:219–27.
- [209] Yu Y, Sweeney M, Zhang S, Platoshyn O, Landsberg J, Rothman A, et al. PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am J Physiol Physiol* 2003;284:C316–30. doi:10.1152/ajpcell.00125.2002.
- [210] Balasubramaniam V, Le Cras TD, Ivy DD, Grover TR, Kinsella JP, Abman SH. Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2003;284:L826–33. doi:10.1152/ajplung.00199.2002.
- [211] Grimminger F, Schermuly RT. PDGF Receptor and its Antagonists: Role in Treatment of PAH BT - Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation. In: Yuan JX-J, Ward JPT, editors., Totowa, NJ: Humana Press; 2010, p. 435–46. doi:10.1007/978-1-60761-500-2_28.

- [212] Pullamsetti SS, Berghausen EM, Dabral S, Tretyn A, Butrous E, Savai R, et al. Role of Src tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;32:1354–65. doi:10.1161/ATVBAHA.112.248500.
- [213] Toru N, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, et al. Vascular Smooth Muscle Cell-derived, Gla-containing Growth-potentiating Factor for Ca²⁺-mobilizing Growth Factors. *J Biol Chem* 1995;270:5702–5. doi:10.1074/jbc.270.11.5702.
- [214] Melaragno MG, Fridell YW, Berk BC. The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function. *Trends Cardiovasc Med* 1999;9:250–3.
- [215] Battle M, Recarte-Pelz P, Roig E, Castel MA, Cardona M, Farrero M, et al. AXL receptor tyrosine kinase is increased in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 2014;173:402–9. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.03.016.
- [216] Xiao J, Zhu X, Wang Q, Zhang D, Cui C-S, Zhang P, et al. Acute Effects of Rho-Kinase Inhibitor Fasudil on Pulmonary Arterial Hypertension in Patients With Congenital Heart Defects. *Circ J* 2015;79:1342–8. doi:10.1253/circj.CJ-14-1015.
- [217] Vouri M, An Q, Birt M, Pilkington GJ, Hafizi S. Small molecule inhibition of Axl receptor tyrosine kinase potently suppresses multiple malignant properties of glioma cells. *Oncotarget* 2015;6:16183–97.
- [218] S G, E R, C S. Gas6, the ligand of Axl tyrosine kinase receptor, has mitogenic and survival activities for serum starved NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1996;12:471–80.
- [219] Bellosta P, Zhang Q, Goff SP, Basilico C. Signaling through the ARK tyrosine kinase receptor protects from apoptosis in the absence of growth stimulation. *Oncogene* 1997;15:2387.
- [220] Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 2007;26:3909.
- [221] Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman C, Luthar N, et al. AXL mediates resistance to cetuximab therapy. *Cancer Res* 2014;74:5152–64. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0294.

- [222] Brand TM, Iida M, Stein AP, Corrigan KL, Braverman CM, Coan J, et al. AXL is a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:2601–12. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2648.
- [223] Elkabets M, Pazarentzos E, Juric D, Sheng Q, Pelosof RA, Brook S, et al. AXL mediates resistance to PI3K α inhibition by activating the EGFR/PKC/mTOR axis in head and neck and esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Cell* 2015;27:533–46. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.010.
- [224] Onken J, Torka R, Korsing S, Radke J, Krementeskaia I, Nieminen M, et al. Inhibiting receptor tyrosine kinase AXL with small molecule inhibitor BMS-777607 reduces glioblastoma growth, migration, and invasion in vitro and in vivo. *Oncotarget* 2016;7:9876–89. doi:10.18632/oncotarget.7130.
- [225] Balaji K, Vijayaraghavan S, Diao L, Tong P, Fan Y, Carey JPW, et al. AXL Inhibition Suppresses the DNA Damage Response and Sensitizes Cells to PARP Inhibition in Multiple Cancers. *Mol Cancer Res* 2017;15:45–58. doi:10.1158/1541-7786.MCR-16-0157.

Erklärung

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

Potsdam, den 9. April 2021

Nadine Kühn, geb. Presser

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die die Erstellung und Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichten:

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. R. T. Schermuly für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsrahmens der wissenschaftlichen Tätigkeit, sowie für die Betreuung und Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Tatyana Novoyatleva für die Betreuung, Hilfs- und Diskussionsbereitschaft in persona, via Email und Telefon.

Speziell bedanke ich mich für die medizinisch-technische Assistenz von Christina Vroom und Ewa Bieniek. Ganz besonders an dieser Stelle sei auch Stephanie Viehmann für die unzähligen Gefallen, die andauernde Hilfestellung und die moralische Unterstützung gedankt.

Ich möchte mich auch bei allen anderen bedanken, mit denen ich während meiner Zeit im Labor täglich zusammenarbeiten, -essen und -lachen durfte. Genannt seien hier neben Stephanie Viehmann, auch Gayathri Viswanathan, Zaneta Sibinska, Anuar Kalymbetov und Dr. Xia Tian. Ganz besonders möchte ich an dieser Stelle Elsa Götz danken, da mit ihr all die Arbeit fast schon ein Vergnügen war. Danke euch für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft und das Schaffen einer tollen Arbeitsatmosphäre, sowie allen anderen bisher unerwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schermuly und des ECCPS.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium sowie die Erstellung dieser Arbeit überhaupt erst ermöglichten, bei meiner lieben Anneliese, die immer da war, und bei meiner Schwester Sarah, die während allen Phasen meines Lebens stets an meiner Seite ist.