Rolle von Serotonin bei der rechtsventrikulären Hypertrophie

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

> vorgelegt von Damian Richard Krompiec aus Leobschütz

> > Gießen 2015

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. R. T. Schermuly

Gutachter: Prof. Dr. K. T. Preissner

Tag der Disputation: 21.03.2016

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitu	ing	1
1.1 Pu	Imonale Hypertonie	1
1.1.1	Rechtsventrikuläre Hypertrophie infolge der pulmonalen Hypertonie	3
1.1.2	Pulmonal-arterielle Hypertonie	3
1.2 Ka	rzinoidsyndrom als Beispiel für die kardiale Wirkung von Serotonin	6
1.3 Se	rotonin	7
1.3.1	Serotonin-Rezeptor Antagonisten als mögliche Therapeutika	9
1.4 Mc	dellversuche der rechtsventrikulären Hypertrophie1	0
2. Frages	tellung und Zielsetzung 1	1
3. Materia	al und Methoden	3
3.1 Ma	iterial1	3
3.1.1	Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe1	3
3.1.2	Kits	4
3.1.3	Gene und ihre Bedeutung1	5
3.1.4	Antikörper1	6
3.1.5	Primer	7
3.1.6	Geräte1	9
3.1.7	Sonstige Materialien 20	0
3.2 Me	thoden2	1
3.2.1	Tierexperimente 2	1
3.2.2	Zellkulturexperimente	3
3.2.3	Grundlagen der Untersuchungungstechniken2	8
3.2.4	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion29	9
3.2.5	Western Blot 34	4
3.2.6	Kollagenassay4	0
3.2.7	Proliferationsassay4	1

	3.2.8	Histologische Färbung	42
	3.2.9	Statistik	44
4.	Ergebn	isse	45
4	.1 Tie	rexperimente	45
	4.1.1	Voruntersuchungen hinsichtlich Hypertrophie-Kennzahl, Hämodynamik und histologischer Färbung	45
	4.1.2	mRNA-Expression der Serotonin-Rezeptor-Gene	46
	4.1.3	Proteinexpression der Serotonin-Rezeptor-Gene	47
	4.1.4	mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene	47
	4.1.5	Kollagengehalt des rechten Herzventrikels	53
4	.2 Zel	Ikulturexperimente	56
	4.2.1	Rolle des transformierenden Wachstumsfaktors β_1 als Stimulationsmodell für kardiale Rattenfibroblasten	56
	4.2.2	mRNA-Expression der Serotonin-Rezeptor-, Hypertrophie- und	
		Fibrosegene	61
	4.2.3	Proteinexpression von Glattmuskulärem Alpha-Aktin	65
	4.2.4	Kollagengehalt von Medium und kardialen Rattenfibroblasten	65
	4.2.5	Proliferation der kardialen Rattenfibroblasten	66
5.	Diskus	sion	68
5	.1 Erk	enntnisse aus den Tierexperimenten	68
	5.1.1	Nachweis der kardialen Wirkung von Serotonin-Rezeptor Antagonisten sowie der Anwendbarkeit des Modells der	
		Pulmonalarterienstenose	68
	5.1.2	Stellenwert der Serotonin-Rezeptoren 2A und 2B im Bereich des Herzens	69
	5.1.3	Unterschiede in der Wirkung von SB204741 und Tergurid auf das	
		myokardiale Remodelling	70
	5.1.4	Antifibrotische Wirkung von Tergurid am rechten Herzventrikel	73

5.2 F	roblematische Rolle des transformierenden Wachstumsfaktors β_1 als
S	timulationsmodell für Fibrose in kardialen Rattenfibroblasten
5.2.1	Nachweis eines Phosphorylierungsschrittes des Wachstumsfaktor
	Signalweges74
5.2.2	Unerwartete, antiproliferative Wirkung des Wachstumsfaktors
5.2.3	Potenzielle Erklärung für die untypische Wirkung des
	Wachstumsfaktors und andere Stimulationsmodelle
5.3 E	rkenntnisse aus weiteren Zellkulturexperimenten
5.3.1	Fragliche Entstehung einer Fibrose in kardialen Rattenfibroblasten
	unter einer längeren Basalmedium Einwirkzeit
5.3.2	Mangel an Nebenwirkungen von Tergurid 79
5.3.3	Hinweis auf Transformation der Fibroblasten in Myofibroblasten als
	Erklärung für die fehlende fibrotische Wirkung im Basalversuch 80
5.3.4	Diskussion eines Wirkmechanismus über die Serotonin-Rezeptoren
	2A oder 2B anhand der Beeinflussung der Proliferation von
	Fibroblasten durch Ketanserin, SB204741 und Tergurid 81
5.4 F	azit
Zusamme	enfassung
Summary	
Abkürzun	gsverzeichnis
Abbildun	gsverzeichnis
Tabellen	verzeichnis
Literaturv	erzeichnis
Anhang	
Publikatio	nsverzeichnis
Erklärung	
Danksagi	ung 116

1. Einleitung

1.1 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie (PH) ist eine Krankheit, unter der weltweit etwa 100 Millionen Menschen leiden. Sie ist definiert als Erhöhung des mittleren pulmonalarteriellen Blutdrucks auf über 25 mm Hg in Ruhe (Schermuly et al. 2011a). In der Folge kann es zur Ausbildung einer rechtsventrikulären Hypertrophie (RVH) kommen. Dabei spielen zwei große Krankheitsbilder aus dem Bereich der pulmonalen Hypertonie (Tabelle 1, S. 2) eine zentrale Rolle, nämlich die PH bei Linksherzinsuffizienz und die etwas seltenere pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH), die über Rechtsherzversagen zum Tode führen können (Haddad et al. 2011, Drake et al. 2011). Darüber hinaus sind als Ursachen für eine RVH u. a. die kongenitalen Herzerkrankungen namens Fallot-Tetralogie und Ventrikelseptumdefekt sowie die in Zusammenhang mit kardialer Fibrose stehende Pulmonalklappenstenose bekannt (Simonneau et al. 2009, van de Woestijne et al. 2004). Letztere kann die Manifestation eines Karzinoidsyndroms darstellen (Herold et al. 2009). Etablierte Therapieansätze beschränken sich auf die Behandlung der Grunderkrankung. So bei der PH infolge von Linksherzinsuffizienz blutdrucksenkende werden Medikamente wie Diuretika, Angiotensin-Konversions-Enzym (engl. angiotensin convertising enzyme, ACE) Hemmer, Angiotensin-II Subtyp I (AT₁) Rezeptorblocker, Betablocker und Aldosteronantagonisten eingesetzt sowie Koronarangiographien und Korrekturoperationen an Herzklappen durchgeführt (Dickstein et al. 2008). Die Behandlung der eingangs erwähnten Herzfehler erfolgt operativ, wobei im Falle der Pulmonalklappenstenose zunächst eine Valvuloplastie mithilfe eines Ballonkatheters Anwendung findet (Almeda et al. 2003). All diese Behandlungsarten bewirken eine Abschwächung der PH sowie eine potenzielle Verhinderung ihrer Folgen. Neue Studien deuten auf Sildenafil, einen Phosphodiesterase-5 (PDE-5) Hemmer mit einer positiven Wirkung sowohl auf das Myokard als auch auf die pulmonale Gefäßbahn, als zukünftigen Therapieansatz zur Behandlung der Linksherzinsuffizienz hin (Haddad et al. 2011, Corte et al. 2012). Die im Rahmen dieser Arbeit wichtigste Ursache der RVH ist aus molekularbiologischer Sicht die PAH.

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

Aktualisierte klinische Klassifikation der pulmonalen Hypertonie (Nizza, 2013)					
1. Pulmonal-arterielle Hypertonie (PAH)					
1.1 Idiopathische PAH					
1.2 Hereditäre PAH					
1.2.1 BMPR2					
1.2.2 ALK1, Endoglin, SMAD9, Caveolin-1, KCN	IK3				
1.2.3 Unbekannt					
1.3 Medikamenten- und Giftstoff-induziert					
1.4 Assoziiert mit					
1.4.1 Bindegewebserkrankungen	1.4.4 Kongenitalen Herzerkrankungen				
1.4.2 HIV-Infektion	1.4.5 Schistosomiasis				
1.4.3 Portaler Hypertonie					
1'. Pulmonal veno-okklusive Erkrankung (engl. pu pulmonal kapilläre Hämangiomatose (engl. pul	Ilmonary veno-occlusive disease, PVOD) und / oder Imonary capillary hemangiomatosis, PCH)				
1". Persistierende pulmonale Hypertonie des Neu	geborenen (PPHN)				
2. Pulmonale Hypertonie bei Erkrankungen des li	nken Herzens				
2.1 Linksventrikuläre systolische Dysfunktion					
2.2 Linksventrikuläre diastolische Dysfunktion					
2.3 Klappenerkrankungen					
2.4 Angeborene / erworbene Einfluss- / Ausflusstra Kardiomyopathie	aktobstruktion des linken Herzens und angeborene				
3. Pulmonale Hypertonie bei Lungenerkrankunge	n 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. Chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie (CTEPH)					
5. Pulmonale Hypertonie mit unklaren multifaktoriellen Mechanismen					
5.1 Hämatologische Störungen: chronische hämolytische Anämie, myeloproliferative Störungen, Splenektomie					
5.2 Systemische Störungen: Sarkoidose, pulmonale Histiozytose, Lymphangioleiomyomatose					
5.3 Metabolische Störungen: Glykogenspeicherkra	ankheit, Morbus Gaucher, Schilddrüsenstörungen				
5.4 Andere: Obstruktion durch Tumore, fibrosieren Dialyse, segmentale pulmonale Hypertonie	de Mediastinitis, chronisches Nierenversagen unter				
ALK1 = Activin Rezentor ähnliche Kinase (enc	al activin recentor-like kinase) Tvn 1 BMPR2 =				

ALK1 = Activin Rezeptor ähnliche Kinase (engl. *activin receptor-like kinase*) Iyp 1, BMPR2 = Knochen-morphogenetischer Protein Rezeptor Typ 2 (engl. *bone morphogenetic protein receptor type 2*), HIV = humanes Immundefizienz-Virus, KCNK3 = Mitglied 3 der Kaliumkanal Unterfamilie K (engl. *potassium channel subfamily K member 3*), SMAD9 = Mitglied 9 der SMAD-Familie (nach Simonneau et al. 2013)

1.1.1 Rechtsventrikuläre Hypertrophie infolge der pulmonalen Hypertonie

Die Vergrößerung von Myozyten im rechten Herzventrikel (RV) wird als RVH bezeichnet. Es werden zwei Formen unterschieden, nämlich die physiologische, reversible RVH, die beispielsweise während des Aufenthalts in großer Höhe auftritt, und die pathologische RVH (Pelouch et al. 1997). Letztere entsteht, wenn das Herz nicht nur anpassungs-, sondern auch krankheitsbedingt erhöhte Druckverhältnisse in der Lungenstrombahn bewältigen muss. Hierbei kann die zunehmende Muskelmasse die regelrechte Blutversorgung des RV über die Koronararterien stören (van Wolferen et al. 2008). Dies wiederum führt zum myokardialen Remodelling (Bogaard et al. 2009). Die pathologische RVH ist Hauptbestandteil dieses Remodellings, zu dem auch der fibrotische Umbau von Herzgewebe gezählt wird (van de Woestijne et al. 2004). Das Vorliegen einer RVH infolge einer pulmonalen Erkrankung wird Cor pulmonale genannt (Budev et al. 2003).

1.1.2 Pulmonal-arterielle Hypertonie

Die PAH gehört zur Gruppe 1 der im Jahre 2013 in Nizza aktualisierten klinischen Klassifikation der PH (Tabelle 1, S. 2). Im Vergleich zur Definition der PH mit einer Erhöhung des mittleren pulmonal-arteriellen Blutdrucks auf über 25 mm Hg in Ruhe liegt zudem ein pulmonal-kapillärer Verschlussdruck von weniger als 15 mm Hg bei normalem oder erniedrigtem Herzzeitvolumen vor (Galiè et al. 2009). Typische, pathophysiologische Merkmale der PAH sind die Vasokonstriktion, das vaskuläre Remodelling aller Pulmonalgefäßschichten und die sich daraus ergebende Nachlasterhöhung im RV (Schermuly et al. 2011a). Von den funktionellen Umbauvorgängen sind primär die kleinen Arterien und Arteriolen betroffen. Es kommt zu plexiformen Läsionen im Bereich der Intima, einer Hypertrophie der Media und inflammatorischen Infiltraten der Adventitia (Rosenkranz 2011). Die Pathogenese ist vielfältig. So spielen Mutationen der Gene für den Knochen-morphogenetischen Protein Rezeptor Typ 2 (engl. bone morphogenetic protein receptor type 2, BMPR2), für Endoglin und für die Activin Rezeptor ähnliche Kinase (engl. activin receptor-like kinase, ALK) Typ 1, aber auch für Caveolin-1 und für das Mitglied 3 der Kaliumkanal Unterfamilie K (engl. potassium channel subfamily K member 3, KCNK3) eine Rolle (Simonneau et al. 2013). Diese Gene kodieren u. a. Rezeptoren, die in Zusammenhang mit der transformierenden Wachstumsfaktor β Superfamilie stehen. Ihre Aktivierung setzt den SMAD (Proteinfamilie bestehend aus Homologen des Proteins MAD [engl. mother against decapentaplegic] der Taufliege Drosophila und

des Proteins SMA des Fadenwurms Caenorhabditis elegans) Signalweg in Gang und begünstigt auf diese Weise die Entstehung der PAH (Machado et al. 2009, Massagué 2000). Die Genmutationen besitzen eine unvollständige Penetranz von ca. 20 %, so dass es zur Krankheitsentstehung weiterer Triggermechanismen bedarf. Diese Aufgabe übernehmen hauptsächlich Umweltfaktoren wie z. B. die Einnahme des Appetitzüglers Fenfluramin, der ferner den Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) Signalweg beeinflusst (Sztrymf et al. 2007). Auch das Vorliegen bestimmter Erkrankungen wie portale Hypertonie, Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) oder Sklerodermie kann zu Lungenveränderungen im Sinne einer PAH führen (Simonneau et al. 2013). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch weitgehend unklar. Bei der portalen Hypertonie wird toxischen Substanzen aus dem Gastrointestinaltrakt, die vermutlich über portosystemische Shunts bis zur Lunge gelangen, eine gewisse Bedeutung nahe gelegt, während die vaskulären Läsionen bei der Sklerodermie denen bei der idiopathischen PAH in Grundzügen gleichen (Krowka 2012, Chatterjee 2011).

Die idiopathische Form der PAH ist durch eine Dysfunktion des pulmonalen einhergehendes Ungleichgewicht Endothels und ein damit zwischen vasokonstriktiven und vasodilatativen Mediatoren gekennzeichnet (Rosenkranz 2008). Dabei kommt es zu einer vermehrten Produktion des potenten Vasokonstriktors Endothelin und einer verminderten Freisetzung des Vasodilatators Stickstoffmonoxid (NO) sowie von Prostazyklin, das mithilfe der Adenylatzyklaseabhängigen Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (engl. cyclic adenosine monophosphate, cAMP) sowohl eine Vasodilatation bewirkt als auch die Thrombozytenaggregation und die Proliferation glatter Muskelzellen hemmt (Rosenkranz 2011). Dieses gestörte Gleichgewicht führt in der Folge zu einem pulmonal vaskulären Remodelling, an dessen Entstehung Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie die Rezeptor-Tyrosinkinasen oder die Wachstumsfaktoren selbst, nämlich der thrombozytäre Wachstumsfaktor (engl. platelet-derived growth factor, PDGF), der Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (engl. fibroblast growth factor 2, FGF2) und der epidermale Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor, EGF) beteiligt sind (Perros et al. 2008, Dahal et al. 2010, Benisty et al. 2004, Pullamsetti et al. 2014). Die molekularen Mechanismen sind nicht vollständig geklärt. Eine große Gemeinsamkeit besteht jedoch in ihrer indirekten Wirkung auf den RV (Rosenkranz 2011).

Basierend bekannten Entstehungsmechanismen auf wurden mehrere Therapiestrategien entwickelt. So werden Prostazyklin-Analoga eingesetzt, die intravenös (Epoprostenol), inhalativ (Iloprost) oder subkutan (Treprostinil) appliziert werden (Anderson u. Nawarskas 2010). Iloprost kann zwar auch intravenös verabreicht werden, wirkt jedoch bei inhalativer Gabe selektiver auf die Lunge (Gomberg-Maitland u. Olschewski 2008). Treprostinil erkauft sich seine längere Wirkungsdauer mit größeren Nebenwirkungen (Anderson u. Nawarskas 2010). Als Endothelin-Rezeptor Antagonisten (ERA) kommen sowohl der Endothelin-Rezeptor Typ A (ET_A) spezifische Wirkstoff Ambrisentan als auch der duale ERA Bosentan zum Einsatz. Bei in etwa gleicher Wirksamkeit kann ein Vorteil der selektiven Blockade gegenüber Bosentan nicht nachgewiesen werden (Venitz et al. 2012). Eine Verstärkung der Wirkung von NO wird über PDE-5 Hemmer herbeigeführt. PDE-5 bewirkt den Abbau von zyklischem Guanosinmonophosphat (engl. cyclic guanosine monophosphate, cGMP), das über erniedrigte intrazelluläre Kalzium-Spiegel eine Vasodilatation erreicht (Ghofrani et al. 2004). Zu dieser Gruppe zählen die beiden Wirkstoffe Sildenafil und Tadalafil, wobei Tadalafil eine deutlich längere Halbwertszeit aufweist (Arif u. Poon 2011). All diese Medikamente haben gemeinsam, dass sie die im Falle einer chronischen PAH irreversibel umgebauten Pulmonalgefäße nicht wiederherstellen können (Gomberg-Maitland u. Olschewski 2008, Venitz et al. 2012, Baliga et al. 2011).

Neue Therapieansätze richten ihr Augenmerk auf Riociguat, einen Stimulator der löslichen Guanylatzyklase (engl. soluble guanylate cyclase, sGC), sowie auf die Rezeptor-Tyrosinkinase-Hemmer Imatinib und Sorafenib. Riociguat besitzt dabei denselben Wirkmechanismus wie der endogene sGC-Stimulator NO und kann auch unabhängig von diesem seine vasodilatatorische und antiproliferative Wirkung auf die Lunge entfalten (Schermuly et al. 2011b). Imatinib inhibiert PDGF-Rezeptoren, die für das pulmonal vaskuläre Remodelling mit verantwortlich sind (Pullamsetti et al. 2012). Sorafenib, das eine ähnliche Wirkung aufweist, entfaltet diese nicht nur über Tyrosinkinasen, sondern u. a. auch über Serin/Threonin-Kinasen (Klein et al. 2008). In aktuellen Phase III Studien werden sowohl der orale Prostazyklin-Rezeptor Agonist Selexipag als auch der duale ERA Macitentan, die beide eine Optimieruna bisheriaer Therapiestrategien mittels Reduzieruna ihrer Nebenwirkungen verfolgen, untersucht und deuten auf aussichtsreiche Ergebnisse hin (Pullamsetti et al. 2014).

All diese Ansätze zeigen sich vielversprechend, da sie den Krankheitsprogress mit seinen irreversiblen Umbauvorgängen scheinbar aufhalten können. Ihr Potenzial bezüglich einer Rückbildung des pulmonal vaskulären Remodellings ist ebenso Gegenstand aktueller Forschung wie ihre mögliche direkte Wirkung auf das Herzgewebe (Geschka et al. 2011, Schermuly et al. 2011b, Grimminger et al. 2010, Pullamsetti et al. 2014). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch 5-HT-Rezeptor (5-HTR) Antagonisten ein gutes prophylaktisches Potenzial in Bezug auf das Remodelling bei der PAH aufweisen (Dumitrascu et al. 2011). Die Hemmung der 5-HTR2A und 2B stellt hierbei den Ausgangspunkt für die antiproliferativen und antifibrotischen Effekte im Bereich der Lunge dar (Dumitrascu et al. 2011, Antoniu 2011). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung dieser 5-HTR Antagonisten auf das Herz. Deren Wirkungsweise lässt sich anhand des Karzinoidsyndroms erläutern.

1.2 Karzinoidsyndrom als Beispiel für die kardiale Wirkung von Serotonin

Karzinoide sind seltene neuroendokrine Tumore mit einer Inzidenz von ca. 1,2 bis 2,1 pro 100 000 Einwohner. Sie treten hauptsächlich im Gastrointestinaltrakt im Bereich von Appendix vermiformis und lleum auf und werden von enterochromaffinen Zellen abgeleitet (Modlin u. Sandor 1997). Im Verlauf der Erkrankung kommt es zur ektopischen Freisetzung von diversen Substanzen wie z. B. 5-HT, Kortikotropin, Histamin, Dopamin, Substanz P, Prostaglandinen, Neurotensin oder Kallikrein, die unterschiedliche Krankheitszeichen hervorrufen (Kulke u. Mayer 1999). Das Karzinoidsyndrom ist ein Symptomenkomplex bestehend aus anfallsweiser Rötung der Haut, auch Flush genannt, sekretorischer Diarrhoe, Bronchospasmen und Hypotonie, der wie Lebermetastasen als Zeichen des fortgeschrittenen Stadiums einer Kardzinoidtumorerkrankung angesehen wird (Palaniswamy et al. 2012). In bis zu 60 % der Fälle kommt es dabei zu fibrotischen Ablagerungen am Endokard des rechten Herzvorhofs und des RV, insbesondere an den flussabwärts gelegenen Seiten von Pulmonal- und Trikuspidalklappe (Anderson et al. 1997, Palaniswamy et al. 2012). Bei dieser kardialen Beteiligung spielt 5-HT eine entscheidende Rolle, da es aufgrund der fast immer bestehenden Leberschädigung in großen Mengen in den systemischen Blutkreislauf gelangt und erst in der Lunge abgebaut wird (Gustafsson et al. 2005, 2008). Die 5-HT-Wirkung wird vermutlich über die 5-HTR2A und 2B vermittelt. Bisherige Untersuchungen in Form von klinischen Studien bzw.

Fenfluramin, Rezeptoranalysen mittels eines Appetitzüglers mit kardialen Nebenwirkungen, lassen nur indirekte Schlüsse zu, wobei letztere den 5-HTR2B als Hauptwirkungsort ansehen (Gustafsen et al. 1986, Sztrymf et al. 2007, Hutcheson et al. 2011). Inwieweit sich die 5-HTR direkt im Herzen oder in der Lunge befinden und nur indirekt über die Beeinflussung einer eventuell entstehenden PAH das Ausmaß an fibrotischen Ablagerungen bestimmen, ist Gegenstand aktueller Forschung (Gustafsson et al. 2005, Dumitrascu et al. 2011). Diese Arbeit widmet sich der direkten kardialen Wirkung der 5-HTR. Im Rahmen der Karzinoidtumorerkrankung stellt die zurzeit etablierte Behandlung mit Somatostatin-Analoga, die eine Symptomverbesserung durch die Inhibition der Freisetzung von 5-HT u. a. bewirken, lediglich eine palliative Therapieoption dar (Kulke u. Mayer 1999). Ähnliches würde für 5-HTR Antagonisten gelten. Eine kurative Therapiemöglichkeit besteht in der chirurgischen Resektion der Karzinoide, solange noch keine Metastasen vorliegen (Palaniswamy et al. 2012).

1.3 Serotonin

Der Name Serotonin (Abbildung 1) wird von der Wirkung dieses sich im "Serum" befindlichen biogenen Amins auf die Spannung (lat. *"Tonus"*) der Blutgefäße abgeleitet (Rapport et al. 1948). Es entsteht durch Hydroxylierung und Decarboxylierung aus der Aminosäure Tryptophan und wird vorwiegend in den enterochromaffinen Zellen von Darmmukosa und Lunge sowie in kleinen Mengen in den Neuronen des Hirnstammes gebildet (Hutcheson et al. 2011, Berger et al. 2009). 5-HT wird am Entstehungsort, aber auch in Thrombozyten gespeichert und fungiert als Autakoid im Gastrointestinaltrakt und im Blutkreislauf sowie als Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem (Pithadia u. Jain 2009).



Abbildung 1: Strukturformel von Serotonin

Seine Wirkung entfaltet 5-HT über 14 verschiedene Rezeptoren, die in sieben Klassen mit unterschiedlich vielen Subklassen eingeteilt werden. Im Einzelnen sind dies die 5-HTR1A, 1B, 1D, 1E, 1F, 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 und 7 (Pithadia u.

Jain 2009). Das Wirkspektrum ist vielfältig. Je nach Gewebe überwiegen bestimmte Rezeptoren, die aufgrund ihrer voneinander abweichenden Sensitivität je nach Serotoninmenge unterschiedliche Reaktionen zur Folge haben (Berger et al. 2009). Das zentrale Nervensystem spielt hierbei die größte Rolle. So können Krankheiten wie Depression, Psychose, Migräne oder Angststörung über eine Modulation von 5-HTR behandelt, aber auch die Schmerzempfindung oder die Temperaturregulation beeinflusst werden (Pithadia u. Jain 2009). Einige der hierfür notwendigen Wirkstoffe sind Gegenstand aktueller Forschung. Weitere mögliche Einsatzgebiete derselben finden sich u. a. bei der Refluxösophagitis, dem Reizdarmsyndrom und der PAH sowie beim Diabetes mellitus und beim Glaukom (Gershon u. Tack 2007, Dumitrascu et al. 2011, Yamada et al. 1997, Costagliola et al. 1993).

Am Herzen sind die 5-HTR1B, 2A, 2B und 3 von besonderer Bedeutung. Während der aktivierte 5-HTR1B im Bereich der Lunge zur Vasokonstriktion führt und seine Hemmung somit ein therapeutisches Potenzial in Bezug auf die Verhinderung des Remodellings bei der PAH erkennen lässt, wirkt seine Aktivierung im übrigen Gefäßsystem offenbar nur vasodilatativ (Morrell et al. 2009, Humbert et al. 2004, Berger et al. 2009). Die Stimulation der 5-HTR2A und 2B hat pulmonal sowohl proliferative als auch fibrotische Effekte zur Folge (Dumitrascu et al. 2011, Königshoff et al. 2010, Baliga et al. 2011). Eine ähnliche Wirkung dieser Rezeptorstimulation wird auch im Bereich des Herzens vermutet (Gustafsson et al. 2005). Über den aktivierten 5-HTR3 wird wahrscheinlich die kardial lokalisierte Schmerzempfindung nach stattgehabtem Myokardinfarkt vermittelt (Berger et al. 2009).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die 5-HTR2A und 2B. Diese Guaninnukleotid-bindendes-Protein (G-Protein) gekoppelten Rezeptoren (engl. GPCR) interagieren über G-protein coupled receptors, die Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) mit nachgeschalteten Effektoren wie der Phospholipase C (PLC), den durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen 1 und 2 (engl. extracellular-signal regulated kinases 1 and 2, ERK1/2) aus der Gruppe der Serin/Threoninkinasen und der Tyrosinkinase Src (Kinase aus der gleichnamigen, nach dem Rous-Sarkom-Virus benannten Familie) (Hutcheson et al. 2011, Roth 2007, Raymond et al. 2001). Letztere steht vermutlich in Wechselwirkung mit dem transformierenden Wachstumsfaktor β_1 (engl. transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) Signalweg (Roth 2007). Es kommt zur Freisetzung von

sekundären Botenstoffen, welche die Transkription von Genen im Zellkern beeinflussen und auf diese Weise z. B. zu Proliferation, Hypertrophie oder Fibrose führen (Hutcheson et al. 2011, Ruiz-Ortega et al. 2007). Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig geklärt.

1.3.1 Serotonin-Rezeptor Antagonisten als mögliche Therapeutika

Bisherige Therapieansätze konzentrieren sich auf die Hemmung der Freisetzung von Behandlung mit Somatostatin-Analoga bei 5-HT. So reduziert die der Karzinoidtumorerkrankung die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von fibrotischen Ablagerungen am Endokard des rechten Herzens (Kulke u. Mayer 1999, Anderson et al. 1997). Neue Therapiemöglichkeiten ergeben sich aus der Untersuchung der Wirkung von Ketanserin, SB204741 und Tergurid im Bereich der Lunge (Dumitrascu et al. 2011). Der Wirkstoff Ketanserin, auch 3-{2-[4-(4-Fluorobenzoyl)piperidin-1yl]ethyl]guinazolin-2,4(1H,3H)-dion genannt, ist ein 5-HTR2A Antagonist, der in höheren Konzentrationen gleichfalls den 5-HTR2C hemmen kann (Batman et al. 2005). Seine Wirkungsorte finden sich, abgesehen von der Lunge, vorwiegend in Thrombozyten, in glatten Muskelzellen von Gefäßen und Uterus sowie im zerebralen Kortex (Königshoff et al. 2010, Meltzer u. Roth 2013, Roth et al. 1998). Über die Blockierung von α_1 Adrenozeptoren vermittelt er seine blutdrucksenkende Wirkung im Gefäßsystem (Centurión et al. 2006, Miao et al. 2003, Yakovlev et al. 2014). Der Antagonist Ketanserin besitzt hemmende Eigenschaften sowohl an Histamin-Rezeptoren als auch an Kaliumkanälen und kann zu Herzrhythmusstörungen führen (Engelen et al. 2004, Tang et al. 2008). Am linken Herzventrikel verhindert er die Entstehung von Fibrose, indem er die Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten stört und in noch ungeklärter Art und Weise mit dem TGF-B1 Signalweg interagiert (Yabanoglu et al. 2009). Der Wirkstoff SB204741, auch als N-(1-Methyl-1H-indol-5-yl)-N'-(3-methylisothiazol-5-yl)urea bezeichnet, blockiert spezifisch den 5-HTR2B, der als Hauptwirkungsort für das beim Karzinoidsyndrom ins Herz transportierte 5-HT vermutet wird (Forbes et al. 1995, Hutcheson et al. 2011). Er entfaltet seine Wirkung in der Lunge und im Herzen, aber auch in glatten Muskelzellen des Magenfundus (Dumitrascu et al. 2011, Meltzer u. Roth 2013, Roth et al. 1998). Für SB204741 werden blutdrucksenkende Eigenschaften in Zusammenhang mit einer gesteigerten 5-HT-Konzentration beschrieben (Shingala u. Balaraman 2005). Im linken Herzventrikel wird die Blockade von 5-HTR2B mit der Abschwächung von Fibrose und Hypertrophie assoziiert.

Während die Fibrose über eine noch nicht vollständig geklärte Interaktion mit dem TGF-β₁ entsteht, findet sich die Hypertrophie nur in speziellen Hypertrophie-Modellen (Hutcheson et al. 2011, Nebigil et al. 2003). Tergurid, auch N,N-Diethyl-N'-[(8α)-6methylergolin-8-yl]urea genannt, ist ein kombinierter 5-HTR2A und 2B Hemmer. Seine Wirkungsorte entsprechen denen von Ketanserin und SB204741 (Dumitrascu et al. 2011, Meltzer u. Roth 2013, Roth et al. 1998, Sitbon u. Morrell 2012). Er ist in Japan zur Behandlung der Hyperprolaktinämie zugelassen, wo er als partieller Dopamin-Rezeptor (DR) Agonist seine Wirkung vorwiegend an den DRD₂ und D₃ entfaltet (Königshoff et al. 2010, Newman-Tancredi et al. 2002). Eine Hemmung von α_1 und Aktivierung von α_2 Adrenozeptoren wird beschrieben (Newman-Tancredi et al. 2002). Neueste Erkenntnisse einer Phase IIa Studie zeigen nur bei Patienten mit begleitenden ERA Therapie eine siginifikante Verbesserung einer des pulmonalvaskulären Widerstands durch Tergurid. Insgesamt führt die Behandlung mit Tergurid allerdings zu einer größeren Anzahl an schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen (Ghofrani et al. 2012). Im Großen und Ganzen wirken die drei hier genannten 5-HTR Antagonisten prophylaktisch bezüglich des Remodellings bei der PAH und beeinflussen deshalb indirekt auch das rechte Herz (Dumitrascu et al. 2011). Ihre direkte Wirkung auf den RV ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4 Modellversuche der rechtsventrikulären Hypertrophie

Die Aufgabe von Modellversuchen ist die möglichst nur am zu untersuchenden Organ oder Gewebe bewirkte Simulation eines Krankheitszustandes. In dieser Arbeit dienen sie dazu, bestimmte Hypertrophie-, Proliferations- und Fibrosegene u. a. (Kapitel 3.1.3, S. 15 f.) und ihre Effekte mithilfe von histologischen, zell- und molekularbiologischen Untersuchungsmethoden (Kapitel 3.2.3, S. 28 f.) zu erforschen. In Bezug auf die Ausbildung einer RVH werden in vivo Modelle wie die Pulmonalarterienstenose (engl. *pulmonary artery banding, PAB*) (Kapitel 3.2.1.1, S. 21 f.) oder die Monocrotalin-Injektion von in vitro Stimulationsmodellen mit Signalmolekülen wie dem TGF- β_1 (Kapitel 3.2.2.3, S. 26 f.) oder mit einer längeren Basalmedium (BM) Einwirkzeit (Kapitel 3.2.2.4, S. 26) unterschieden und im Methodenteil der vorliegenden Arbeit näher besprochen (Rockman et al. 1994, Klein et al. 2008, Lijnen et al. 2005, Petrov et al. 2002, Königshoff et al. 2010, Kapitel 3.2, S. 21 ff.). Beim Monocrotalin-Modell kommt es zu pulmonalen Umbauvorgängen im Sinne einer schweren PAH mit nur sekundärer RVH (Klein et al. 2008).

2. Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist es zu zeigen, ob eine direkte Beeinflussung des 5-HT Signalweges im RV die Entstehung der pathologischen RVH verlangsamen kann. Dumitrascu et al. 2011 beschreiben anhand des Monocrotalin-Modells ein gutes prophylaktisches Potenzial für den 5-HTR2A und 2B Antagonisten Tergurid bezüglich des Remodellings bei der PAH. In Myozyten aus humanen Pulmonalarterien kommt es im Krankheitsfall entsprechend derselben Quelle zu einer erhöhten Expression von 5-HTR2B. Da 5-HT laut Pithadia u. Jain 2009 in den ubiquitär vorkommenden Thrombozyten gespeichert wird und im fortgeschrittenen Stadium einer Karzinoidtumorerkrankung entsprechend Gustafsson et al. 2008 vermehrt in Herz und Lunge gelangt, kann es, wie von Hutcheson et al. 2011 beschrieben, auch im rechten Herzen seine Wirkung entfalten. Ausgehend von den vielversprechenden Ergebnissen bei der pulmonalen Anwendung soll demnach der Stellenwert der kombinierten Blockade der 5-HTR2A und 2B sowie ihrer Teilkomponenten im RV dargestellt werden. Dafür bedarf es der Heranziehung eines geeigneten, von pulmonalen Einflüssen unabhängigen in vivo Modells für die Entstehung einer pathologischen RVH, nämlich des PAB-Modells. Anhand dessen sollen dann eine Entscheidung über den hauptsächlich an der kardialen 5-HT-Wirkung beteiligten 5-HTR2A oder 2B getroffen und unter Verwendung der entsprechenden Antagonisten das therapeutische Potenzial derselben untersucht werden. Mittels Analyse der sich daraus ergebenden Veränderungen in der Expression von Hypertrophie-, Proliferations- und Fibrosegenen, die laut Kreymborg et al. 2010 nach erfolgter PAB-Operation meistens erhöht ist, gilt es eine Vermutung über den Wirkort im Herzgewebe aufzustellen, also auf den maßgeblich involvierten Zelltyp zu schließen. Vor einer weiteren, detaillierten Betrachtung ist eine histologische Überprüfung auf Entstehung entsprechender Genprodukte anzustreben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollen geeignete zellbiologische Stimulationsmodelle herangezogen werden, anhand derer der zugrunde liegende Wirkmechanismus herausgearbeitet werden kann. Der TGF- β_1 ist ein Zytokin, das entsprechend Dobaczewski et al. 2011 über den SMAD Signalweg an der Entstehung von kardialem Remodelling beteiligt ist. In kardialen Fibroblasten führt eine Stimulation mit ebendiesem Signalmolekül laut Ruiz-Ortega et al. 2007 zur Fibrose, dem Endpunkt des erwähnten Remodellings. Deshalb sollen auf Zellkulturebene mittels

angemessener Methoden der Nachweis über das Vorhandensein des TGF-B1 Signalweges erbracht sowie seine fibrotische Wirkung anhand der daran beteiligten Gene dargestellt werden. Dabei ist auf die Problematik in der Anwendung dieses gängigen Stimulationsmodells einzugehen, insbesondere auf mögliche Interaktionen mit anderen Signalwegen. Unabhängig davon gilt es auch ein alternatives Modell für die Entstehung von Fibrose sowie zwecks Analyse etwaiger Wirkstoffnebenwirkungen zu entwickeln. Petrov et al. 2002 beobachten fibrotische Veränderungen unter einer 72 Stunden dauernden Stimulation von kardialen Fibroblasten mit BM. Königshoff et al. 2012 untersuchen in einer ähnlichen Versuchsanordnung im Rahmen ihrer pulmonalen Experimente das Auftreten von Nebenwirkungen des 5-HTR2A und 2B Hemmers Tergurid. Ausgehend von diesen Feststellungen sollen die Effekte einer Stimulation mit Tergurid sowie dem zugehörigen Lösungsmittel Ethanol unter einer länger dauernden BM Einwirkzeit dargestellt werden. Eventuelle Probleme sind zu erwähnen, v. a. unter Abwägung potenzieller methodischer Fehler der verwendeten Untersuchungsmethoden. Eine Überprüfung der Ergebnisse anhand von weniger fehlerbehafteten Techniken soll angestrebt werden. Schließlich gilt es auch einen Einfluss der jeweiligen respektive kombinierten Hemmung der 5-HTR2A und 2B auf die Proliferation von kardialen Fibroblasten zu untersuchen.

Die gewonnen Erkenntnisse sollen in Bezug auf eine mögliche Verwendung von 5-HTR Antagonisten als supportive kardiale Therapeutika im Rahmen einer PAH diskutiert werden, insbesondere in Hinblick auf ihre bereits bekannte Wirkung im Bereich der Lunge.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe

Alle bei den durchgeführten Experimenten verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe werden hier (Tabelle 2) aufgelistet.

Tabelle 2: C	hemikalien,	Reagenzien	und	Wirkstoffe
	,			

Bezeichnung	Produkt	Firma	
APS	A3678	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
β-ΜΕ	M6250	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
BM	R115	Cell Applications Inc., San Diego, USA	
Bromophenolblau	108122	Merck KGaA, Darmstadt	
BSA	500-0206	Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA	
Buprenorphinhydrochlorid	Vetergesic Multidose	Alstoe Ltd., Sheriff Hutton, UK	
Chloroform	C2432	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
DEPC Wasser	T143	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
DMSO	D2438	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
DPBS	P04-36500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	
Eindeckmittel	Pertex, 41-4010	Medite GmbH, Burgdorf	
Entwicklungsflüssigkeit	G153	Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgien	
Essigsäure	3738	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
Ethanol [99,9 %]	8006	Avantor Performance Materials BV, Deventer, Niederlande	
FCS	S1810	Biowest SAS, Nuaillé, Frankreich	
Fixierungsflüssigkeit	G354	Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgien	
Formalin [3,5-3,7 %]	27244	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken	
Flüssigstickstoff	CRYO-Service LIN	Linde AG, München	
Glycin	3908	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
Glycerol	G8773	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
HBSS	14025	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA	
HCI [1 M]	109057	Merck KGaA, Darmstadt	
HCI [2 M]	T134	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
Isofluran	lsofluran ad us. vet.	Baxter International Inc, Deerfield, USA	
Isopropanol	33539	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
Ketanserin	S006	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
[Methyl-Tritium]-Thymidin	NET027W001MC	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA	
Methanol	32213 Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, US		

Bezeichnung	Produkt	Firma	
Milchpulver	T145	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
NaCl	P029	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
NaOH [1 M]	109137	Merck KGaA, Darmstadt	
Paraffin	P3683	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
Pikrinsäure [1,2 %]	A2520	AppliChem GmbH, Darmstadt	
Protein-Marker	RPN800E	GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK	
Rotiphorese Gel 30	3029	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
SB204741	S0693	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
SDS	L4390	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
SDS [10 %]	V6553	Promega Corp., Madison, USA	
Siriusrot	F3B, 807461	Niepötter Labortechnik, Bürstadt	
Szintillationsflüssigkeit	0016	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	
TEMED	T9281	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
Tergurid	10703TA001	Pharmycron Service GmbH, St. Ingbert	
TGF-β₁	240-B	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA	
TCA [99 %]	T9159	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
Tween 20	P7949	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
TRIS	T1503	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
TRIS [0,5 M, pH 6,8]	M196	Amresco Inc., Solon, USA	
TRIS [1,5 M, pH 8,8]	M195	Amresco Inc., Solon, USA	
TRIS-HCI [1 M, pH 7,6]	T2788	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA	
Trizol	15596	Invitrogen Corp., Carlsbad, USA	
Trypsin [10 x]	P10-024100	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	
Wachstumszusatz	R116-GS	Cell Applications Inc., San Diego, USA	
Xylol	108685	Merck KGaA, Darmstadt	

3.1.2 Kits

Die im Methodenteil (Kapitel 3.2, S. 21 ff.) erwähnten Bestandteile der einzelnen Kits (Tabelle 3) werden in diesem Abschnitt nicht extra aufgeführt.

Tabelle 3: Kits

Bezeichnung	Produkt	Firma	
Amersham ECL Plus Kit	RPN2132	GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK	
DC Protein Assay Kit II	500-0112	Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA	
ImProm-II Reverse Transcription System	A3800	Promega Corp., Madison, USA	
Mini Trans-Blot Cell System	170-3930	Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA	
Minigel-Twin Apparatur	010-100	Biometra GmbH, Göttingen	

Bezeichnung	Produkt	Firma	
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kit 11733		Invitrogen Corp., Carlsbad, USA	
RIPA Lysepuffer System	24948	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA	
RNeasy Micro Kit	74004	Qiagen GmbH, Hilden	
Sircol Collagen Assay Kit	S5000	Biocolor Ltd., Carrickfergus, UK	

3.1.3 Gene und ihre Bedeutung

Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) und Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) sind Haushaltsgene, die im Unterschied zu regulierten Genen unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert werden (Koolman u. Röhm 2009, Thal et al. 2008). Die Gene 5-HTR2A und 5-HTR2B geben einen Hinweis auf die Produktion und somit auch die Anzahl der entsprechenden Rezeptoren in der Zellmembran (Dumitrascu et al. 2011). Glattmuskuläres Alpha-Aktin (engl. alpha smooth muscle actin, ACTA2 oder α -SMA) ist ein Gen, das bei erhöhten Druckverhältnissen hauptsächlich in Myozyten vorkommt und deshalb für Hypertrophie steht (Black et al. 1991). Es spielt auch bei der Fibrose eine Rolle, da es vermehrt in Myofibroblasten exprimiert wird, die vermutlich unter Einwirkung vom TGF- β_1 aus Fibroblasten entstehen (Leask u. Abraham 2004, Petrov et al. 2002). Kardiales Alpha-Aktin 1 (engl. alpha cardiac muscle actin 1, ACTC1) ist ein vorwiegend in Kardiomyozyten nachgewiesenes Gen, durch Punktmutationen veränderte Expression dessen zur hypertrophen Kardiomyopathie führt (Debold et al. 2010). Die Gene Atriales natriuretisches Peptid (ANP) und Brain natriuretisches Peptid (BNP) werden bei Überdehnung der Vorhofbzw. Ventrikelwand des Herzens produziert und haben eine kompensatorische Vasodilatation zur Folge (Bauer et al. 1998, Potter et al. 2009, Calvieri et al. 2012). Bei länger anhaltender Druckbelastung kommt es zur Hypertrophie (Potter et al. 2009). Myosin, schwere Kette, Alpha (engl. myosin heavy chain alpha, MYH6 oder MHC-α) und Myosin, schwere Kette, Beta (engl. myosin heavy chain beta, MYH7 oder *MHC-\beta*) sind Gene, die hauptsächlich in Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Im Falle der Hypertrophie kommt es zu einer gesteigerten Expression von MYH7 zu Lasten von MYH6 (Bogaard et al. 2009). Zyklin D1 (engl. cyclin D1, CCND1) ist ein Proliferationsgen, das infolge eines durch Tumore oder Hypertrophie beschleunigten Zellzyklus vermehrt exprimiert wird und mit Wachstumsfaktoren in Zusammenhang steht (Dowdy et al. 1993, Busk et al. 2002). Die Kollagen (engl. collagen, COL) Gene spielen eine große Rolle bei der Fibrose. Im Bereich des Herzens sind die Gene COL1A1, COL1A2 und COL3A1 von besonderer Bedeutung. Bei erhöhten Druckverhältnissen kommt es zunächst zu einer vermehrten Expression von COL3A1, wobei COL1A1 und COL1A2 dicke, COL3A1 dünne Kollagenfasern der Extrazellularmatrix kodieren (Bishop u. Lindahl 1999, Khan u. Sheppard 2006). Das COL2A1-Gen wird im Knorpelgewebe exprimiert, spielt jedoch auch bei der Dysfunktion von Herzklappen eine Rolle (Burgeson u. Nimni 1992, Peacock et al. 2008). COL4A1 kodiert Bestandteile der Basalmembran (Bishop u. Lindahl 1999). Eine erhöhte Expression von COL8A1 wird für die Steifheit von Arterien verantwortlich gemacht (Kreymborg et al. 2010). Das Cartilage intermediate layer Protein (CILP) Gen kommt im Knorpel-, aber auch im Herzgewebe vor, wo es für die Inhibition des TGF-β₁ Signalweges zuständig ist (Kreymborg et al. 2010).

3.1.4 Antikörper

Die jeweils optimale Verdünnung der beim Western Blot (Kapitel 3.2.5, S. 34 ff.) verwendeten Primär- (Tabelle 4) und Sekundärantikörper (Tabelle 5) wurde experimentell bestimmt.

Primärantikörper	Wirt	Verdünnung	Produkt	Firma
5-HTR2A	Kaninchen	1:1000	24288	ImmunoStar Inc., Hudson, USA
5-HTR2B	Schaf	1:1000	15080	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
α-SMA	Schaf	1:1000	5694	Abcam plc., Cambridge, UK
GAPDH	Maus	1:5000	600-502	Novus Biologicals LLC, Littleton, USA
P-SMAD2	Kaninchen	1:500	3101	
P-SMAD3	Kaninchen	1:500	9520	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
SMAD2/3	Kaninchen	1:500	3102	

Tabelle 4: Primärantikörper

Tabelle 5: Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Wirt	Verdünnung	Produkt	Firma
Anti-Kaninchen	Schaf	1:60000 (5-HTR2A) 1:40000 (Rest)	^{2A)} A-9169	
Anti-Maus	Kaninchen	1:50000 (GAPDH)	A-9044	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Anti-Schaf	Kaninchen	1:60000 (5-HTR2B) 1:40000 (α-SMA)	A-8919	

3.1.5 Primer

Alle Primer wurden bei der Metabion GmbH (Martinsried) gekauft und auf ihre Wirksamkeit getestet. Sie bestehen aus Sequenzen von synthetischen Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid, DNA*) Oligonukleotiden, die den Anfang und das Ende eines für ein Maus- (Tabelle 6) oder Rattengen (Tabelle 7, S. 18) spezifischen Genproduktes markieren.

Gen	Vorwärts-/Rückwärts-Primersequenz (5ʻ➔3ʻ)	Produktlänge [Bp]	Temperatur [°C]
ANP	V: CAGCTGCTTCGGGGGTAGGA R: CCAAGCTGCGTGACACACCA	162	59
BNP	V: CGGGTCCAGCAGAGACCTCA R: CTGGGGAAAGAGACCCAGGCA	180	62
CCND1	V: GGGCAGCCCCAACAACTTCC R: TCCTCAGTGGCCTTGGGGTC	168	59
ACTA2	V: AAACGAACGCTTCCGCTGCC R: ACCCCCTGACAGGACGTTGT	154	62
ACTC1	V: AATGGCTCCGGGCTGGTGAA R: CCTCGCTTGCTCTGGGCTTC	155	58
COL1A1	V: ACCAGCAGACTGGCAACCTCA R: CATCGATGATGGGCAGGCGG	192	58
COL1A2	V: GATGAGGAGACGGGCAGCTT R: AATGTCAAGGAACGGCAGGC	195	58
COL2A1	V: CTTGCTCATCCAGGGCTCCA R: TGTCCATGGGTGCGATGTCA	179	58
COL3A1	V: TGGATCAGGCCAGTGGCAATGT R: AGACTGTCTTGCTCCATTCCCCA	150	59
MYH6	V: TCCAAGTTCCGCAAGGTGCAG R: ATTGGCCACAGCGAGGGTCT	162	59
MYH7	V: GGAGCAGGCCAACACCAACC R: GGCACCCTTGGAGCTGGGTA	180	59
5-HTR2A*	V: CCAGAACCAAAGCCTTCCTG R: CCATGATGGTTAGGGGGATG	189	57
5-HTR2B*	V: CAGGCCAATCAGTGCAACTC R: AAGCGGTCCTTTGTCAGCTC	158	55
HPRT1*	V: GCTGACCTGCTGGATTACAT R: TTGGGGCTGTACTGCTTAAC	242	55, 57, 58, 59, 62
PBGD*	V: AGAAGAGCCTGTTTACCAAGGAG R: TTTCTCTGTAGCTGAGCCACTCT	253	58

Tabelle 6: Maus-Primersequenzen

* im Labor etablierte Primersequenz, Bp = Basenpaare, Temperatur = Anlagerungstemperatur

Gen	Vorwärts-/Rückwärts-Primersequenz (5ʻ➔3ʻ)	Produktlänge [Bp]	Temperatur [°C]
ANP	V: TCAAGCTGCTTCGGGGGTAG R: ACCTCTCAGTGGCAATGCGA	166	58
BNP*	V: CAGCTGCCTGGCCCATCACT R: GCTCCAGCAGCTTCTGCATCGT	167	58
CCND1	V: GGAGTGTGGTGGCCGCGATG R: GCCTGGCGCAGGCTTGACTC	169	58
ACTA2	V: CATTGGAATGGAGTCGGCGGGC R: TCTTCATGGTGCTGGGAGCGAGG	182	58
ACTC1	V: TGTGCGACAATGGCTCCGGAC R: TGCCTCGCTTGCTCTGAGCCT	165	58
COL1A1*	V: AGATGGTCGCCCTGGACCCG R: GGGACACCTCGTTCTCCAGCCT	120	58
COL1A2	V: GCCCAACCTGTCAACACCCCA R: AGCACGGTTGGCTAGCAGGC	177	58
COL2A1*	V: ACGGCGGCTTCCACTTCAGC R: AGGTTGCCGGCTGCTTCGTC	160	58
COL3A1*	V: CCCTGCTCGGAATTGCAGAGACC R: CCGCGGGACAGTCATGGGAC	166	58
COL4A1	V: GTGCCCCATTCATCGAGTGCCA R: TGACATGCGTGCGCAGCTCC	150	58
COL8A1	V: GAGACGGGACCCAGCCCCATT R: GCACCGGCCTGAGCGAGTC	175	58
MYH6*	V: CGGACACTGGAGGACCAGGC R: GCCTAGCCAGCTCGCCGTTC	121	58
MYH7*	V: ACCGGAGAATCCGGAGCTGGT R: CAAGGTGCCCTTGCCTGGGG	120	58
CILP	V: GGGGTCCAGACCCGTACCCG R: GGAGGGAGATGGCCCCGTGAA	193	58
5-HTR2A	V: CTCCCTGGACCGCTATGTCG R: CAGGCAGCTCCCCTCCTTAAA	178	58
5-HTR2B	V: TGCATTCGTCAAGATTACGGTGG R: AGCCAGTGACCCAAAGAGCA	160	58
HPRT1*	V: GACTTTGCTTTCCTTGGTCA R: AGTCAAGGGCATATCCAACA	152	58
PBGD*	V: CAAGGTTTTCAGCATCGCTACCA R: ATGTCCGGTAACGGCGGC	135	58

Tabelle 7: Ratten-Primersequenzen

* im Labor etablierte Primersequenz, Bp = Basenpaare, Temperatur = Anlagerungstemperatur

Die jeweils paarweisen Primer wurden mithilfe des "Primer Designing Tools" (NCBI, Bethesda, USA) entworfen. Hierfür wurden Intron übergreifende Gensequenzen aus der Ensembl Datenbank (EBM & WTSI, Hinxton, UK) verwendet. Es erfolgte eine Verifizierung der Primersensitivität anhand bekannter FASTA-Sequenzen der zugehörigen Ribonukleinsäure (engl. *ribonucleic acid, RNA*), nämlich Boten-RNA

(engl. *messenger RNA, mRNA*), und ihrer Spezifität in Bezug auf das entsprechende Genom unter Zuhilfenahme eines Programmes namens BLAST (NCBI, Bethesda, USA). Eine Genproduktlänge von 150-200 Basenpaaren (Bp) wurde angestrebt. Für die mit * markierten Gene lagen dagegen im Labor bereits etablierte Primersequenzen vor.

3.1.6 Geräte

Bei der Durchführung der Experimente kamen die in diesem Abschnitt genannten Geräte (Tabelle 8) zum Einsatz.

Bezeichnung	Produkt	Firma	
Absaugvorrichtung	Vacusafe, 158320	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz	
Abzug	Cellgard, NU-480-400E	NuAire Inc., Plymouth, USA	
Banden-Analysegerät	Bio Doc Analyze Video System 30, 035-303	Biometra GmbH, Göttingen	
Betacounter	LS 6500	Beckman Coulter Inc., Brea, USA	
Entwicklungsmaschine	Curix 60	Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgien	
Fluoreszenzmikroskop	DM6000 B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	
Heizblock	BTD	Grant Instruments Ltd., Shepreth, UK	
Homogenisierungsgerät	Precellys 24, 03119.200.RD000	Bertin Technologies SAS, Montigny le Bretonneux, Frankreich	
Inkubator	Hera Cell 150, 51022391	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Kühlschrank (4 °C, -20 °C)	KGN34A10	Robert Bosch GmbH, Stuttgart	
Kühlschrank (-80 °C)	MDF-U4086S	Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan	
Magnetrührer, Rührstäbchen	MR Hei-Mix S, 503- 02000-00, 509-56000-00	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach	
Mikroplatten Lesegerät	Infinite M200	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz	
Mikroskop	DM IL	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	
Nagetier-Beatmungsgerät	Ventilator	Harvard Apparatus, Holliston, USA	
Pipetus	9907200	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt	
qRT-PCR-Gerät	Mx3000P, 401406	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	
pH-Meter	Five Easy pH FE20 Kit	Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA	
Plattenschüttler	Titramax 100, 544-11200-00	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach	
Rotationsmikrotom	RM2255	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar	
Schüttler (langsam)	WT 17, 042-600	Biometra GmbH, Göttingen	
Schüttler (schnell)	PMS-1000	Grant Instruments Ltd., Shepreth, UK	
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Stromgerät	PS 608, 10557023	Biometra GmbH, Göttingen	

Tabelle 8: Geräte

Bezeichnung	Produkt	Firma
Thermocycler	T3000 Thermocycler 48, 050-723	Biometra GmbH, Göttingen
Vortex Mixer	Vortex-Genie 2, 444-590	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage	XS205	Mettler-Toledo Inc., Columbus, USA
Wasseraufbereitungsgerät	Direct-Q 3, ZRQS0P0WW	Millipore Corp., Billerica, USA
Wasserbad	WNB 14 L0 M00	Memmert GmbH & Ko. KG, Schwabach
Zentrifuge (groß)	Rotina 420R, 4706	Andreas Hettich GmbH & Ko. KG, Tuttlingen
Zentrifuge	5417 R, 5407000.317	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge (klein)	Galaxy MiniStar Silverline, 521-2844	VWR International GmbH, Darmstadt

3.1.7 Sonstige Materialien

Alle verwendeten Materialien, die nicht unter die bereits erwähnten Kategorien fallen, werden hier (Tabelle 9) zusammengefasst.

Bezeichnung	Produkt	Firma	
6-Well-Platte	657160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	
48-Well-Platte	677180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	
96-Well-Platte	9017	Corning Inc., Lowell, USA	
15 ml Gefäß	352096	BD, Franklin Lakes, USA	
50 ml Gefäß	353070	BD, Franklin Lakes, USA	
Aluminiumfolie	18734	Bunzl Verpackungen GmbH, Gelsenkirchen	
Deckglas	K12436	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde	
Desinfektionsmittel	Ethanol [70 %], 27660	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken	
Entwicklungskassette	RPN11642	GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK	
Film (hypersensitiv)	28-9068-37	GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, UK	
Filter (0,22 µm)	SLGP033RS	Millipore Corp., Billerica, USA	
Filterpapier	3030917	Biometra GmbH, Göttingen	
Folie (durchsichtig)	Saran Folie	The Dow Chemical Co., Midland, USA	
Gefäß (0,5 ml, 1,5 ml)	72.649, 72.690.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	
Gefäß, ribonukleasefrei (0,2 ml)	04-012-1119	Nerbe Plus GmbH, Winsen / Luhe	
Gefäß, ribonukleasefrei (1,5 ml)	72.706.200	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	
Gefäß (2 ml), Deckel	72.694	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht	
Gefäßhalterung	110812	Schäfer Kunststofftechnik GmbH, Ortenberg	
Glasbehälter	FB33147	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	

Tabelle 9: Sonstige Materialien

Bezeichnung	Produkt	Firma	
Handschuhe	9421921	Paul Hartmann AG, Heidenheim	
Hämoclip	Hemoclip Ligating Clips, Titanium, small	Teleflex Inc., Research Triangle Park, USA	
Keramik-Kügelchen	03961-1-103	Bertin Technologies SAS, Montigny le Bretonneux, Frankreich	
Membran	162-0094	Biorad Laboratories Inc., Hercules, USA	
Multipipette	4981000.019	Eppendorf AG, Hamburg	
Neubauer-Zählkammer	1492	Hausser Scientific Co., Horsham, USA	
Normalfilm	Cronex 5	Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgien	
Objektträger	03-0061	R. Langenbrinck, Emmendingen	
Pasteurpipette	612-1702	VWR International GmbH, Darmstadt	
Pipetten (10, 100, 1000 μl)	4900000.044/133/524	Eppendorf AG, Hamburg	
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	3575.43/51/25/50	BD, Franklin Lakes, USA	
qRT-PCR-Streifen, -Deckel	AB-1183	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Szintillationsgefäß (6 ml), Deckel	6000192	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA	
Tuch	290178	SCA Hygiene Products, Göteborg, Schweden	
Vicrylfaden	Vicryl Plus, RB1-Plus, 5-0, VCP303H	Johnson & Johnson Corp., New Brunswick, USA	
T-75 Zellkulturflasche	658175	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	
Wanne	11-676-38A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	
Wattestäbchen	Q-Tips	W. Pelz GmbH & Co. KG, Wahlstedt	
Zellschaber	353085	BD, Franklin Lakes, USA	

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimente

3.2.1.1 Modell der Pulmonalarterienstenose

Die PAB hat im Gegensatz zur Monocrotalin-Injektion den Vorteil, dass die daraus resultierenden pathologischen Veränderungen primär am Herzen entstehen und somit eine spezifische Untersuchung desselben ermöglichen (Piao et al. 2010). Sie fand das erste Mal im Jahre 1916 an Hunden, später an Kaninchen Anwendung (Reid 1924, Bishop et al. 1994). Heutzutage wird sie auch an kleineren, in der Forschung gebräuchlicheren Versuchstieren wie Ratten oder Mäusen vollzogen (Fang et al. 2011, Bartelds et al. 2011). Bei der PAB-Operation wird die Pulmonalarterie mithilfe eines Aluminiumbandes, einer Naht oder eines Hämoclips auf einen bestimmten Durchmesser verengt (Reid 1924, Rockman et al. 1994, Janssen et al. 2010). Dies führt zunächst zur anpassungsbedingten Ausbildung einer

RVH. Mit der Zeit kommt es zum myokardialen Remodelling mit fibrotischen Umbauvorgängen ähnlich wie beim Karzinoidsyndrom oder in der Folge einer PAH (Bogaard et al. 2009, Palaniswamy et al. 2012). Dieses durch die PAB bedingte Remodelling bewirkt im Bereich des Herzens u. a. eine Erhöhung der Genexpression von ANP, BNP, MYH7 und CILP sowie von COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1 und COL8A1 bzw. eine Reduzierung von MYH6 (Rockman et al. 1994, Bartelds et al. 2011, Drake et al. 2011, Schäfer et al. 2009, Bishop et al. 1994, Urashima et al. 2008, Kreymborg et al. 2010). Adaptive Veränderungen im Bereich der Lunge bei nicht zu kompensierender Ausflusstraktstenose sind nur sekundär. Das PAB-Modell stellt eine Ausgangsposition für Therapiestudien am Herzen dar (Piao et al. 2010). Zum Ausschluss operationsbedingter Einflüsse werden Kontrolltiere für gewöhnlich einer Scheinoperation ohne PAB unterzogen (Bartelds et al. 2011).

3.2.1.2 Anwendung des Tiermodells

Die Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt (Aktenzeichen Männliche C57BI6J-Mäuse B2/229) bewilligt. (Charles **River** Laboratories International Inc., Wilmington, USA) wurden unter standardisierten Bedingungen im Tierstall des Max-Planck-Institutes für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim gehalten. Bei einem Körpergewicht (KG) von ungefähr 20-23 g erfolgte entweder eine PAB- oder eine Scheinoperation. Die Mäuse wurden intubiert und ihre Atmung Nagetier-Beatmungsgerät überwacht. Unter Isofluran-Anästhesie mit einem (1,5 Volumenprozent) und subkutaner Verabreichung von Buprenorphinhydrochlorid (0,3 mg/kg KG) wurde die linke Thoraxhälfte im dritten Interkostalraum eröffnet. Die Pulmonalarterie wurde freipräpariert und bei der PAB-Operation mit einem Hämoclip auf einen Durchmesser von 0,35 mm verengt. Der Thoraxverschluss erfolgte mit einer Vicrylnaht. Ab dem siebten postoperativen Tag wurde den PAB-Mäusen mindestens einmal täglich entweder ein Wirkstoff oder eine aus Ethanol, verdünnter Salzsäure (HCI) und deionisiertem Wasser bestehende Trägersubstanz i. p. verabreicht. Am 21. postoperativen Tag erfolgte unter tiefer Isofluran-Narkose nach hämodynamischer Druckmessung die Tötung aller Mäuse durch Ausblutung. Die RV wurden entnommen, gewogen und entweder in Flüssigstickstoff eingefroren mit anschließender Lagerung bei -80 °C oder in 3,5-3,7% igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (Abbildung 2, S. 23). Die Tibialänge wurde bestimmt. Die in diesem Abschnitt beschriebenen Tierexperimente wurden von Dr. Yves Schymura durchgeführt.



Abbildung 2: Versuchsaufbau der Tierexperimente

3.2.1.3 Versuchsgruppen

Die Zuweisung der Mäuse zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgte zufällig. Es wurden mehrere Versuche mit zwei bis vier Gruppen und unterschiedlicher Anzahl an Versuchstieren (n) durchgeführt:

- 1. Mäuse nach Scheinoperation, Kontrollgruppe ohne Behandlung (Sham);
- 2. PAB-Mäuse, Behandlung mit Trägersubstanz bid (Placebo);
- 3. PAB-Mäuse, Behandlung mit 0,2 mg Tergurid / kg KG bid (Tergurid);
- 4. PAB-Mäuse, Behandlung mit 5 mg SB204741 / kg KG täglich (SB204741).

Die Gruppen 3 und 4 kamen in den verschiedenen Versuchsanordnungen jeweils optional vor. Im Anschluss an die Versuche folgten eine RNA-Isolation (Kapitel 3.2.4.1, S. 29 f.) und eine Proteinisolation (Kapitel 3.2.5.1, S. 34) aus den RV sowie eine histologische Färbung (Kapitel 3.2.8, S. 42 ff.) derselben.

3.2.2 Zellkulturexperimente

Alle Pipettier- und Absaugschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen (Abzug, Flächendesinfektion, Handschuhe) mithilfe eines Pipetus (5, 10, 25 oder 50 ml-Pipette) bzw. einer an eine Absaugvorrichtung angeschlossenen Pasteurpipette.

3.2.2.1 Vorbereitung der Materialien

Das zehnfach konzentrierte (10 x) Trypsin wurde mit Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *Dulbeccos phosphate buffered saline, DPBS*) auf eine einfache Konzentration verdünnt. Das fetale Kälberserum (engl. *fetal calf serum, FCS*) wurde gefiltert (0,22 µm Filter). Das Wachstumsmedium (engl. *growth medium, GM*) wurde angesetzt, indem 50 ml eines u. a. FCS enthaltenden Wachstumszusatzes in eine Flasche mit 450 ml BM pipettiert wurden. In einer Lösung aus 498 µl bovinem Serumalbumin (BSA) mit einer Konzentration von 2 mg/ml und 2 µl einmolarer (1 M) HCI wurden 10 µg an humanem TGF- β_1 aufgelöst. Es wurden 1 mM- Wirkstofflösungen hergestellt, indem 1,702 mg Tergurid in 5 ml 99,9%igem Ethanol sowie 2,728 mg Ketanserin und 1,432 mg SB204741 in je 5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöst wurden.

3.2.2.2 Kultivierung der Zellen

Adulte, kardiale Rattenfibroblasten (engl. rat cardiac fibroblasts, RCF) (Abbildung 3, S. 25) wurden bei der Cell Applications Inc. (San Diego, USA) gekauft und in einer kältekonservierten Ampulle in der zweiten Passage geliefert. Die Ampulle mit RCF in 1 ml BM mit 10 % FCS und 10 % DMSO wurde in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Die RCF wurden dreimal jeweils unter Verwendung einer 1 000 µl-Pipette mit 1 ml vorgewärmtem GM verdünnt und durch Auf- und Abpipettieren vollständig in eine 12 ml desselben GM enthaltende T-75 Zellkulturflasche transferiert. Nach mikroskopischer Überprüfung auf eine gleichmäßige Zellverteilung wurde die Flasche in einen Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) überführt. Jeden zweiten Tag erfolgte eine Mediumerneuerung, indem das alte GM vorsichtig abgesaugt, der Boden der Zellkulturflasche mit 8 ml DPBS gewaschen und nach Absaugen von DPBS 15 ml frisches GM zugeführt wurden. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen gesplittet. Die ersten beiden Schritte glichen denen bei der Mediumerneuerung. Nach Absaugen von DPBS wurden 4 ml 1 x Trypsin hinzugegeben und die Zellkulturflasche für ca. zwei Minuten in den Inkubator überführt. Zu den nun in Trypsin schwimmenden Zellen wurden 4 ml FCS hinzugegeben und der gesamte Flascheninhalt in ein 50 ml Gefäß transferiert. Der Flaschenboden wurde unter mehrmaligem Auf- und Abpipettieren mit 8 ml DPBS gewaschen und die Flüssigkeit anschließend in dasselbe Gefäß überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation (große Zentrifuge, 4 500 min⁻¹, 20 °C) wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet durch sanftes Auf- und Abpipettieren in 10 ml GM gelöst. Die Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt. Unter Vorlage von 6,7-7,5 ml GM wurde eine Verteilung auf drei bis vier neue T-75 Zellkulturflaschen mit ca. 12-15 Tausend Zellen / cm² ($\approx 0.9-1.075$ Millionen Zellen / Flasche) angestrebt.

Die Zellexperimente wurden mit Zellen in der vierten bis maximal sechsten Passage durchgeführt (Abbildung 3, S. 25). Hierzu wurden diese beim letzten Splitten mit einer Dichte von 15 000 Zellen / cm² auf 6-Well-Platten mit 2 ml GM / Well verteilt. Beim Proliferationsversuch erfolgte die Verteilung mit einer Dichte von 30 000 Zellen / cm²

auf 48-Well-Platten mit 400 µl GM / Well. Auch die folgenden Mediumerneuerungsund BM-Schritte wurden mit einer Flüssigkeitsmenge von 2 ml bzw. 400 µl durchgeführt. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % erfolgte ein Mediumwechsel. Die Zellen wurden nach Waschung mit DPBS je nach Experiment für 24-48 Stunden auf BM gesetzt. Anschließend erfolgte mit einem erneuten Mediumwechsel die Stimulation entsprechend der jeweiligen Gruppeneinteilung für einen Zeitraum zwischen 30 Minuten und 24 Stunden. Es folgten eine RNA-Isolation (Kapitel 3.2.4.2, S. 30 f.), eine Proteinisolation (Kapitel 3.2.5.2, S. 34), ein Kollagenassay (Kapitel 3.2.6, S. 40 f.) oder ein Proliferationsassay (Kapitel 3.2.7, S. 41 f.).



Abbildung 3: Adulte, kardiale Rattenfibroblasten in BM Mikroskopische Aufnahme von kardialen Rattenfibroblasten in der vierten Passage

3.2.2.3 Modell der Stimulation mit dem transformierenden Wachstumsfaktor β_1

Der TGF- β_1 ist ein ubiquitär vorkommendes Zytokin aus der gleichnamigen Superfamilie, das über denselben Wirkmechanismus wie die selteneren Isoformen β_2 und β_3 zu kardialer Hypertrophie und Fibrose führt (Dobaczewski et al. 2011). Der für das kardiovaskuläre System wichtigere TGF- β_1 wird im Bereich des Herzens beispielsweise bei erhöhter Druckbelastung aus Kardiomyozyten und Myofibroblasten freigesetzt (Calvieri et al. 2012, Bishop u. Lindahl 1999). Er liegt zunächst in einer latenten, an ein Protein gebundenen Form vor und wird durch proteolytische Spaltung aktiviert (Ruiz-Ortega et al. 2007). Nach Bindung an den in der Zellmembran gelegenen transformierenden Wachstumsfaktor β Rezeptor (engl. *transforming growth factor* β *receptor, TGF-β-R*) Typ II, bildet letzterer zusammen mit dem TGF-β-RI, der auch ALK5 genannt wird, einen Komplex und übermittelt so die Informationen ins Zellinnere. Dort kommt es zu einer Phosphorylierung von Mitgliedern der SMAD Familie, nämlich von SMAD2/3 zu P-SMAD2 und P-SMAD3 (Massagué 2000, Dobaczewski et al. 2011). Im Komplex mit SMAD4 werden diese in den Zellkern transportiert und regulieren die Transkription der Zielgene. Je nach Zelltyp kommt es zu verschiedenen Reaktionen (Sztrymf et al. 2007). Am Herzen hat die Aktivierung von Genen in den kardialen Fibroblasten eine Fibrose als Teil des myokardialen Remodellings zur Folge (Ruiz-Ortega et al. 2007). Aufgrund einer möglichen Interaktion mit anderen Signalwegen sind die genauen Effekte einer Stimulation mit dem TGF-β₁ noch nicht vollständig geklärt (Massagué 2000, Khan u. Sheppard 2006, Ruiz-Ortega et al. 2007). Dennoch stellt der Einsatz dieses Zytokins ein mögliches Modell (Kapitel 3.2.2.7, S. 27) für die Untersuchung von Wirkstoffen auf zellulärer Ebene dar (Petrov et al. 2002, Eghbali et al. 1991, Butt et al. 1995, Lijnen et al. 2005).

3.2.2.4 Modell der Stimulation mit Basalmedium

Ein weiteres Modell (Kapitel 3.2.2.8, S. 27) besteht in einer länger anhaltenden Stimulation von Zellen wie etwa adulten RCF (Abbildung 3, S. 25) mit BM (Petrov et al. 2002). Normalerweise erfolgt nach Erreichen der gewünschten Konfluenz eine 24 Stunden dauernde Hungerphase in reinem BM. Dieses wird anschließend ohne krankheitssimulierendes Agens nur noch in der Kontrollgruppe oder in reinen Nebenwirkungsstudien wie teilweise bei Königshoff et al. 2010 verwendet. Eine längere BM Einwirkzeit von insgesamt 72 Stunden kann ähnliche Effekte wie ein Signalmolekül bewirken, z. B. eine Fibrose über die Erhöhung des löslichen Kollagengehalts (Petrov et al. 2002). Sie stellt dann einen Kompromiss zwischen Nebenwirkungs- und Krankheitsmodell dar.

3.2.2.5 Anwendung der Stimulationsmodelle

Für die Stimulation wurden 2 ml, beim Proliferationsversuch 400 μ l Medium / Well verwendet. In den BM- und GM-Gruppen kamen einfaches BM bzw. GM zur Anwendung. Für die übrigen Gruppen wurden jeweils mindestens 10 ml Medium hergestellt. In den TGF- β_1 Gruppen wurden pro 10 ml GM 2,5 bzw. 5 μ l der 20 ng/ μ l TGF- β_1 -Lösung benutzt. In den Wirkstoffgruppen wurden die 1 mM Lösungen in einem Verhältnis von 1 : 1 000 (1 μ M) bzw. 1 : 10 000 (100 nM) verdünnt, d. h. es

wurden 10 bzw. 1 μ l Lösung / 10 ml Medium verwendet. Jeweils dieselbe Menge an 99,9%igem Ethanol bzw. DMSO kam bei den adäquaten Kontrollgruppen (Ethanol bzw. DMSO 100 nM / 1 μ M) zum Einsatz.

3.2.2.6 SMAD-Versuch zum Nachweis eines Phosphorylierungsschrittes des transformierenden Wachstumsfaktor β₁ Signalweges

Die konfluenten Zellen wurden für 24 Stunden auf BM gesetzt und anschließend 30 Minuten lang stimuliert. Es folgte eine Proteinisolation. Die Gruppeneinteilung (n = 3) lautete:

- 1. Kontrollgruppe mit BM (-FCS),
- 2. GM-Gruppe, Stimulation mit 5 ng TGF- β_1 / ml GM (TGF- β_1 5),

3. GM-Gruppe, Stimulation mit 10 ng TGF- β_1 / ml GM (TGF- β_1 10).

3.2.2.7 Zytokin-Versuch zur Überprüfung des Einflusses des transformierenden Wachstumsfaktos β_1 auf die mRNA-Expression von Remodelling-Genen sowie auf die Kollagenproduktion

Die BM- und die Stimulationsphase der konfluenten Zellen dauerten jeweils 24 Stunden. Eine RNA- und eine Proteinisolation sowie ein Kollagenassay schlossen sich an. Die Gruppen (n = 3) setzten sich wie folgt zusammen:

1. Kontrollgruppe mit BM (-FCS),

- 2. GM-Gruppe, Stimulation mit 5 ng TGF- β_1 / ml GM (TGF- β_1 5),
- 3. GM-Gruppe, Stimulation mit 10 ng TGF- β_1 / ml GM (TGF- β_1 10).

3.2.2.8 Basalversuch als alternative Stimulationsmethode zur Analyse der Nebenwirkungen von Tergurid und der Trägersubstanz Ethanol

Die konfluenten Zellen wurden 48 Stunden lang auf BM gesetzt. Die Stimulation dauerte 24 Stunden. Eine RNA- und eine Proteinisolation sowie ein Kollagenassay folgten. Die Gruppeneinteilung (n = 3 bzw. $n_{Kollagen auf Proteinebene} = 4$) bestand aus:

- 1. Kontrollgruppe mit BM (-FCS),
- 2. Kontrollgruppe, 0,1 µl Ethanol (99,9 %) / ml BM (Ethanol 100 nM),
- 3. Wirkstoffgruppe, 0,1 µl Tergurid (1 mM) / ml BM (Tergurid 100 nM),
- 4. Kontrollgruppe, 1 µl Ethanol (99,9 %) / ml BM (Ethanol 1 µM),
- 5. Wirkstoffgruppe, 1 μ I Tergurid (1 mM) / mI BM (Tergurid 1 μ M).

3.2.2.9 Proliferationsversuch zum Nachweis des Einflusses der untersuchten Wirkstoffe auf die Zellproliferation

Die BM- und die Stimulationsphase der konfluenten Zellen dauerten jeweils 24 Stunden. In Letzterer erfolgte aber nach 20 Stunden eine Mediumerneuerung mit pro Well 250 μ l [Methyl-Tritium]-Thymidin haltigem Medium. Die Gruppeneinteilung (n = 6) für drei verschiedene Versuche erfolgte nach folgendem Schema:

- 1. Kontrollgruppe mit BM (-FCS),
- 2. Kontrollgruppe mit GM (+FCS),
- 3. Kontrollgruppe, 0,1 µl Trägersubstanz / ml GM (Trägersubstanz 100 nM),
- 4. Wirkstoffgruppe, 0,1 µl Wirkstoff (1 mM) / ml GM (Wirkstoff 100 nM),
- 5. Kontrollgruppe, 0,5 µl Trägersubstanz / ml GM (Trägersubstanz 500 nM),
- 6. Wirkstoffgruppe, 0,5 µl Wirkstoff (1 mM) / ml GM (Wirkstoff 500 nM),
- 7. Kontrollgruppe, 1 µl Trägersubstanz / ml GM (Trägersubstanz 1 µM),
- 8. Wirkstoffgruppe, 1 μ I Wirkstoff (1 mM) / mI GM (Wirkstoff 1 μ M).

Als Wirkstoffe dienten Tergurid, Ketanserin und SB204741 mit 99,9%igem Ethanol (Tergurid) bzw. DMSO (Ketanserin / SB204741) als Trägersubstanz.

3.2.3 Grundlagen der Untersuchungungstechniken

Die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. quantitative realtime polymerase chain reaction, gRT-PCR) (Kapitel 3.2.4, S. 29 ff.) dient zur Echtzeit-Bestimmung der Menge an Nukleotidseguenzen z. B. von Genprodukten, die in einer Probe in Form von transkribierter RNA vorliegen (Reinard 2010a). Da einzelne Untersuchungsschritte einer relativ hohen Fehlerwahrscheinlichkeit unterliegen, kann es zu ungenauen Ergebnissen kommen. Es werden die Formen der absoluten von der hier zur Anwendung kommenden relativen Quantifizierung unterschieden, bei der die Menge an Zielgenprodukt-Transkripten in Relation zu denen eines in verschiedenen Versuchsgruppen gleichermaßen exprimierten Haushaltsgens gesetzt wird (Schmidt u. Rothämel 2011). Der Western Blot (Kapitel 3.2.5, S. 34 ff.) im eigentlichen Sinne ist eine Methode zur Übertragung von Proteinen auf eine Membran, die einen zuverlässigen Nachweis derselben durch spezifische Antikörper ermöglicht (Reinard 2010b). Die Proteine werden zur besseren Identifizierung vorher mithilfe Natriumdodecylsulfat (engl. dodecvl der sodium sulfate. SDS) Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) der Größe nach aufgetrennt (Watson et al. 2011). Das in dieser Arbeit verwendete Kollagenassay (Kapitel 3.2.6, S. 40 f.) ist eine Färbemethode zur Quantifizierung des Gehalts an löslichem Kollagen ohne Differenzierung der einzelnen Kollagentypen (Catalán et al. 2012). Beim Proliferationsassay (Kapitel 3.2.7, S. 41 f.) ermöglicht die radioaktive Markierung von bei der Zellteilung neu entstandener DNA beispielsweise mittels [Methyl-Tritium]-Thymidin eine relativ genaue Bestimmung der Proliferationsrate in den einzelnen Experimentgruppen (Griffiths u. Sundaram 2011). Die histologische Färbung (Kapitel 3.2.8, S. 42 ff.) dient zur Kontrasterhöhung von lichtmikroskopisch betrachteten Komponenten, die sich auf Gewebeschnitten befinden (Lang 2013). Bei der in der vorliegenden Arbeit angewandten Pikro-Siriusrot-Spezialfärbung werden Kollagenfasern angefärbt (Sweat et al. 1964).

3.2.4 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Alle Pipettierschritte wurden unter Verwendung von 10, 100 und 1 000 µl-Pipetten an einem RNA-Arbeitsplatz durchgeführt.

3.2.4.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Die Gesamt-RNA wurde aus den RV mithilfe eines RNeasy Micro Kits extrahiert. Die einzelnen Schritte fanden, wenn nicht anders angegeben, bei einer Raumtemperatur (RT) von ca. 22 °C statt. Es kam 99,9% iger Ethanol zur Anwendung, der mit ribonukleasefreiem Wasser verdünnt wurde. Bis zu 5 mg an gefrorenem Herzgewebe (Kapitel 3.2.1, S. 21 ff.) wurden abgewogen und in eisgekühlte (4 °C) 2 ml Gefäße mit zehn 2,8 mm im Durchmesser fassenden Keramik-Kügelchen und 350 µl einer Mischung aus 346,5 μl RLT-Puffer und 3,5 μl β-Mercaptoethanol (β-ME) transferiert. Der Gefäßinhalt wurde im Homogenisierungsgerät unter zwischenzeitlicher Kühlung im Zeitraum von 80 Sekunden zweimal 20 Sekunden lang homogenisiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation (13 000 min⁻¹, 4 °C) wurde der Überstand in ein ribonukleasefreies 1,5 ml Gefäß überführt und mit ca. 320 µl 70%igem Ethanol durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Der Gefäßinhalt wurde in eine sich in einem 2 ml Sammelgefäß befindliche Spin-Säule überführt und zentrifugiert (15 s, 10 500 min⁻¹). Das Eluat wurde verworfen. 350 µl RW1-Puffer wurden hinzugegeben und zentrifugiert (15 s, 10 500 min⁻¹). Das Eluat wurde verworfen und die Spin-Säule mit 80 µl einer Mischung aus 10 µl Desoxyribonuklease I und 70 µl RDD-Puffer überlagert. 15 Minuten lang wurde das Ganze offen stehen gelassen. Nach Hinzufügen von 350 µl RW1-Puffer und kurzer Zentrifugation (15 s, 10 500 min⁻¹) erfolgte die Erneuerung des Sammelgefäßes. 500 µl RPE-Puffer wurden hinzugefügt

und das Eluat nach wiederholter Zentrifugation (15 s, 10 500 min⁻¹) verworfen. Nach Hinzugabe von 500 µl 80%igem Ethanol wurde zwei Minuten lang zentrifugiert (10 500 min⁻¹) und das Sammelgefäß abermals erneuert. Mit offenem Deckel wurde zweimal zentrifugiert (je 5 min, 13 000 min⁻¹). Die Spin-Säule wurde in ein 1,5 ml Sammelgefäß transferiert. Nach Hinzufügen von 14 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wasser erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation (13 000 min⁻¹). Die Spin-Säule wurde verworfen und das aus Gesamt-RNA bestehende Eluat auf 4 °C heruntergekühlt. Das Gefäß wurde auf einem Vortex Mixer geschüttelt und zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹, 4 °C). Die RNA-Konzentration und ihre Reinheit wurden mit einem Spektrophotometer gemessen. Aufgrund einer Verunreinigung im Laufe der Präparation wurde beim Tergurid-Versuch eine Probe aus der Placebo-Gruppe herausgenommen.

3.2.4.2 RNA-Isolation aus Zellen

Am Ende der Stimulationsphase wurden unter sterilen Bedingungen das Medium abgesaugt und die RCF (Kapitel 3.2.2, S. 23 ff.) mit 2 ml DPBS / Well gewaschen. Nach Absaugen von DPBS erfolgte die Benetzung der Zellen mit 500 µl Trizol / Well. Die 6-Well-Platten wurden drei Minuten lang stehen gelassen und anschließend die Lyse der RCF mithilfe von Zellschabern unterstützt. Das Lysat wurde in jeweils ein ribonukleasefreies 1,5 ml Gefäß transferiert, das zwischen den folgenden Schritten immer bei RT gelagert wurde. Nach fünfminütiger Einwirkzeit und zehnminütiger Zentrifugation (10 500 min⁻¹, 4 °C) erfolgte die Hinzugabe von 100 µl Chloroform. Das Gemisch wurde mit der Hand stark geschüttelt und zehn Minuten lang stehen gelassen. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 10 500 min⁻¹, 4 °C) wurden ca. oberen, wässrigen Phase abgenommen und in 200 ul der ein neues ribonukleasefreies 1,5 ml Gefäß überführt. 250 µl Isopropanol wurden hinzugegeben und der Inhalt durch Invertieren gemischt. Nach einer Einwirkzeit von zehn Minuten schloss sich eine ebenso lange Zentrifugation (10 500 min⁻¹, 4 °C) an. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das übriggebliebene RNA-Pellet mit 500 µl 75% igem Ethanol gewaschen, das aus 375 µl 99,9% igem Ethanol und 125 µl DEPC Wasser hergestellt wurde. Nach fünfminütiger Zentrifugation (6 600 min⁻¹, 4 °C) erfolgte das vollständige Abpipettieren des Ethanols. Das Pellet wurde zehn Minuten lang mit offenem Deckel getrocknet und anschließend durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren in 15 µl DEPC Wasser resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation bei 55 °C in einem Heizblock wurde das Gefäß auf einem Vortex Mixer geschüttelt,
erneut zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹, 4 °C) und auf 4 °C abgekühlt. Es folgte die Messung der Gesamt-RNA-Konzentration und ihrer Reinheit mit einem Spektrophotometer.

3.2.4.3 Synthese von komplementärer DNA

Die Synthese von komplementärer DNA (engl. *complementary DNA, cDNA*) erfolgte unter Zuhilfenahme eines ImProm-II Reverse Transcription Systems. Das Reaktionsgemisch A (Tabelle 10) wurde hergestellt, indem je 2 μ I Oligo(dT)₁₅-Primer mit einer Konzentration von 0,5 μ g/ μ I in eisgekühlte 0,2 ml Gefäße mit 8 μ I jeweils mit DEPC Wasser auf 125 ng/ μ I verdünnter Gesamt-RNA gegeben wurden. Ein konstanter Anteil an mRNA wurde angenommen.

Tabelle 10: cDNA Reaktionsgemisch A

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration* [ng/µl]
Gesamt-RNA [125 ng/µl]	8	25
Oligo(dT) ₁₅ -Primer [0,5 μg/μl]	2	25

* bezogen auf 40 µl Gesamtreaktionsgemisch

Nach sechsminütiger Inkubation bei 70 °C in einem Thermocycler wurde das Gemisch fünf Minuten lang auf Eis gestellt und anschließend kurz zentrifugiert (kleine Zentrifuge, 10 s, 6 000 min⁻¹, RT). Pro Gefäß wurden 30 μ l Reaktionsgemisch B (Tabelle 11) hinzugegeben.

Tabelle 11: cDNA Reaktionsgemisch B

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

* bezogen auf 40 µl Gesamtreaktionsgemisch

Das Gesamtreaktionsgemisch wurde nach folgendem Schema in einem Thermocycler inkubiert: 5 min bei 25 °C \rightarrow 1 h bei 42 °C \rightarrow 15 min bei 70 °C. Die entstandene cDNA (25 ng/µl) wurde auf 4 °C heruntergekühlt und anschließend kurz zentrifugiert (kleine Zentrifuge, 10 s, 6 000 min⁻¹, RT).

3.2.4.4 Prozess der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die qRT-PCR wurde mithilfe eines Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG Kits durchgeführt. Die 50 μ M-Primerlösungen wurden mit DEPC Wasser auf eine Konzentration von 10 μ M für die Maus-Gene ACTA2, BNP, COL1A2 und HPRT1 bzw. 5 μ M für das Maus-Gen HPRT1 und alle übrigen Gene vorverdünnt. Für jedes Primerpaar erfolgte die Herstellung des Reaktionsgemisches (Tabelle 12) zunächst ohne cDNA-Komponente in einem ribonukleasefreien 1,5 ml Gefäß. 24 μ l dieses Teilgemisches bzw. 23 μ l bei den tierexperimentellen 5-HTR-Genen wurden dann pro 0,2 ml Gefäß in bis zu acht eisgekühlte qRT-PCR-Streifen mit je acht 0,2 ml Gefäßen pipettiert und anschließend jeweils 1 μ l bzw. 2 μ l (5-HTR-Mausgene) cDNA hinzugegeben. Für die Leerprobe (engl. *no template control, NTC*) wurde DEPC Wasser anstatt von cDNA verwendet.

Komponente	Volumen [µl]	Endkonzentration*
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix- UDG [2 x]	12,5	1 x
MgCl ₂ [50 mM]	1	5 mM**
Vorwärts-Primer [5 / 10 µM]	0,5	0,1 / 0,2 µM
Rückwärts-Primer [5 / 10 µM]	0,5	0,1 / 0,2 µM
ROX Reference Dye [25 µM]	0,1	0,1 µM
cDNA [25 / 50 ng/µl] bzw. DEPC Wasser	1 / 2 bzw. 1 / 2	1 / 2 ng/µl bzw
DEPC Wasser	9,4 / 8,4	-

Tabelle 12: qRT-PCR Reaktionsgemisch

 * bezogen auf 25 µl Reaktionsgemisch, ** Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDP [1 x] enthält bereits 3 mM MgCl₂

Alle Proben wurden im Doppelansatz pipettiert. Die Streifen wurden mit qRT-PCR-Deckeln verschlossen, auf einem Vortex Mixer geschüttelt und zentrifugiert (kleine Zentrifuge, 30 s, 6 000 min⁻¹, RT). Nach Überführung in ein qRT-PCR-Gerät erfolgte die Programmierung (Tabelle 13, S. 33) mit der für die jeweils verwendeten Primerpaare am besten geeigneten Anlagerungstemperatur (Tabelle 6, S. 17 und Tabelle 7, S. 18).

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95	10 min	1
Denaturierung	95	30 s	
Anlagerung	55, 57, 58, 59 oder 62*	30 s	40
Elongation	72	30 s	
Denaturierung	95	1 min	1
Schmelzkurve	55-95	undefiniert	1
Abkühlung	25	∞	1

Tabelle 13: qRT-PCR Programm

* Anlagerungstemperatur des jeweiligen Primerpaares siehe Tabelle 6, S. 17 oder Tabelle 7, S. 18

Als Referenzgen wurden HPRT1 bzw. bei den 5-HTR-Genen im Tierexperiment PBGD verwendet, die unter den gleichen Bedingungen (Programmierung, cDNA- und Primerkonzentration) untersucht wurden. Die Daten der qRT-PCR wurden mit dem Computer-Programm MxPro Mx3000P 4.1 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) aufgezeichnet und analysiert. Aus den Doppelansätzen wurde pro Gen für jede Probe ein Wert für den Schwellenwert-Zyklus (engl. *cycle threshold, Ct*) berechnet. Der Schwellenwert für die Ct-Werte wurde automatisch bestimmt.

3.2.4.5 Auswertung

Die Auswertung der Ct-Werte erfolgte unter Zuhilfenahme der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Livak u. Schmittgen 2001). Für jede einzelne Probe wurde der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen: Δ Ct = Ct_{Gen} - Ct_{Referenzgen}. Der arithmetische Gruppen-Mittelwert (MW) dieser Δ Ct-Werte wurde gebildet und der dazugehörige Standardfehler (engl. *standard error of the mean, SEM*) bestimmt. Der Δ Ct-MW der Kontrollgruppe (Sham, -FCS) wurde jeweils von den Δ Ct-MW aller vorhandenen Gruppen abgezogen: $\Delta\Delta$ Ct_{Gruppe} = Δ Ct-MW_{Gruppe} - Δ Ct-MW_{Kontrollgruppe}. Die Umrechnung von der logarithmischen in die lineare Darstellungsweise erfolgte für die $\Delta\Delta$ Ct-Gruppenwerte mithilfe folgender Formel: Relative mRNA-Genexpression = $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Das SEM-Intervall wurde durch Einsetzen seiner oberen ($\Delta\Delta$ Ct - SEM) und unteren Grenze ($\Delta\Delta$ Ct + SEM) in dieselbe Formel umgerechnet. Für die Darstellung der Ergebnisse mit dem Computer-Programm GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) wurde die Prozentschreibweise gewählt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der einzelnen Δ Ct-Werte.

3.2.5 Western Blot

Alle Pipettierschritte fanden, wenn nicht anders angegeben, unter Verwendung von 10, 100 und 1 000 µl-Pipetten bei RT statt.

3.2.5.1 Proteinisolation aus Gewebe

Die Proteinisolation aus den RV erfolgte mithilfe eines Radioimmunpräzipitations-Assay (RIPA) Lysepuffer Systems. Der RIPA Lysepuffer wurde hergestellt, indem je 1 ml Lysepuffer 20 µl eines in DMSO gelösten Protease Inhibitor Cocktails, 10 µl in DMSO gelöstes Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 10 µl in DEPC Wasser gelöstes Sodium Orthovanadat hinzugegeben wurden. Je 10 mg an gefrorenem Herzgewebe (Kapitel 3.2.1, S. 21 ff.) kamen 80 µl RIPA Lysepuffer zur Anwendung, wobei jedoch pro Gefäß mindestens 120 µl verwendet wurden. Das abgewogene Herzgewebe wurde in eisgekühlte 2 ml Gefäße mit zehn 2,8 mm im Durchmesser fassenden Keramik-Kügelchen und entsprechender Menge an RIPA Lysepuffer transferiert. Es erfolgte die unter zwischenzeitlicher Kühlung im Zeitraum von 80 Sekunden zweimal 20 Sekunden lange Homogenisierung des Gefäßinhaltes im Homogenisierungsgerät. Nach 30-minütiger Zentrifugation (13 000 min⁻¹, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues, eisgekühltes 1,5 ml Gefäß überführt.

3.2.5.2 Proteinisolation aus Zellen

Im Anschluss an die Stimulationsphase wurden unter sterilen Bedingungen das Medium abgesaugt und die RCF (Kapitel 3.2.2, S. 23 ff.) mit 2 ml DPBS / Well gewaschen. DPBS wurde abgesaugt und die Zellen mit 100 µl RIPA Lysepuffer / Well benetzt. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Unterstützung der Lyse der RCF mit Zellschabern. Das Lysat wurde in je ein eisgekühltes 1,5 ml Gefäß überführt, das im Abstand von zehn Minuten dreimal auf einem Vortex Mixer geschüttelt wurde. Nach 30 Minuten langer Zentrifugation (13 000 min⁻¹, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues, auf Eis gelagertes 1,5 ml Gefäß transferiert.

3.2.5.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der in RIPA Lysepuffer gelösten Proteine erfolgte mithilfe des DC Protein Assay Kits II, einer Abwandlung der Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951). Vier BSA-Standards mit Konzentrationen von 2, 1, 0,5 und 0,25 mg/ml wurden hergestellt, indem ausgehend von 200 μ l eines in ein 1,5 ml Gefäß pipettierten 2 mg/ml BSA-Standards jeweils 100 μ l entnommen, in einem neuen Gefäß mit 100 μ l DEPC Wasser verdünnt und auf einem Vortex Mixer

geschüttelt wurden. Eine Vorverdünnung der auf Eis gestellten Proben schloss sich an. Hierzu wurden pro Gewebe-Probe 4 µl Proteinlösung und 76 µl DEPC Wasser, pro Zell-Probe je 6 µl verwendet. Bei einer aus RIPA Lysepuffer bestehenden Kontrollprobe wurde entsprechend verfahren. Die Herstellung von Reagenz A* erfolgte durch Hinzugabe von 20 µl Reagenz S pro 1 ml Reagenz A. Zweimal 5 µl aller eisgekühlten Proben wurden in je zwei Wells einer bei RT gelagerten 96-Well-Platte pipettiert. 25 µl Reagenz A* und 200 µl Reagenz B wurden jeweils hinzugegeben. Nach Entfernung eventueller Blasen mit einer 10 µl-Pipette erfolgte die Überführung der Platte in ein Mikroplatten-Lesegerät. Die Absorption bei 750 nm wurde nach einer 15-minütigen Schüttelphase gemessen. Die unter Zuhilfenahme des zugehörigen Computer-Programms Magellan (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) anhand der Standardkurve und unter Abzug des Kontrollprobenwertes berechneten Konzentrationswerte wurden mit dem benutzten Verdünnungsfaktor multipliziert.

3.2.5.4 Vorbereitung

Die Herstellung von Reinstwasser aus deionisiertem Wasser erfolgte mit einem Wasseraufbereitungsgerät. Der 5 x SDS Probenpuffer (Tabelle 14), der Laufpuffer (Tabelle 15, S. 36) und der Blotting-Puffer (Tabelle 16, S. 36) wurden vorbereitet und anschließend auf einem Vortex Mixer kurz geschüttelt (5 x SDS Probenpuffer) bzw. mithilfe eines Magnetrührers mit einem Rührstäbchen eine halbe Stunde lang gemischt (Lauf- / Blotting-Puffer).

Komponente	Masse / Volumen	Endkonzentration*
TRIS-HCI [1 M, pH 7,6**]	3,75 ml	341 mM
SDS	1 g	9,09 %
Glycerol	5 ml	45,45 %
β-ME	1,25 ml	11,36 %
Bromophenolblau	ca. 2 mg	ca. 0,02 %

Tabelle 14: 5 x SDS Probenpuffer

* bezogen auf 10 ml Pufferlösung, ** mit HCl im Nachhinein auf einen pH-Wert von 6,8 eingestellt

Komponente	Masse / Volumen	Endkonzentration*
TRIS	6 g	25 mM
Glycin	28,8 g	192 mM
SDS [10 %]	20 ml	0,1 %
Deionisiertes Wasser	ca. 1 945,2 ml	-

Tabelle 15: Laufpuffer

* bezogen auf 2 L Pufferlösung

Tabelle 16: Blotting-Puffer

Komponente	Masse / Volumen	Endkonzentration*
TRIS	6 g	50 mM
Glycin	3 g	40 mM
Methanol	200 ml	20 %
Deionisiertes Wasser	ca. 791 ml	-

* bezogen auf 1 L Pufferlösung

Ein Liter 20 x Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) gepufferter Salzlösung (engl. *TRIS buffered saline, TBS*) wurde aus 48,4 g TRIS, 160 g Natriumchlorid (NaCl) und ca. 791,6 ml deionisiertem Wasser hergestellt. Die Einstellung dieser 400 mM TRISund 2,74 M NaCl-Lösung auf einen pH-Wert von 7,6 erfolgte mit HCl unter Zuhilfenahme eines pH-Meters. Eine Lösung aus TBS und Tween 20 (TBST) ergab sich, indem 50 ml 20 x TBS und 1 ml Tween 20 in einen Glasbehälter pipettiert und mit deionisiertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt wurden. Durch Hinzugabe von 5 g Milchpulver pro 100 ml TBST entstand 5%ige Milch.

3.2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE erfolgte unter Zuhilfenahme einer Minigel-Twin Apparatur. Zweimal zwei Platten wurden gesäubert, desinfiziert und jeweils unter Verwendung eines Dichtungsgummis und dreier Klemmen mit einem gegenseitigen Abstand von 1 mm zusammengesetzt. Das 10%ige Trenngel (Tabelle 17, S. 37) und das 6%ige Sammelgel (Tabelle 18, S. 37) wurden hergestellt, wobei die Hinzugabe von mit Reinstwasser vorverdünntem 10%igen Ammoniumpersulfat (APS) und unverdünntem N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) erst kurz vor der weiteren Verarbeitung erfolgte.

Komponente	Volumen	Endkonzentration*
TRIS [1,5 M, pH 8,8]	1,5 ml	375 mM
Rotiphorese Gel 30 [30 % Acrylamid]	2 ml	10 %
Reinstwasser	2,4 ml	-
SDS [10 %]	60 µl	0,1 %
APS [10 %]	30 µl	0,05 %
TEMED	6 µl	ca. 0,1 %

Tabelle 17: 10% iges Trenngel

* bezogen auf 6 ml Trenngel

Tabelle 18: 6% iges Sammelgel

Komponente	Volumen	Endkonzentration*
TRIS [0,5 M, pH 6,8]	625 µl	125 mM
Rotiphorese Gel 30 [30 % Acrylamid]	500 µl	6 %
Reinstwasser	1,34 ml	-
SDS [10 %]	25 µl	0,1 %
APS [10 %]	12,5 µl	0,05 %
TEMED	2,5 µl	ca. 0,1 %

* bezogen auf 2,5 ml Sammelgel

Pro Plattenkonstruktion wurden ca. 5 ml 10%iges Trenngel bis etwa 2 cm unter den oberen Rand des Zwischenraumes hineingegossen und mit 1 ml Reinstwasser überlagert. Nach 30 Minuten langer Polymerisation wurde das Wasser abgegossen, die Konstruktion jeweils bis zum Rand mit 6%igem Sammelgel befüllt und je nach Versuch ein 10- oder 16-Well-Kamm vorsichtig und ohne Blasenbildung im Gel platziert. Nach einstündiger Polymerisation erfolgten die Entfernung des Kammes und die Überführung der Platten in die Minigel-Twin Kammer mit anschließender Hinzugabe von ca. 400 ml Laufpuffer. Die Proben wurden vorbereitet, indem unterschiedliche Volumina der auf Eis gestellten Proteinlösungen mit demselben Mehrfachen eines versuchsspezifischen Proteingehalts (Tabelle 19) in je ein 1,5 ml Gefäß pipettiert und mit RIPA Lysepuffer sowie 20 µl 5 x SDS Probenpuffer je 100 µl Endlösung auf ein für alle Proben gleiches Endvolumen aufgefüllt wurden.

Drimärantikärnar	Proteingehalt [µg]		
Primarantikorper	Tierexperimente	SMAD-Versuch	Basalversuch
GAPDH	20	12	10
Versuchs-Antikörper	50	32	15

Tabelle 19: SDS-PAGE Proteingehalt

Die eisgekühlten Gefäße wurden auf einem Vortex Mixer geschüttelt und anschließend kurz zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹, 4 °C). Nach zehnminütiger Inkubation bei 100 °C in einem Heizblock erfolgte die Herabkühlung der Gefäßinhalte auf 4 °C. Die Proben und ein Protein-Marker wurden vor Beladung der Gelkammern erneut geschüttelt und zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹, 4 °C). Angefangen bei 5 µl des Protein-Markers kam pro Gelkammer einer Plattenkonstruktion ein jeweils gleiches vorbereiteten Proben mit Volumen der dem pro Gel gewünschten, antikörperspezifischen Proteingehalt zur Anwendung (Tabelle 19, S. 37). Die eigentliche SDS-PAGE erfolgte, indem an einem Stromgerät, welches an die Minigel-Twin Kammer angeschlossenen war, 20 Minuten lang eine Spannung von 100 V eingestellt wurde mit anschließender Erhöhung auf 120 V für einen Zeitraum von etwa einer Stunde.

3.2.5.6 Prozess des Western Blots

Alle Inkubations- und Waschschritte fanden, wenn nicht anders angegeben, auf einem langsamen Schüttler statt. Das Blotten erfolgte mithilfe eines Mini Trans-Blot Cell Systems. Pro Gel wurden eine Membran und zwei Filterpapierstücke auf eine Größe von je 7 cm x 9 cm vorgeschnitten. 15 Minuten vor Ende der SDS-PAGE wurden diese sowie zwei Schwämme in Blotting-Puffer eingelegt, die Membran in einer bereitgestellten Schale, die Filter und Schwämme in der Blotting-Kammer. Nach der SDS-PAGE wurde die jeweilige Gelplatte aufgehebelt. Das Gel wurde beschnitten und in Blotting-Puffer eingelegt. Anschließend erfolgte die Überführung der oben genannten Komponenten in eine Blotting-Kassette unter Einhaltung der folgenden Anordnung: weiße Kassettenseite → Schwamm → Filter → Membran → Gel → Filter → Schwamm → schwarze Kassettenseite. Eventuelle Luftblasen wurden durch Ausrollen mithilfe eines 50 ml Gefäßes entfernt. Jeweils zwei Kassetten, eine Kühleinheit und ein Rührstäbchen wurden in die Blotting-Kammer transferiert, diese randvoll mit Blotting-Puffer befüllt und auf einen aktiven Magnetrührer gestellt. An einem angeschlossenen Stromgerät wurde für einen Zeitraum von einer Stunde eine Spannung von 100 V eingestellt. Die Überführung der beiden, mit der Proteinseite nach oben gerichteten Membranen in jeweils ein Schälchen schloss sich an. Nach einstündiger Inkubation mit ca. 18 ml 5% iger Milch wurde diese abgegossen und die überflüssigen Membranteile wurden abgeschnitten. In je einem 15 ml Gefäß mit 12 ml 5% iger Milch erfolgte die Verdünnung der Primärantikörper im jeweils optimalen Verhältnis (Tabelle 4, S. 16). Die Membranen

wurden 20 (GAPDH) bzw. 40 Minuten lang (übrige Primärantikörper) mit je einem kompletten Gefäßinhalt inkubiert und anschließend die gefüllten Schälchen über Nacht in den Kühlschrank (4 °C) gestellt. Am nächsten Tag wurden die in Milch verdünnten Primärantikörper gesammelt und die Membranen dreimal sieben Minuten lang mit ca. 15 ml TBST gewaschen. Nach jedem Waschschritt wurde die Waschlösung abgegossen. Die Verdünnung der Sekundärantikörper (Tabelle 5, S. 16) erfolgte analog zu der der Primärantikörper. Nach einstündiger Inkubation der Membranen mit 12 ml dieser nach Gebrauch verworfenen Sekundärantikörper-Milchlösung schlossen sich erneut drei sieben Minuten lange Waschschritte mit ca. 15 ml TBST und anschließendem Abgießen der Waschlösung an. Die Färbung der Membranen wurde mit einem Amersham ECL Plus Kit durchgeführt. Für die kurz vor Anwendung hergestellte Färbelösung wurden pro Membran 4 ml Lösung A und 100 µl Lösung B verwendet. Die Schälchen wurden vorsichtig mit einem Tuch getrocknet und mit 4,1 ml Färbelösung benetzt. Nach fünfminütiger Inkubation unter lichtundurchlässiger Aluminiumfolie und Abtropfen Lassen der Lösung von den Membranen erfolgte ihre luftdichte und blasenfreie Verpackung in einer durchsichtigen Folie. Die auf diese Weise eingepackten Membranen wurden in eine Entwicklungskassette transferiert. In einer Dunkelkammer wurden eine (GAPDH) oder zwanzig Sekunden lang (α-SMA) Normalfilm bzw. drei (P-SMAD2), fünf (P-SMAD3, SMAD2/3) oder zwölf Minuten lang (5-HTR-Antikörper) hypersensitiver Film eingelegt und anschließend unter Verwendung von Fixierungs- und Entwicklungsflüssigkeit sowie Leitungswasser in einer Entwicklungsmaschine entwickelt. Die Banden des Protein-Markers wurden auf dem Film markiert.

3.2.5.7 Auswertung

Die Quantifizierung der Protein-Banden erfolgte unter Zuhilfenahme eines Banden-Analysegerätes. Der eingelegte Film wurde nach optimaler Einstellung des Objektivs fotografiert und mit dem zugehörigen Computer-Programm Bio Doc Analyze (Biometra GmbH, Göttingen) in einer Bild- und einer Datendatei gespeichert. Mithilfe letzterer wurde mit demselben Programm die Stärke der einzelnen Protein-Banden bestimmt. Die Auswertung dieser Rohdaten erfolgte, indem der Wert jeder Bande des untersuchten Gens durch den entsprechenden Wert des Referenzgens (GAPDH bzw. SMAD2) dividiert wurde. Die daraus errechneten Gruppen-MW aller Gruppen samt zugehörigem SEM wurden zwecks Normierung durch den MW der Kontrollgruppe mit BM (-FCS) dividiert und mit dem Computer-Programm GraphPad Prism 5.03 in Prozentschreibweise dargestellt. Die Bilddatei wurde mit den Grafikprogrammen Paint.NET 3.58 (dotPDN LLC, Kirkland, USA) und IrfanView 4.27 (Irfan Skiljan, Wiener Neustadt, Österreich) zur Darstellung aufbereitet.

3.2.6 Kollagenassay

Mit dem Kollagenassay wurde unter Zuhilfenahme des Sircol Collagen Assay Kits der Kollagengehalt des Mediums und der isolierten Zellproteine (Kapitel 3.2.2, S. 23 ff.) bestimmt. Alle Schritte fanden, wenn nicht anders angegeben, bei RT statt.

3.2.6.1 Vorbereitung der Medium-Proben

Am Ende der Stimulationsphase wurde aus jedem Well 1 ml Medium in je ein 1,5 ml Gefäß überführt und in Flüssigstickstoff eingefroren. Nach vorübergehender Lagerung bei -80 °C erfolgte eine kurze Zentrifugation (3 s, 10 500 min⁻¹) der bei RT aufgetauten Gefäße. Eine Kontrollprobe mit 1 ml frischem BM wurde hergestellt. 200 µl Isolations- und Konzentrations-Reagenz wurden jeweils hinzugegeben. Die Gefäße wurden durch Invertieren gemischt, kurz zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹) und in einer sich in einer halb mit Eiswasser gefüllten Wanne befindlichen Halterung platziert. Eine Inkubation bei 4 °C über Nacht schloss sich an. Nach zehnminütiger Zentrifugation (10 500 min⁻¹, 4 °C) wurde je 1 ml Überstand abgenommen und verworfen. Der obere Gefäßteil wurde mit einem Wattestäbchen gesäubert.

3.2.6.2 Vorbereitung der Protein-Proben

Im Anschluss an die Stimulationsphase erfolgten eine Proteinisolation (Kapitel 3.2.5.2, S. 34) und eine Konzentrationsbestimmung (Kapitel 3.2.5.3, S. 34 f.). Unterschiedliche Probenvolumina mit einem Proteingehalt von jeweils 100 μ g wurden in je ein 1,5 ml Gefäß pipettiert und mit RIPA Lysepuffer auf ein Volumen von 100 μ l aufgefüllt. Die Gefäße wurden auf einem Vortex Mixer geschüttelt und anschließend kurz zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹, 4 °C). Eine Kontrollprobe mit 100 μ l RIPA-Lysepuffer wurde hergestellt.

3.2.6.3 Assay

Sieben Standardproben mit Konzentrationen von 1, 2, 5, 10, 25, 50 und 100 μ g Kollagen / 100 μ l wurden gebildet. Dies erfolgte, indem Volumina von 2, 4, 10, 20 bzw. 50 μ l eines Kollagenstandards mit einer Konzentration von 0,5 μ g/ μ l mit BM bzw. RIPA-Lysepuffer auf 100 μ l aufgefüllt wurden. Für die 50er und 100er Standardprobe wurden 100 bzw. 200 μ l des unverdünnten 0,5 μ g/ μ l Standards

verwendet. Zu allen Proben wurde jeweils 1 ml Sircol Färbe-Reagenz hinzugegeben. Die Gefäße wurden durch Invertieren gemischt und für eine halbe Stunde in eine sich auf einem schnellen Schüttler (ca. 400 min⁻¹) befindliche Halterung transferiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation (10 500 min⁻¹) erfolgte die Entleerung des flüssigen Gefäßinhaltes, indem die Gefäße einzeln invertiert und vorsichtig auf einem Tuch ausgeklopft wurden. Nach Hinzugabe von 750 µl einer eiskalten säurehaltigen Waschlösung zu dem übriggebliebenen Pellet erfolgte eine erneute Zentrifugation (10 min, 10 500 min⁻¹). Der flüssige Gefäßinhalt wurde auf die oben beschriebene Weise entleert und der obere Gefäßteil mit einem Wattestäbchen gesäubert. 450 µl Alkali-Reagenz wurden hinzugegeben, die Gefäße bis zur Auflösung des Pellets auf einem Vortex Mixer geschüttelt und kurz zentrifugiert (3 s, 10 500 min⁻¹). Nach fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte der Transfer von zweimal 200 µl der einzelnen Proben in jeweils zwei Wells einer 96-Well-Platte. Die Absorption bei 492 nm wurde mit einem Mikroplatten-Lesegerät gemessen und mithilfe des zugehörigen Computer-Programms Magellan anhand der entsprechenden Kollagen-Standardkurve und unter Abzug des jeweiligen Kontrollprobenwertes in Konzentrationswerte umgerechnet. Für die Auswertung wurden die MW der im Doppelansatz gemessenen Proben, für die Darstellung mit GraphPad Prism 5.03 die jeweiligen Gruppen-MW mit dazugehörigem SEM verwendet.

3.2.7 Proliferationsassay

Mit Beginn der Handhabe von radioaktivem Material fanden alle weiteren Schritte des Proliferationsassays in einem Isotopenlabor statt. Die 48-Well-Platte wurde nach 20-stündiger Stimulation (Kapitel 3.2.2, S. 23 ff.) dorthin überführt. Pro 2,5 ml möglichst ohne Überschuss neu hergestelltem Stimulationsmedium wurde 1 µl radioaktives [Methyl-Tritium]-Thymidin mit einer Konzentration von 1 µCi/µl hinzugegeben. 250 µl dieses Mediums wurden bei der gruppenweisen Mediumerneuerung pro Well verwendet. Eine vier Stunden lange Stimulation der 48-Well-Platte in einem Inkubator schloss sich an. Die Vorbereitung von 10%iger Trichloressigsäure (engl. trichloroacetic acid, TCA) erfolgte, indem 5 g 99% ige TCA in 50 ml Reinstwasser aufgelöst wurden. 5 ml 1 M Natronlauge (NaOH) wurden mit 45 ml Reinstwasser auf eine Konzentration von 0,1 M verdünnt. Es folgte die Herunterkühlung der hergestellten 10% igen TCA und 0,1 M NaOH sowie von Methanol, Reinstwasser und Hanks ausgewogener Salzlösung (engl. Hanks balanced salt solution, HBSS) auf 4 °C. Am Ende der Stimulationsphase wurde das radioaktive Medium in einen Abfallbehälter geschüttet. Die folgenden Schritte wurden mit einer Multipipette durchgeführt. Es erfolgte die zweimalige Waschung der Platte mit je 500 µl HBSS pro Well und anschließender Abschüttung der Flüssigkeit. Nach Hinzugabe von 250 µl Methanol / Well wurde die 48-Well-Platte 15 Minuten lang im Kühlschrank (4 °C) inkubiert. 250 µl der 10%igen TCA wurden pro Well hinzugegeben und das Ganze erneut für einen Zeitraum von 15 Minuten in denselben Kühlschrank gestellt. Der Platteninhalt wurde abgeschüttet. Es erfolgte eine Waschung mit 500 µl Reinstwasser / Well. Nach erneuter Abschüttung wurden 250 µl 0,1 M NaOH pro Well hinzugegeben und die Platte 30 Minuten lang auf einen Plattenschüttler (1 000 min⁻¹) gestellt. 4 ml Szintillationsflüssigkeit wurden in jedes 6 ml Szintillationsgefäß gefüllt und bis zu 18 dieser Gefäße pro Haltevorrichtung aufgestellt. Es erfolgte die Überführung des Inhalts eines jeden Wells in je ein Szintillationsgefäß mithilfe einer 1 000 µl-Pipette. Die Gefäße wurden zugeschraubt und auf einem Vortex Mixer geschüttelt. Die [Methyl-Tritium]-Thymidin Einlagerung der einzelnen Proben wurde in einem Betacounter gemessen und mit dem Computer-Programm LS 6000 (Beckman Coulter Inc., Brea, USA) aufgezeichnet. Es erfolgte eine Normierung der Daten, indem die Gruppen-MW aller Gruppen jeweils durch den MW der Kontrollgruppe mit GM (+FCS) dividiert wurden. Für die Auswertung wurden die auf diese Weise berechneten Ergebnisse aus drei bis sechs Versuchen herangezogen. Bei einem von vier Tergurid-Versuchen wurde aufgrund von unter dem Mikroskop beobachteten, fast vollständig abgestorbenen Zellen eine von sechs Proben aus der Wirkstoffgruppe mit Tergurid 100 nM herausgenommen. Die Darstellung des aus den Gruppen-MW aller Versuche errechneten Gesamt-MW pro Gruppe samt zugehörigem SEM erfolgte mithilfe von GraphPad Prism 5.03.

3.2.8 Histologische Färbung

3.2.8.1 Färbung

Aus jedem in Paraffin eingebetteten RV (Kapitel 3.2.1, S. 21 ff.) wurde mithilfe eines Rotationsmikrotoms ein 3 µm dicker Gewebeschnitt hergestellt, auf einen Objektträger transferiert und 50 Minuten lang bei 58 °C inkubiert. Alle folgenden Schritte erfolgten durch Eintauchen des Objektträgers in die jeweils angegebene Chemikalie. Zunächst wurde die begonnene Entparaffinisierung durch drei fünfminütige Xylol-Schritte abgeschlossen. Eine Rehydration erfolgte, indem je zweimal drei Minuten lang 99,9%iges und mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 95% verdünntes Ethanol zur Anwendung kam. Die Objektträger wurden drei Minuten lang mit deionisiertem Wasser gewaschen. Es folgte ein einstündiger Färbeschritt mithilfe einer mit 2 M HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellten Lösung bestehend aus 0,1 g in 100 ml 1,2% iger Pikrinsäure gelöstem Siriusrot. Die Objektträger wurden zweimal 30 Sekunden lang mit vorverdünnter 0,5% iger Essigsäure gewaschen, kurz in deionisiertes Wasser getaucht und anschließend stark geschüttelt. Nach drei einminütigen Schritten mit 99,9% igem Ethanol erfolgten zwei zweiminütige Xylol-Schritte. Die Unterseite der Objektträger wurde gereinigt. Drei Tropfen Eindeckmittel wurden auf die Oberseite derselben aufgetragen und mit je einem Deckglas abgedeckt. Anschließend erfolgte ihre Trocknung bei RT über Nacht. Die in diesem Abschnitt beschriebene Methode wurde von Dr. Himal Luitel durchgeführt.

3.2.8.2 Zählung und Auswertung

Die Objektträger wurden mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops unter Durchlicht betrachtet. Zunächst erfolgte die automatische Messung der Gesamtfläche einer jeden Probe unter 2,5-facher Vergrößerung mit dem Computer-Programm QWin 3.5.1 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar). Dasselbe Programm wurde zur halbautomatischen Quantifizierung des Kollagenanteils an der Gesamtfläche verwendet, indem die komplette Probe unter 40-facher Vergrößerung bildweise bei manueller Bildeinstellung und Bestätigung der jeweils korrekten Erkennung des Kollagens sowohl im Hellfeld als auch anschließend unter Zuhilfenahme eines Polarisationsfilters analysiert wurde. Das Gesamtkollagen stellte sich im Hellfeld rot auf einem gelben Hintergrund dar (Sweat et al. 1964). Im Rahmen der Erkennungsbestätigung erfolgte hierbei die Herausnahme von offensichtlich im Bereich von großen Gefäßen liegenden, perivaskulären Kollagenflächen. Die dickeren Kollagen Typ I Fasern unterschieden sich unter Einsatz eines Polarisationsfilters anhand einer gelb-roten Doppelbrechung auf einem schwarzen Hintergrund von den dünneren, grün doppelbrechenden Kollagen Typ III Fasern (Jungueira et al. 1978, 1982). Die Flächenerkennung erfolgte hier separat für den jeweiligen Kollagentyp. Die Ergebnisse der einzelnen Bilder einer Probe wurden in einer Datendatei gespeichert, addiert und in Bezug zu ihrer Gesamtfläche gesetzt. Für die Auswertung der Gruppenunterschiede in Bezug auf Gesamtkollagen, Kollagen Typ I und Kollagen Typ III wurden die auf diese Weise errechneten Prozentwerte verwendet. Die Darstellung der sich daraus ergebenden Gruppen-MW

43

mit dazugehörigem SEM erfolgte mit GraphPad Prism 5.03. Für die Gruppen wurden repräsentative Bildausschnitte ausgewählt, in Bilddateien gespeichert und mit dem Grafikprogramm Paint.NET 3.58 zur Darstellung aufbereitet.

3.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde mithilfe der Computer-Programme Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, USA) und GraphPad Prism 5.03 durchgeführt. Fast ausnahmslos erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (engl. analysis of variance, ANOVA) der normalverteilten, unabhängigen Stichproben mit sich anschließendem Student-Newman-Keuls Test. Lediglich bei der Analyse der mRNA-Expression der 5-HTR-Gene im Tierexperiment kam ein zweiseitiger T-Test zur Anwendung. Das Signifikanzniveau α lag bei 0,05. Alle Daten wurden angegeben als MW ± SEM. Bei den exponentiellen, nach der ΔΔCt-Methode berechneten gRT-PCR-Ergebnissen wurde hiervon abweichend die Intervallschreibweise für den SEM verwendet. Signifikante Gruppenunterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \le 0.05$, $p \le 0.01$ oder $p \le 0.001$ in Bezug auf die Ablehnung einer richtigen Nullhypothese wurden in den Tabellen und den unter Zuhilfenahme des Computer-Programms Microsoft PowerPoint 2010 (Microsoft Corp., Redmond, USA) erstellten Abbildungen mit * ($p \le 0.05$), ** ($p \le 0.01$) oder *** ($p \le 0.001$) markiert. Entsprechendes galt für die Zeichen # und \dagger .

4. Ergebnisse

4.1 Tierexperimente

Bei den Tierexperimenten kam das PAB-Modell mit der im Methodenteil erwähnten Gruppeneinteilung zur Anwendung (Kapitel 3.2.1, S. 21 ff.). Es wurden ausschließlich RV von männlichen C57Bl6J-Mäusen untersucht und bei der Datenanalyse gruppenweise miteinander verglichen.

4.1.1 Voruntersuchungen hinsichtlich Hypertrophie-Kennzahl, Hämodynamik und histologischer Färbung

Die Voruntersuchungen wurden zur Überprüfung der kardialen Wirkung der 5-HTR Antagonisten sowie der Anwendbarkeit des PAB-Modells durchgeführt. Bei der Untersuchung des Verhältnisses von Gewicht des RV zu Tibialänge (RV / Tibia) als Maß für die RVH zeigte die Placebo-Gruppe mit 2.55 ± 0.36 mg/mm eine signifikante Erhöhung gegenüber der Sham-Gruppe mit $1,32 \pm 0,17$ mg/mm (Abbildung 4, S. 46). Die Wirkstoffgruppen Tergurid mit 2,04 ± 0,42 mg/mm und SB204741 mit 2,00 ± 0,52 mg/mm waren gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert. Die hämodynamische Auswertung ergab ähnliche Veränderungen für das Herzminutenvolumen und den systolischen Blutdruck des RV (engl. systolic right ventricular pressure, RVP_{svs}). Letzterer war in der Placebo-Gruppe mit 63,0 ± 10,7 mm Hg gegenüber der Sham-Gruppe mit 28,1 ± 2,0 mm Hg signifikant erhöht, während die Gruppen Tergurid mit 57,9 ± 10,4 mm Hg und SB204741 mit 57,9 ± 15,1 mm Hg keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Placebo-Gruppe aufwiesen (Abbildung 4, S. 46). Für das Herzminutenvolumen zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Placebo-Gruppe mit 10,3 ± 2,5 ml/min gegenüber der Sham-Gruppe mit 15,8 ± 1,1 ml/min (Abbildung 4, S. 46). Die Wirkstoffgruppen Tergurid mit 13,8 ± 3,8 ml/min und SB204741 mit 15,9 ± 3,3 ml/min waren gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant erhöht.

Andere hamödynamische Parameter wie der systolische und diastolische Blutdruck im systemischen Kreislauf und die Herzfrequenz wiesen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf. Bei der orientierenden histologischen Färbung ergab sich sowohl für Kollagen Typ I als auch für Typ III eine signifikante Erhöhung der Placebogegenüber der Sham-Gruppe. Die Tergurid-Wirkstoffgruppe stellte sich gegenüber der jeweiligen Placebo-Gruppe signifikant verringert dar.





Verhältniswerte von RV / Tibia (MW + SEM), RVP_{sys} = systolischer Blutdruck des RV (MW + SEM) sowie Herzminutenvolumen (MW + SEM), n = 6-9, Gruppenunterschiede markiert mit * p \leq 0,05 vs. Placebo

4.1.2 mRNA-Expression der Serotonin-Rezeptor-Gene

Die mRNA-Expression der 5-HTR-Gene wurde mithilfe der qRT-PCR (Kapitel 3.2.4, S. 29 ff.) analysiert. Dabei zeigten sich für das 5-HTR2A-Gen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Sham-Gruppe mit 100 (78-128) % und der Placebo-Gruppe mit 124 (110-140) % (Abbildung 5, S. 47). Beim 5-HTR2B-Gen ergab sich für die Placebo-Gruppe mit 482 (379-612) % eine signifikante Erhöhung gegenüber der Sham-Gruppe mit 100 (84-119) % (Abbildung 5, S. 47).





4.1.3 Proteinexpression der Serotonin-Rezeptor-Gene

Die Proteinebene der 5-HTR-Gene wurde unter Zuhilfenahme des Western Blots (Kapitel 3.2.5, S. 34 ff.) untersucht, um den Stellenwert der auf mRNA-Ebene beobachteten Veränderungen (Kapitel 4.1.2, S. 46 f.) einzuordnen. Es zeigte sich eine so schwache Proteinexpression (Abbildung 6), dass eine Auswertung der Banden nicht möglich war.





Western Blot Banden entwickelt nach zwölf Minuten Belichtungszeit auf hypersensitivem Film, 50 µg Protein / Probe, n = 3-4, 5-HTR2A bzw. 2B = Serotonin-Rezeptor 2A bzw. 2B

4.1.4 mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene

Die Analyse der mRNA-Expression der Hypertrophie- (ACTA2, ACTC1, ANP, BNP, MYH6 und MYH7), Proliferations- (CCND1) und Fibrosegene (COL1A1, COL1A2, COL2A1 und COL3A1) erfolgte mithilfe der qRT-PCR (Kapitel 3.2.4, S. 29 ff.), um ihre Beeinflussung durch die PAB und die verwendeten Wirkstoffe zu bestimmen. Es wurden zwei Experimente durchgeführt, in denen einerseits Tergurid (Tabelle 20, S. 111), andererseits SB204741 (Tabelle 21, S. 111) zum Einsatz kamen.

In den dazugehörigen Abbildungen erfolgte für jedes einzelne Gen eine Gegenüberstellung der beiden Experimente. Dabei zeigten sich für das ACTA2-Gen beim Vergleich von Sham- und Placebo-Gruppe zwei unterschiedliche Ergebnisse: Während sich beim Tergurid-Versuch eine signifikante Reduzierung der Placebo-gegenüber der Sham-Gruppe ergab, wurde beim SB204741-Versuch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt (Abbildung 7). Die Wirkstoffgruppen Tergurid und SB204741 zeigten keine signifikanten Unterschiede gegenüber der jeweiligen Placebo-Gruppe. Beim ACTC1-Gen wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt (Abbildung 7).





qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n_{links} = 5-6 bzw. n_{rechts} = 8 (bezogen auf Experiment in der linken bzw. rechten Spalte), Gruppenunterschiede markiert mit ** p ≤ 0,01 vs. Placebo, ACTA2 = Glattmuskuläres Alpha-Aktin, ACTC1 = Kardiales Alpha-Aktin 1, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1

Für das ANP-Gen ergab sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 8, S. 49). Die Wirkstoffgruppe Tergurid war

gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert, während SB204741 keinen signifikanten Unterschied aufwies. Beim BNP-Gen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 8). Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wirkstoffgruppen und der entsprechenden Placebo-Gruppe.



Abbildung 8: mRNA-Expression von ANP und BNP im RV

qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n_{links} = 5-6, bzw. n_{rechts} = 8 (bezogen auf Experiment in der linken bzw. rechten Spalte), Gruppenunterschiede markiert mit * p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,001 vs. Placebo, ANP = Atriales natriuretisches Peptid, BNP = Brain natriuretisches Peptid, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1

Für das MYH6-Gen wurde eine signifikante Reduzierung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen festgestellt (Abbildung 9, S. 50). Die Wirkstoffgruppe Tergurid zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Placebo-Gruppe; SB204741 war signifikant erhöht. Beim MYH7-Gen ergab sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 9, S. 50). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wirkstoffgruppen und der entsprechenden Placebo-Gruppe festgestellt. Für das CCND1-Gen zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 9).





qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n_{links} = 5-6 bzw. n_{rechts} = 8 (bezogen auf Experiment in der linken bzw. rechten Spalte), Gruppenunterschiede markiert mit * p ≤ 0,05, *** p ≤ 0,001 vs. Placebo, MYH6 bzw. 7 = Myosin, schwere Kette, Alpha bzw. Beta, CCND1 = Zyklin D1, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1

Beim COL1A1-Gen ergab sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 10). Die Wirkstoffgruppe Tergurid zeigte sich gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert, während SB204741 keinen signifikanten Unterschied aufwies. Für die Gene COL1A2 und COL2A1 wurden ähnliche Unterschiede zwischen den Gruppen wie beim COL1A1-Gen festgestellt. Beim COL1A2-Gen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 10). Die Wirkstoffgruppe Tergurid stellte sich gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant verringert dar, während sich für SB204741 kein signifikanter Unterschied ergab.



Abbildung 10: mRNA-Expression von COL1A1 und COL1A2 im RV

qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n_{links} = 5-6 bzw. n_{rechts} = 8 (bezogen auf Experiment in der linken bzw. rechten Spalte), Gruppenunterschiede markiert mit ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 vs. Placebo, COL1A1 bzw. 1A2 = Kollagen Typ I Subtyp α1 bzw. α2, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1

Beim COL2A1-Gen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber der Sham-Gruppen (Abbildung 11). Die Wirkstoffgruppe Tergurid war gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert, während SB204741 keinen signifikanten Unterschied aufwies. Für das COL3A1-Gen ergab sich eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 11). Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wirkstoffgruppen und der jeweiligen Placebo-Gruppe festgestellt.





Insgesamt zeigte sich also für die Hypertrophie-Gene ANP, BNP und MYH7 sowie für die Fibrose-Gene COL1A1, COL1A2, COL2A1 und COL3A1 jeweils eine signifikante Erhöhung der Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen, während sich dieselben beim Hypertrophie-Gen MYH6 und im Tergurid-Experiment auch beim ACTA2-Gen

signifikant verringert darstellten. Eine signifikante Reduzierung von Wirkstoffgruppe gegenüber Placebo-Gruppe wurde für Tergurid bei den Genen ANP, COL1A1, COL1A2 und COL2A1 festgestellt, während sich für SB204741 dementsprechend beim MYH6-Gen eine signifikante Erhöhung ergab. Das Proliferationsgen CCND1 wies keine signifikanten Gruppenunterschiede auf.

4.1.5 Kollagengehalt des rechten Herzventrikels

Der Kollagengehalt der RV wurde zwecks Verifizierung der auf mRNA-Ebene der Fibrosegene beobachteten Veränderungen (Kapitel 4.1.4, S. 47 ff.) mithilfe der histologischen Färbung (Kapitel 3.2.8, S. 42 ff.) untersucht. Dabei zeigte sich für das in den Durchlichtmikroskop-Aufnahmen im Hellfeld rot dargestellte Gesamtkollagen (Abbildung 12) eine signifikante Erhöhung der Placebo-Gruppe mit 8,34 \pm 1,36 % gegenüber der Sham-Gruppe mit 0,80 \pm 0,13 %; die Wirkstoffgruppen Tergurid mit 3,90 \pm 1,27 % und SB204741 mit 2,90 \pm 2,40 % waren gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert (Abbildung 13, S. 54).



Abbildung 12: Ablagerung an Gesamtkollagen im RV

Histologische Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen unter Durchlicht im Hellfeld, Objektiv mit 40-facher Vergrößerung, 3 µm dicke Gewebeschnitte nach Siriusrot-Färbung mit rot leuchtendem Gesamtkollagen auf gelbem Hintergrund







Die dickeren Kollagen Typ I und die dünneren Kollagen Typ III Fasern wurden in den Durchlichtmikroskop-Aufnahmen unter Zuhilfenahme eines Polarisationsfilters dargestellt (Abbildung 14, S. 55). Dabei ergab sich für das gelb-rot leuchtende Kollagen Typ I eine signifikante Erhöhung der Placebo-Gruppe mit 5,50 \pm 0,52 % gegenüber der Sham-Gruppe mit 0,52 \pm 0,01 %; die Tergurid Wirkstoffgruppe stellte sich mit 2,18 \pm 0,69 % gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant verringert dar (Abbildung 15, S. 55). Auch beim grün leuchtenden Kollagen Typ III (Abbildung 14, S. 55) zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Placebo-Gruppe mit 0,53 \pm 0,04 % gegenüber der Sham-Gruppe mit 0,04 \pm 0,01 %; die Tergurid-Wirkstoffgruppe war mit 0,21 \pm 0,07 % gegenüber der Placebo-Gruppe ebenfalls signifikant reduziert (Abbildung 15, S. 55).

Die signifikanten Gruppenunterschiede stellten sich für Kollagen Typ I, Kollagen Typ II und den Gesamtkollagengehalt gleichsinnig dar und entsprachen weitestgehend den auf mRNA-Ebene festgestellten Veränderungen für die Fibrosegene COL1A1, COL1A2 und COL2A1 (Kapitel 4.1.4, S. 47 ff.). Nur für die Wirkstoffgruppe SB204741 fand sich kein Korrelat.





Abbildung 14: Ablagerung an Kollagen Typ I und III im RV

Histologische Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen unter Durchlicht und Zuhilfenahme eines Polarisationsfilters, Objektiv mit 40-facher Vergrößerung, 3 µm dicke Gewebeschnitte nach Siriusrot-Färbung mit gelb-rot leuchtendem Kollagen Typ I und grün leuchtendem Kollagen Typ III auf schwarzem Hintergrund





4.2 Zellkulturexperimente

In den Zellkulturexperimenten wurden adulte RCF mit der im Methodenteil beschriebenen Gruppeneinteilung verwendet (Kapitel 3.2.2, S. 23 ff.) und die aus ihrer Untersuchung resultierenden Daten gruppenweise miteinander verglichen.

4.2.1 Rolle des transformierenden Wachstumsfaktors β_1 als Stimulationsmodell für kardiale Rattenfibroblasten

4.2.1.1 Proteinexpression der Signalweg-Gene

Die Untersuchung der Proteinebene der SMAD-Gene erfolgte unter Zuhilfenahme des Western Blots (Kapitel 3.2.5, S. 34 ff.), um das Vorhandensein eines Phosphorylierungsschrittes des TGF- β_1 Signalweges in RCF nachzuweisen. Für P-SMAD3 und SMAD3 zeigte sich eine so schwache Proteinexpression (Abbildung 16), dass eine Auswertung der Banden nicht möglich war. Bei Betrachtung der Relation von SMAD2 zu GAPDH stellte sich die TGF- β_1 5 Gruppe mit 137,12 ± 3,32 % gegenüber der -FCS-Gruppe mit 100,00 ± 10,41 % signifikante erhöht dar; die TGF- β_1 10 Gruppe wies mit 114,90 ± 9,80 % keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 16 und Abbildung 17, S. 57). Das Verhältnis von P-SMAD2 zu SMAD2 ergab eine signifikante Erhöhung der TGF- β_1 5 Gruppe mit 355,66 ± 29,26 % und der TGF- β_1 10 Gruppe mit 466,31 ± 37,38 % gegenüber der -FCS-Gruppe mit 100,00 ± 27,95 % (Abbildung 16 und Abbildung 17, S. 57).



Abbildung 16: Überblick über die Proteinexpression der SMAD-Gene in RCF

Western Blot Banden entwickelt nach drei (P-SMAD2) bzw. fünf Minuten (P-SMAD3, SMAD2/3) Belichtungszeit auf hypersensitivem Film bzw. nach einer Sekunde auf Normalfilm (GAPDH), 12 μ g (GAPDH) bzw. 32 μ g (SMAD-Antikörper) Protein / Probe, n = 3, SMAD2/3 = Mitglieder 2 und 3 der SMAD-Familie, P-SMAD2 bzw. 3 = phosphoryliertes Mitglied 2 bzw. 3 der SMAD-Familie, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, TGF- β_1 5 bzw. 10 = Gruppe mit TGF- β_1 -Konzentrationen von 5 bzw. 10 ng/ml Wachstumsmedium



Abbildung 17: Proteinexpression von SMAD2 und P-SMAD2 in RCF

Western Blot Werte (MW + SEM) normiert mit GAPDH bei SMAD2 (-FCS = 31,24 %) bzw. mit SMAD2 bei P-SMAD2 (-FCS = 65,77 %), 12 µg (GAPDH) bzw. 32 µg (SMAD-Antikörper) Protein / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 vs. -FCS, SMAD2 = Mitglied 2 der SMAD-Familie, P-SMAD2 = phosphoryliertes Mitglied 2 der SMAD-Familie, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, TGF- β_1 5 bzw. 10 = Gruppe mit TGF- β_1 -Konzentrationen von 5 bzw. 10 ng/ml Wachstumsmedium

4.2.1.2 mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene

Die mRNA-Expression der Hypertrophie- (ACTA2, ACTC1, ANP und BNP), Proliferations- (CCND1), Fibrose- (COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1 und COL8A1) und Anti-TGF- β_1 -Gene (CILP) wurde mithilfe der qRT-PCR (Kapitel 3.2.4, S. 29 ff.) analysiert, um eine wirksame TGF- β_1 -Konzentration herauszufinden (Tabelle 22, S. 112).

Dabei zeigten sich für das ACTA2-Gen keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 18, S. 58). Beim ACTC1-Gen war die TGF- β_1 10 Gruppe gegenüber der -FCS-Gruppe signifikant reduziert; die TGF- β_1 5 Gruppe wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 18, S. 58). Für die Gene ANP und BNP ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 18, S. 58). Bei den Genen CCND1 und CILP stellten sich die TGF- β_1 Gruppen 5 und 10 gegenüber der jeweiligen -FCS-Gruppe signifikant verringert dar (Abbildung 18, S. 58).

Für das COL1A1-Gen wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt (Abbildung 19, S. 59). Beim COL1A2-Gen ergab sich eine signifikante Reduzierung der TGF- β_1 5 Gruppe gegenüber der -FCS-Gruppe; die TGF- β_1 10 Gruppe wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abbildung 19, S. 59).



Abbildung 18: mRNA-Expression von ACTA2, ACTC1, ANP, BNP, CCND1 und CILP in RCF unter TGF- β_1

qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit ** p \leq 0,01, *** p \leq 0,001 vs. -FCS, ACTA2 = Glattmuskuläres Alpha-Aktin, ACTC1 = Kardiales Alpha-Aktin 1, ANP = Atriales natriuretisches Peptid, BNP = Brain natriuretisches Peptid, CCND1 = Zyklin D1, Cartilage intermediate layer Protein, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1, TGF- β_1 5 bzw. 10 = Gruppe mit TGF- β_1 -Konzentrationen von 5 bzw. 10 ng/ml Wachstumsmedium



Abbildung 19: mRNA-Expression von COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1 und COL8A1 in RCF unter TGF- β_1

qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 vs. -FCS, COL1A1, 1A2, 2A1, 3A1, 4A1 bzw. 8A1 = Kollagen Typ I, II, III, IV bzw. VIII Subtyp α1 bzw. α2, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1, TGF- β_1 5 bzw. 10 = Gruppe mit TGF- β_1 -Konzentrationen von 5 bzw. 10 ng/ml Wachstumsmedium

Für das COL2A1-Gen zeigte sich eine signifikante Reduzierung der TGF- β_1 5 Gruppe gegenüber der -FCS-Gruppe; die TGF- β_1 10 Gruppe war signifikant erhöht (Abbildung 19, S. 59). Beim COL3A1-Gen stellten sich die TGF- β_1 Gruppen 5 und 10 gegenüber der -FCS-Gruppe signifikant verringert dar (Abbildung 19, S. 59). Für die Gene COL4A1 und COL8A1 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 19, S. 59).

In der Zusammenschau ließ sich für die Gene CCND1, CILP und COL3A1 eine signifikante Reduzierung beider TGF- β_1 Gruppen gegenüber der -FCS-Gruppe feststellen. Während beim ACTC1-Gen die TGF- β_1 10 Gruppe und sowohl beim COL1A2-Gen als auch beim COL2A1-Gen die TGF- β_1 5 Gruppe jeweils gegenüber der -FCS-Gruppe signifikant reduziert war, stellte sich die TGF- β_1 10 Gruppe beim COL2A1-Gen signifikant erhöht dar.

4.2.1.3 Kollagengehalt des Mediums

Der Kollagengehalt des Mediums wurde zwecks Überprüfung der auf mRNA-Ebene der Fibrosegene beobachteten Veränderungen (Kapitel 4.2.1.2, S. 57 ff.) mithilfe des Kollagenassays (Kapitel 3.2.6, S. 40 f.) untersucht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der -FCS-Gruppe mit 3,38 \pm 0,12 µg/µl, der TGF- β_1 5 Gruppe mit 3,62 \pm 0,31 µg/µl und der TGF- β_1 10 Gruppe mit 3,32 \pm 0,45 µg/µl (Abbildung 20).



Abbildung 20: Kollagengehalt des Mediums unter TGF-β1

Kollagenassay-Werte (MW + SEM) bezogen auf 1 ml Medium / Probe, n = 3, TGF- β_1 5 bzw. 10 = Gruppe mit TGF- β_1 -Konzentrationen von 5 bzw. 10 ng/ml Wachstumsmedium

Die bei den Fibrosegenen COL1A2, COL2A1 und COL3A1 auf mRNA-Ebene festgestellten signifikanten Veränderungen konnten mittels Kollagenassay nicht nachvollzogen werden (Kapitel 4.2.1.2, S. 57 ff.).

4.2.2 mRNA-Expression der Serotonin-Rezeptor-, Hypertrophie- und Fibrosegene

Die Analyse der mRNA-Expression der 5-HTR- (5-HTR2A und 5-HTR2B), Hypertrophie- (ACTA2, ACTC1, ANP und BNP), Proliferations- (CCND1), Fibrose-(COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1 und COL8A1) und Anti-TGF- β_1 -Gene (CILP) erfolgte unter Zuhilfenahme der qRT-PCR (Kapitel 3.2.4, S. 29 ff.), um ihre Beeinflussung durch das Lösungsmittel Ethanol (99,9 %) und den Wirkstoff Tergurid zu bestimmen (Tabelle 23, S. 112). Dabei zeigte sich für das 5-HTR2A-Gen eine signifikante Reduzierung der Ethanol 1 µM Kontrollgruppe gegenüber der -FCS-Gruppe; Ethanol 100 nM wies wie auch die beiden Wirkstoffgruppen Tergurid 100 nM und 1 µM keinen signifikanten Unterschied gegenüber der -FCS- bzw. der jeweiligen Kontrollgruppe auf (Abbildung 21). Beim 5-HTR2B-Gen wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt (Abbildung 21).





Für die Gene ACTA2, ACTC1, ANP, CCND1 und CILP ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 22, S. 63). Beim BNP-Gen stellten sich die Kontrollgruppen Ethanol 100 nM und 1 μ M gegenüber der -FCS-Gruppe signifikant verringert dar; die Wirkstoffgruppe Tergurid 1 μ M wies eine signifikante Erhöhung gegenüber der Ethanol 1 μ M Kontrollgruppe auf, während sich für Tergurid 100 nM kein signifikanter Unterschied gegenüber Ethanol 100 nM ergab (Abbildung 22, S. 63).

Für die Gene COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1 und COL8A1 zeigten sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 23, S. 64). Beim COL2A1-Gen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ethanol -FCS Kontrollgruppen und der Gruppe festgestellt; die Wirkstoffgruppe Tergurid 100 nM wies eine signifikante Erhöhung gegenüber der Ethanol 100 nM Kontrollgruppe auf, während sich für Tergurid 1 µM kein signifikanter Unterschied gegenüber Ethanol 1 µM ergab (Abbildung 23, S. 64).

Insgesamt zeigte sich für die Gene 5-HTR2A und BNP eine signifikante Reduzierung der Ethanol 1 μ M sowie für das BNP-Gen auch der Ethanol 100 nM Kontrollgruppe gegenüber der -FCS-Gruppe. Die Wirkstoffgruppe Tergurid 1 μ M war beim BNP-Gen, Tergurid 100 nM beim COL2A1-Gen jeweils gegenüber der entsprechenden Ethanol Kontrollgruppe signifikant erhöht. Die übrigen Gene wiesen keine signifikanten Gruppenunterschiede auf.



Abbildung 22: mRNA-Expression von ACTA2, ACTC1, ANP, BNP, CCND1 und CILP in RCF unter Tergurid

> qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit * $p \le 0,05$ vs. Ethanol 100 nM, # $p \le 0,05$, ## p ≤ 0,01 vs. Ethanol 1 µM, ACTA2 = Glattmuskuläres Alpha-Aktin, ACTC1 = Kardiales Alpha-Aktin 1, ANP = Atriales natriuretisches Peptid, BNP = Brain natriuretisches Peptid, CCND1 = Zyklin D1, Cartilage intermediate layer Protein, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1



Abbildung 23: mRNA-Expression von COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1, COL4A1 und COL8A1 in RCF unter Tergurid

qRT-PCR-Werte (MW + SEM) normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit * p \leq 0,05 vs. Ethanol 100 nM, COL1A1, 1A2, 2A1, 3A1, 4A1 bzw. 8A1 = Kollagen Typ I, II, III, IV bzw. VIII Subtyp α 1 bzw. α 2, HPRT1 = Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1

4.2.3 Proteinexpression von Glattmuskulärem Alpha-Aktin

Die Proteinebene des α-SMA-Gens wurde mithilfe des Western Blots (Kapitel 3.2.5, S. 34 ff.) untersucht, um den Stellenwert der auf mRNA-Ebene bezüglich des ACTA2-Gens gewonnenen Erkenntnisse (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff.) einzuordnen. Es zeigte sich eine relativ starke Proteinexpression von α-SMA mit 84,31 % im Vergleich zu GAPDH bezogen auf die -FCS-Gruppe (Abbildung 24). Allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der -FCS-Gruppe, den Ethanol-Kontrollgruppen sowie den zugehörigen Tergurid-Wirkstoffgruppen festgestellt. Dies entsprach den auf mRNA-Ebene fehlenden Veränderungen für das ACTA2-Gen (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff.).



Abbildung 24: Überblick über die Proteinexpression von α-SMA in RCF Western Blot Banden entwickelt nach einer (GAPDH) bzw. zwanzig Sekunden (α-SMA) Belichtungszeit auf Normalfilm, 10 μg (GAPDH) bzw. 15 μg (α-SMA) Protein / Probe, n = 3, α-SMA = Myosin, schwere Kette, Alpha, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

4.2.4 Kollagengehalt von Medium und kardialen Rattenfibroblasten

Der Kollagengehalt von Medium und RCF wurde zwecks Überprüfung der auf mRNA-Ebene der Fibrosegene gewonnenen Erkenntnisse (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff.) unter Zuhilfenahme des Kollagenassays (Kapitel 3.2.6, S. 40 f.) analysiert. Bei der Betrachtung des Mediums ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der -FCS-Gruppe mit 5,19 \pm 0,15 µg/µl, den Kontrollgruppen Ethanol 100 nM mit 5,70 \pm 0,28 µg/µl und Ethanol 1 µM mit 4,60 \pm 0,20 µg/µl sowie den zugehörigen Wirkstoffgruppen Tergurid 100 nM mit 5,46 \pm 0,34 µg/µl und Tergurid 1 µM mit 4,51 \pm 0,11 µg/µl (Abbildung 25, S. 66). Auf Proteinebene wurden hinsichtlich des Kollagengehaltes ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen der -FCS-Gruppe mit 25,88 \pm 0,50 µg/µl, den Kontrollgruppen Ethanol 100 nM mit 25,36 \pm 0,38 µg/µl und Ethanol 1 µM mit 25,76 \pm 0,56 µg/µl sowie den entsprechenden Wirkstoffgruppen Tergurid 100 nM mit 26,20 \pm 0,43 µg/µl und Tergurid 1 µM mit 24,16 \pm 0,71 µg/µl festgestellt (Abbildung 25, S. 66).

Die Resultate korrelieren mit den auf mRNA-Ebene der Fibrosegene COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL4A1 und COL8A1 fehlenden Veränderungen. Der beim COL2A1-Gen beobachtete signifikante Gruppenunterschied konnte mithilfe des Kollagenassays nicht nachvollzogen werden (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff.).



Abbildung 25: Kollagengehalt von Medium und RCF unter Tergurid Kollagenassay-Werte (MW + SEM) bezogen auf 1 ml Medium (n = 3) bzw. 100 μg Protein (n = 4) / Probe

4.2.5 Proliferation der kardialen Rattenfibroblasten

Die Proliferation der RCF wurde unter Zuhilfenahme des Proliferationsassays (Kapitel 3.2.7, S. 41 f.) bestimmt, um den Einfluss der verwendeten Wirkstoffe auf die Wachstumsgeschwindigkeit der RCF festzustellen. Es wurden vier Tergurid-, sechs Ketanserin- und drei SB204741-Versuche durchgeführt (Tabelle 24, S. 113). In den dazugehörigen Abbildungen zeigte sich in allen Versuchen eine Erhöhung der Trägersubstanz Kontrollgruppen gegenüber der -FCS-Gruppe (Abbildung 26, S. 67). Beim Tergurid-Versuch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ethanol Kontrollgruppen und der +FCS-Gruppe; die Wirkstoffgruppen Tergurid 100 nM und 1 µM waren gegenüber der entsprechenden Ethanol Kontrollgruppe signifikant verringert, während Tergurid 500 nM keinen signfikanten Unterschied aufwies (Abbildung 26, S. 67). Im Ketanserin-Versuch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den DMSO-Kontrollgruppen und der +FCS-Gruppe; die Wirkstoffgruppen Ketanserin 100 nM, 500 nM und 1 µM stellten sich gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe signifikant reduziert dar (Abbildung 26, S. 67). Beim SB204741-Versuch wurde eine signifikante Reduzierung
der DMSO-Kontrollgruppen gegenüber der +FCS-Gruppe festgestellt; die Wirkstoffgruppen SB204741 100 nM, 500 nM und 1 µM waren gegenüber der jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe signifikant verringert (Abbildung 26).



Abbildung 26: Proliferation der RCF

Proliferationsassay-Werte (MW + SEM) aus drei SB204741- (+FCS = 945,93 ± 15,76 Bq), vier Tergurid- (+FCS = 796,46 ± 30,65 Bq) bzw. sechs Ketanserin-Versuchen (+FCS = 788,83 ± 70,45 Bq), Aktivitätswerte pro Versuch jeweils normiert auf den Gruppen-MW von +FCS, 30 000 ausgesäte Zellen / cm², n = 6 je Versuch, Gruppenunterschiede markiert mit * p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01, *** p ≤ 0,001 vs. Trägersubstanz 100 nM, # p ≤ 0,05, ### p ≤ 0,001 vs. Trägersubstanz 500 nM, †† p ≤ 0,01, ††† p ≤ 0,001 vs. Trägersubstanz 1 µM, Trägersubstanz bestehend aus Ethanol (Tergurid) bzw. DSMO (Ketanserin, SB204741)

5. Diskussion

Die PH ist mit einer weltweiten Prävalenz von etwa 100 Millionen Menschen eine häufige Erkrankung (Schermuly et al. 2011a). Bei längerer Krankheitsdauer entwickelt sich nach Simonneau et al. 2009 eine pathologische RVH, die laut Haddad et al. 2011 und Drake et al. 2011 über Rechtsherzversagen zum Tode führen kann. Der RV besitzt zugegebenermaßen eine große Regenerationsfähigkeit mit dem bei Katz et al. 1996 infolge einer Lungentransplantation geschilderten Potenzial zur Normalisierung seiner Größe. Dennoch spielen direkte therapeutische Ansätze am Herzen, wie die in dieser Arbeit besprochene sowie bei Gustafsen et al. 1986 und Hutcheson et al. 2011 anhand des Karzinoidsyndroms und seiner kardialen Beteiligung diskutierte Blockade der 5-HTR2A und 2B, eine wichtige Rolle.

5.1 Erkenntnisse aus den Tierexperimenten

5.1.1 Nachweis der kardialen Wirkung von Serotonin-Rezeptor Antagonisten sowie der Anwendbarkeit des Modells der Pulmonalarterienstenose

Bei Dumitrascu et al. 2011 zeigt sich anhand des Monocrotalin-Modells eine gute prophylaktische Wirkung der 5-HTR2A und 2B Antagonisten in Bezug auf das Remodelling bei der PAH. In den tierexperimentellen Voruntersuchungen ergab sich wie bei Fang et al. 2011 und Schäfer et al. 2009 eine signifikante Zunahme der Hypertrophie-Kennzahl des RV in der Placebo- gegenüber der Sham-Gruppe (Abbildung 4, S. 46). Die Therapie mit Tergurid bewirkte eine signifikante Verringerung dieser Zunahme. Entsprechende Veränderungen zeigten sich bei der hämodynamischen Auswertung für das Herzminutenvolumen des RV und bei der orientierenden histologischen Färbung für Kollagen Typ I und III (Kapitel 4.1.1, S. 45 f., Urashima et al. 2008, Piao et al. 2010, Schäfer et al. 2009). Die Behandlung mit dem Wirkstoff SB204741 beeinflusste sowohl die Hypertrophiekennzahl als auch das Herzminutenvolumen des RV auf ähnliche Weise. Andere hämodynamische Parameter wie der systolische und diastolische Blutdruck im systemischen Kreislauf oder die Herzfrequenz waren während der Versuchsdauer in den einzelnen Gruppen durchweg unverändert und mit dem Leben vereinbar, so dass die Anwendbarkeit des PAB-Modells als gegeben erscheint. Die kardialen Effekte von Tergurid nach erfolgter PAB-Operation entsprechen weitgehend denen nach verabreichter Monocrotalin-Injektion bei Dumitrascu et al. 2011. Da im PAB-Modell laut Piao et al. 2010 pathologische Veränderungen primär am Herzen entstehen, kann folglich eine direkte kardiale Wirkung von Tergurid und SB204741 vermutet werden.

5.1.2 Stellenwert der Serotonin-Rezeptoren 2A und 2B im Bereich des Herzens

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der molekularbiologischen Analyse der RV aus den Tierexperimenten ausgehend von der mRNA-Genexpression eine signifikante Erhöhung der Anzahl an 5-HTR2B in der Placebo- gegenüber der Sham-Gruppe, während für die 5-HTR2A kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde (Abbildung 5, S. 47). Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, die aus ähnlichen Experimenten mit Lungenzellen von Spender- und PAH-Patienten stammen. So findet sich bei Dumitrascu et al. 2011 eine signifikante Erhöhung der 5-HTR2B in pulmonalen Muskelzellen aus der Gruppe mit PAH-Patienten. Bei Königshoff et al. 2010 lässt sich dieselbe Beobachtung für Lungengewebe von Patienten mit idiopathischer pulmonaler Fibrose anstellen. In beiden Quellen zeigt sich eine konstante Expression der 5-HTR2A-Gene ohne signifikante Abweichung gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe. Somit deutet die erhöhte Expression der 5-HTR2B-Gene auf ebendiese Rezeptoren als kardialen Hauptwirkungsort hin. Die Tierexperimente dieser Arbeit beschäftigen sich deshalb neben Tergurid mit SB204741. Methodenbedingt kann jedoch auch ein Wirkmechanismus über die 5-HTR2A nicht ausgeschlossen werden, da laut Schmidt u. Rothämel 2011 bei Anwendung der gRT-PCR die ursprüngliche Anzahl an 5-HTR unbekannt ist. Bei vermutlich unterschiedlicher Sensitivität der Rezeptoren, wie sie von Berger et al. 2009 angenommen wird, kann also auch eine überwiegende Wirkung an den 5-HTR2A nicht widerlegt werden. Somit darf dieser Unterscheidung im Gesamtbild zugunsten von Tergurid keine zu große Bedeutung zukommen.

Auf Proteinebene ergab sich eine so schwache kardiale Expression derselben 5-HTR-Gene, dass eine Auswertung der Banden nicht möglich war (Abbildung 6, S. 47). Im Gegensatz dazu findet sich bei Dumitrascu et al. 2011 eine relativ starke pulmonale Proteinexpression mit Ergebnissen, die mit denen auf mRNA-Ebene korrelieren. Auch in anderen Geweben wie beispielsweise der Niere bei Morán et al. 2008 lässt sich eine relativ starke Proteinexpression der besprochenen 5-HTR-Gene nachweisen. Keine bekannte Literaturquelle erbringt überhaupt den Nachweis einer kardialen Expression dieser Gene auf Proteinebene. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch dieselben, an der Lunge erprobten Antikörper wie bei Dumitrascu et

al. 2011 verwendet wurden, spricht die eingangs erwähnte, schwache Proteinexpression insgesamt für ein nur geringes Potenzial der direkten Beeinflussung des Herzens. Die pathologische RVH besteht trotz großer Regenerationsfähigkeit des RV in Bezug auf die bei Katz et al. 1996 erwähnte Größe desselben laut Ritchie et al. 1993 nach Ursachenbeseitigung noch lange, also über Jahre fort. Daher sollte ein Therapieansatz, wie die in dieser Arbeit untersuchte prophylaktische Abschwächung der Entstehung einer RVH durch direkte kardiale Einflussnahme, nicht unterschätzt werden.

5.1.3 Unterschiede in der Wirkung von SB204741 und Tergurid auf das myokardiale Remodelling

Bei der detaillierten Analyse der mRNA-Expression der Hypertrophie-, Proliferationsund Fibrosegene zeigten sich verschiedene Ergebnisse für Tergurid auf der einen und SB204741 auf der anderen Seite (Kapitel 4.1.4, S. 47 ff.). Die unerwartete, signifikante Reduzierung der Expression des ACTA2-Gens in der Placebogegenüber der Sham-Gruppe, die sich nur im Tergurid-Versuch ergab, lässt sich am ehesten mit der relativ hohen Fehlerwahrscheinlichkeit der gRT-PCR, hier bezüglich der Sham-Gruppe, erklären (Abbildung 7, S. 48). Das hohe Fehlerintervall dieser Gruppe, das nicht wie beim MYH6-Gen durch eine einzelne Probe, sondern durch mehrere, stärker voneinander abweichende Probenwerte bedingt war, lässt einen eventuellen Materialfehler während der Analyse vermuten. Im Gegensatz zu den Resultaten von Black et al. 1991, wo in einem druckbedingt hypertrophierten linken Herzventrikel eine erhöhte ACTA2-Genexpression registriert wird, konnte dies für den RV nicht gezeigt werden. Ein Wirkmechanismus in Kardiomyozyten ist demzufolge unwahrscheinlich. Beim ACTC1-Gen wurden keine signfikanten Gruppenunterschiede festgestellt (Abbildung 7, S. 48). Dieses Ergebnis spricht nicht unbedingt gegen das Vorliegen einer Hypertrophie, da eine gesteigerte Expression desselben Gens zwar laut Debold et al. 2010 durch Punktmutationen bewirkt wird und in der Folge zur Hypertrophie führt, eine fehlende Mutation jedoch eine Hypertrophie anderer Genese nicht ausschließt. Für die Gene ANP und BNP ergab sich erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung der Genexpression in den Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 8, S. 49). Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Drake et al. 2011, Schäfer et al. 2009 und Bauer et al. 1998, die in den aufgrund der PAB hypertrophierten RV eine erhöhte Genexpression von ANP und bis auf Bauer et al. 1998 in leichterer Ausprägung auch

von BNP beschreiben. Die Wirkstoffgruppe Tergurid zeigte sich beim ANP-Gen gegenüber der Placebo-Gruppe signifikant reduziert. Da ANP laut Calvieri et al. 2012 für die kompensatorische Vasodilatation als Reaktion auf eine entstehende Hypertrophie steht, wie sie von Potter et al. 2009 bei länger anhaltender beschrieben wird, spricht Druckbelastung diese in Einklang mit den hämodynamischen Voruntersuchungen stehende Wirkung der kombinierten Blockade der 5-HTR2A und 2B für einen bezüglich der RVH guten, prophylaktischen Effekt von Tergurid (Kapitel 4.1.1, S. 45 f.). Eine Interpretation der Tergurid-Ergebnisse hinsichtlich des BNP-Gens ist wegen des relativ großen Fehlerintervalls dieser Wirkstoffgruppe nur inadäquat möglich. Beim MYH6-Gen wurde eine signifikante Reduzierung, beim MYH7-Gen eine signifikante Erhöhung der Expression in der Placebo- gegenüber der jeweiligen Sham-Gruppe festgestellt (Abbildung 9, S. 50). Diese Verschiebung von MYH6 zu MYH7 korreliert mit den Ergebnissen aus bekannten Quellen. So kommt es bei Bogaard et al. 2009 im Falle der Hypertrophie zu einer gesteigerten Expression von MYH7 zu Lasten von MYH6. Lowes et al. 1997 sehen dieselbe Verschiebung in RV von Menschen, Bartelds et al. 2011 in RV von Mäusen, letztere jedoch begleitet von einer Erhöhung der ANP-Genexpression und fehlenden fibrotischen Effekten. Für die Fibrose sind laut Bishop et al. 1994 Fibroblasten hauptverantwortlich. Daher deutet dieses Ergebnis auf eine Hypertrophie der Kardiomyozyten hin. Unter der Behandlung mit SB204741 zeigte sich eine signifikant erhöhte Genexpression von MYH6 im Vergleich zu der PAB-Kontrollgruppe. Dies ist der einzige tierexperimentelle Anhaltspunkt dieser Arbeit für einen isolierten Wirkmechanismus über den 5-HTR2B, wie er von Hutcheson et al. 2011 im Gegensatz hierzu für die Entstehung einer Fibrose im linken Herzventrikel postuliert wird. Eine Fibrose im RV kann laut van de Woestijne et al. 2004 jedoch auch infolge einer pathologischen Hypertrophie entstehen. Bei Nebigil et al. 2003 korreliert darüber hinaus eine linksventrikuläre Erhöhung der Genexpression von 5-HTR2B im Hypertrophie-Modell der bezüglich des MYH6-Gens manipulierten Maus mit einer Erhöhung von MYH7. Beim MYH7-Gen wurden keine signifikanten Veränderungen der Wirkstoffgruppen registriert (Abbildung 9, S. 50). Dies kann mit der Fehlerwahrscheinlichkeit der gRT-PCR zusammenhängen.

Die Analyse der mRNA-Expression der Kollagengene ergab eine signifikante Erhöhung in den Placebo- gegenüber den Sham-Gruppen (Abbildung 10, S. 51 u. Abbildung 11, S. 52). Diese bereits bei Urashima et al. 2008 am PAB-Modell der

Maus und bei Weber et al. 1988 am linken Herzventrikel beobachtete Veränderung kann laut Chapman et al. 1990 als Zeichen für eine bereits entstandene kardiale Fibrose nach erfolgter PAB-Operation gedeutet werden. Bei den Genen COL1A1 und COL1A2 kam es jeweils in der Tergurid-Wirkstoffgruppe zu einer signifikant reduzierten Expression im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Abbildung 10, S. 51). Diese Veränderungen im Bereich der dicken, laut Chapman et al. 1990 und Bishop u. Lindahl 1999 bei der Pathogenese der RVH später entstehenden Kollagenfasern der Extrazellularmatrix sprechen für eine prophylaktische Tergurid-Wirkung. Für das COL2A1-Gen zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Tergurid- gegenüber der Placebo-Gruppe (Abbildung 11, S. 52). Dieses auf den ersten Blick unerwartete Ergebnis bezüglich des nach Burgeson u. Nimni 1992 vorwiegend im Knorpelgewebe, aber auch in krankhaft veränderten Herzklappen exprimierten Kollagengens lässt sich mit der Simulation einer Pulmonalklappenstenose durch das PAB-Modell erklären, auch wenn van de Woestijne et al. 2004 in diesem Kontext lediglich eine erhöhte Expression der beiden Gene COL1A1 und COL3A1 erwähnen. Bei der Pulmonalklappenstenose, einer mit dem Karzinoidsyndrom in Zusammenhang stehenden Erkrankung, kommt es zu von Anderson et al. 1997 beschriebenen fibrotischen Ablagerungen im Bereich der Pulmonalklappe, die laut Gustafsson et al. 2005 durch Serotonin bedingt sein können. Eine derart geschädigte Klappe kann laut Burgeson u. Nimni 1992 eine erhöhte Genexpression von COL2A1 bewirken. Beim COL3A1-Gen wurden keine signifikanten Veränderungen in den Wirkstoffgruppen gegenüber der jeweiligen Placebo-Gruppe festgestellt (Abbildung 11, S. 52). Dies deutet auf eine geringere Beeinflussung der dünnen Kollagenfasern durch Tergurid drei Wochen nach stattgehabter PAB-Operation hin, deren Vermehrung laut Chapman et al. 1990, Bishop u. Laurent 1995 und Bishop u. Lindahl 1999 für eine beginnende RVH steht. Im Großen und Ganzen ergaben sich nur für die Tergurid-Wirkstoffgruppen signifikante Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Placebo-Gruppen, während sich für SB204741 keine signifikanten Gruppenunterschiede zeigten. Indirekt lässt sich deshalb eine vorwiegend über die 5-HTR2A vermittelte kardiale Fibrose vermuten, wie sie von Yabanoglu et al. 2009 für den linken Herzventrikel erwähnt wird. Eine andere potenzielle Erklärung für die überwiegenden **Tergurid-Effekte** ergibt sich aus der Betrachtung des Proliferationsgens CCND1, bei dem keine signifikanten Gruppenunterschiede registriert wurden (Abbildung 9, S. 50). Die fehlende Erhöhung der Genexpression

von CCND1 in der Placebo-Gruppe, wie sie Busk et al. 2002 für den linken Herzventrikel beschreiben, widerspricht zwar der Annahme einer nur durch eine erhöhte Zellzahl erklärten Pathogenese der RVH. Busk et al. 2002 verwenden für ihre Experimente aber linke Herzventrikel und Kardiomyozyten. Außerdem stellte sich die Tergurid-Gruppe auch hier gegenüber der Placebo-Gruppe verändert, nämlich tendenziell reduziert dar. Laut Dowdy et al. 1993, wo eine erhöhte Expression von CCND1 für schnell wachsende Tumorzellen beschrieben wird, deutet dies auf eine Verlangsamung des Zellzyklus in der Tergurid-Gruppe hin. Die Überprüfung der beiden aufgestellten Hypothesen ist zu einem späteren Zeitpunkt zu erwägen (Kapitel 5.3.4, S. 81 ff.). Zusammenfassend ergaben sich v. a. bei den Kollagengenen vielversprechende Tergurid-Effekte.

5.1.4 Antifibrotische Wirkung von Tergurid am rechten Herzventrikel

Die Verifizierung der Ergebnisse im Bereich der Fibrosegene mittels histologischer Kollagenfärbung zeigte eine erwartungsgemäße, signifikante Erhöhung des Gesamtkollagengehalts in der Placebo- gegenüber der Sham-Gruppe (Abbildung 12, S. 53 u. Abbildung 13, S. 54). Dies korreliert mit den Resultaten von Bishop et al. 1994, die ebenso eine Erhöhung des Gesamtkollagengehalts in den PAB-Gruppen ihres Hasen-Modells beschreiben. Die signifikante Reduzierung der Tergurid-Wirkstoffgruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe entspricht den Ergebnissen von Dumitrascu et al. 2011 bezüglich des Gesamtkollagengehalts der Pulmonalarterien von Mäusen nach Monocrotalin-Injektion. Die Bestimmung des Gehalts an Kollagen Typ I und III ergab mit dem Gesamtkollagengehalt übereinstimmende, signifikante Veränderungen samt Tergurid-Wirkung (Abbildung 14, S. 55 u. Abbildung 15, S. 55). Trotz Herausnahme von perivaskulären Kollagenflächen korrelieren diese mit den Ergebnissen bei der orientierenden histologischen Färbung (Kapitel 4.1.1, S. 45 f.). Im Gegensatz zur unveränderten Expression der Fibrosegene zeigte sich für die SB204741-Gruppe beim Gesamtkollagengehalt eine signifikante Reduzierung im Vergleich zur Placebo-Gruppe. In Zusammenschau mit den Veränderungen beim MYH6-Gen deutet dies laut Bogaard et al. 2009 auf einen Wirkmechanismus in Kardiomyozyten hin (Abbildung 9, S. 50). Da sich für Tergurid sowohl bezüglich des Kollagengehalts als auch der Expression von Kollagengenen positive Effekte zeigten, erfolgten die Zellkulturexperimente der vorliegenden Arbeit an Fibroblasten, die laut Bishop et al. 1994 für die Kollagenproduktion bei der RVH verantwortlich sind.

5.2 Problematische Rolle des transformierenden Wachstumsfaktors β₁ als Stimulationsmodell für Fibrose in kardialen Rattenfibroblasten

Der TGF-β₁ ist ein laut Calvieri et al. 2012 bei erhöhter Druckbelastung vorwiegend aus Kardiomyozyten und Myofibroblasten freigesetztes Zytokin. Es führt nach Dobaczewski et al. 2011 unter Beteiligung der von Massagué 2000 erwähnten SMAD-Proteine, nämlich u. a. SMAD2 und SMAD3, zu kardialer Hypertrophie und Fibrose (Kapitel 3.2.2.3, S. 25 f.). Der TGF-β₁ entfaltet seine Wirkung jedoch auch in Fibroblasten. So kommt es bei Butt et al. 1995 unter der Stimulation mit dem TGF-B1 bei konstanter Zehlzahl der Fibroblasten zu kardialer Fibrose. Dieser Effekt wird bei Petrov et al. 2002 von einer Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten Leask u. Abraham 2004 mit einer erhöhten begleitet. Letztere wird laut Proteinexpression von α-SMA assoziiert. Eghbali et al. 1991 beobachten die Entstehung von Fibrose nach Stimulation der Fibroblasten aus Hasenherzen mit demselben Zytokin. Daher scheint sich der TGF-β₁ gut als krankheitssimulierendes Agens bezüglich der Entstehung von kardialer Fibrose zu eignen, auch wenn mögliche Interaktionen mit anderen Signalwegen, wie z. B. mit dem von Ruiz-Ortega et al. 2007 für Angiotensin-II beschriebenen, noch nicht vollständig geklärt sind.

5.2.1 Nachweis eines Phosphorylierungsschrittes des Wachstumsfaktor Signalweges

Bei der Analyse einzelner Komponenten des TGF-_{β1} Signalweges ergab sich auf Proteinebene im Frühstadium, d. h. ca. 30 Minuten nach Beginn der Stimulation, eine gute Expression der Gene SMAD2 und P-SMAD2, während sich für die Gene SMAD3 und P-SMAD3 eine so schwache Proteinexpression zeigte, dass eine Auswertung der Banden nicht möglich war (Abbildung 16, S. 56). Dies korreliert mit den Beobachtungen von Inman et al. 2002 an Epithelzellen, wo ebenfalls eine stärkere Expression der beiden Gene SMAD2 und P-SMAD2 beschrieben wird. Bei Leask u. Abraham 2004 wird ihre Wichtigkeit gegenüber SMAD3 und P-SMAD3 hervorgehoben, während bei Bjørnstad et al. 2012 eine Stenose der aszendierenden Aorta lediglich mit einer Phosphorylierung von SMAD2 zu P-SMAD2 in Zellen des linken Herzventrikels assoziiert ist. Eine mögliche Erklärung für die schwache Proteinexpression von SMAD3 und P-SMAD3 liefert vermutlich die bei Burch et al. 2012 und Massagué et al. 2005 erwähnte, mit einer Dauer von weniger als 30 Minuten vergleichsweise kurze Halbwertszeit von P-SMAD2. Dieser mit der Stimulationsdauer des SMAD-Versuchs in Einklang stehende Zeitrahmen lässt die

Vermutung zu, dass zu dem Analysezeitpunkt neben der laut Lei et al. 2011 vollständig erreichten Phosphorylierung von SMAD2 zu P-SMAD2 noch keine gesteigerte Expression von P-SMAD3 vorlag (Kapitel 3.2.2.6, S. 27). Die Proteinexpression des SMAD2-Gens stellte sich in der TGF-β₁ 5 Gruppe gegenüber der -FCS-Gruppe signifikant erhöht dar (Abbildung 17, S. 57). Dies spricht zunächst für eine stärkere Wirkung der niedrigeren TGF-β₁-Konzentration, kann jedoch bei der gegebenen Versuchsanordnung aufgrund der nach Burch et al. 2012 und Massagué et al. 2005 kurzen Halbwertszeit von P-SMAD2 auch ein Hinweis für einen schnelleren Wirkeintritt in der TGF-β₁ 10 Gruppe sein. Die erhöhte Expression von Proteinen der Initialstufen eines Signalweges kann bei Voranschreiten desselben nämlich auch wieder abnehmen. Für die weiteren Berechnungen war dieser Unterschied irrelevant. Beim P-SMAD2-Gen wurde eine signifikante Erhöhung der Expression der TGF- β_1 Gruppen 5 und 10 festgestellt (Abbildung 17, S. 57). Dies deutet auf das Vorhandensein des bei Massagué 2000 und Li et al. 2009 beschriebenen TGF-β₁ Signalweges in RCF hin. Da die exakten Wirkmechanismen und Interaktionen laut Ruiz-Ortega et al. 2007 noch nicht vollständig geklärt sind, kann eine Hypothese über die Funktionalität des TGF-β₁ Signalweges in Bezug auf die Entstehung einer kardialen Fibrose erst nach Analyse der Effekte einer Stimulation mit ebendiesem Zytokin auf die mRNA-Expression entsprechender Gene getroffen werden (Kapitel 5.2.2).

5.2.2 Unerwartete, antiproliferative Wirkung des Wachstumsfaktors

Die Analyse der mRNA-Expression der Hypertrophie-, Proliferations-, Fibrose- und Anti-TGF-B₁-Gene zeigte fast nur unerwartete Resultate (Kapitel 4.2.1.2, S. 57 ff.). So ergab sich bei den Kollagengenen in den meisten TGF-B₁ Gruppen eine signifikant reduzierte oder unveränderte Expression (Abbildung 19, S. 59). Diese Beobachtungen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den bei der molekularbiologischen Auswertung der PAB-Gruppen der Tierexperimente (Kapitel 4.1.4, S. 47 ff.). Sie deuten auf einen mangelnden fibrotischen oder sogar antifibrotischen Effekt des TGF- β_1 hin, was den Resultaten von Eghbali et al. 1991, Petrov et al. 2002 und Butt et al. 1995 widerspricht, die eine Erhöhung des Kollagengehalts bzw. eine erhöhte Expression von Fibrosegenen zeigen. Die detaillierte Betrachtung dieser Experimente gibt Hinweise auf mögliche Ursachen dieser Diskrepanzen. So verwenden Eghbali et al. 1991 Fibroblasten aus Kaninchenherzen, Butt et al. 1995 aus fetalen Rattenherzen und Petrov et al. 2002

andere Zellkulturmedien. Lediglich beim COL2A1-Gen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression der TGF-β₁ 10 Gruppe gegenüber der -FCS-Gruppe. Da das COL2A1-Gen laut Burgeson u. Nimni 1992 jedoch vorwiegend im Knorpelgewebe exprimiert wird, spielt es, isoliert betrachtet, nur eine untergeordnete Rolle. Die laut Herold et al. 2009 in Zusammenhang mit Karzinoiden stehende Pulmonalklappenstenose ist entsprechend Gustafsson et al. 2005 zwar mit fibrotischen Ablagerungen im Bereich des Herzens vergesellschaftet, jedoch erwähnen van de Woestijne et al. 2004 in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression der beiden Gene COL1A1 und COL3A1. Eine mögliche Erklärung für die Erkenntnisse auf Kollagenebene liefert die Betrachtung der anderen Gene. Beim CCND1-Gen stellten sich die beiden TGF-β₁ Gruppen gegenüber der -FCS-Gruppe dosisabhängig signifikant reduziert dar (Abbildung 18, S. 58). Ein derart verlangsamter Zellzyklus lässt sich mit einer möglicherweise beginnenden Apoptose erklären, wie sie von Schuster u. Krieglstein 2002 für humane Zelltypen unter der Behandlung mit dem TGF- β_1 beschrieben wird. Laut Spender et al. 2009 finden sich dabei die Proteine SMAD2 und SMAD3 sowie ihre phosphorylierten Stufen, die auf das Vorhandensein des TGF-β₁ Signalweges hindeuten. Da bei der Versuchsdurchführung keine toten Zellen beobachtet wurden, ist eine lediglich verlangsamte Proliferation der RCF unter dem Einfluss vom TGF-\beta_1, die mit den Proliferationsassay-Ergebnissen von Petrov et al. 2000 korreliert, wahrscheinlicher als eine Apoptose. Laut Busk et al. 2002 können Veränderungen im Bereich der Proliferation die Entstehung einer kardialen Hypertrophie beeinflussen und somit auch die involvierte Genexpression manipulieren. Dies stellt eine mögliche Erklärung für die unerwartete Wirkung des Wachstumsfaktors dar, weshalb es der nachfolgenden Verifizierung der Ergebnisse bei den Kollagengenen bedarf (Abbildung 19, S. 59, Kapitel 5.2.3, S. 77 f.). Für das CILP Gen ergab sich eine dosisabhängig signifikante Reduzierung der TGF-β₁ Gruppen 5 und 10 gegenüber der -FCS-Gruppe (Abbildung 18, S. 58). Das CILP fungiert laut Kreymborg et al. 2010 als reaktiver Hemmer des TGF- β_1 Signalweges im PAB-Modell der Maus und zeigt im Falle von kardialer Hypertrophie und Fibrose eine erhöhte Genexpression, die im RV stärker ausfällt als im linken Herzventrikel. Seine reduzierte Genexpression spricht für eine Verringerung ebendieser Wirkung, die sich aufgrund der im Vergleich zum CCND1-Gen stärkeren Ausprägung nicht allein durch die bei Busk et al. 2002 beschriebene, verringerte Proliferation erklären lässt. Die

Herkunft der verwendeten RCF aus beiden Vorhöfen, Ventrikeln oder dem Septum liefert hier einen möglichen Erklärungsansatz. Insgesamt deuten die Erkenntnisse auf eine nach Kreymborg et al. 2010 und Spender et al. 2009 zwar intakte, aber unerwartete, nur die Proliferation verlangsamende TGF-β₁-Wirkung in den verwendeten RCF hin, die laut Busk et al. 2002 die Genese einer kardialen Hypertrophie beeinflussen und somit auch die beteiligte Genexpression manipulieren kann. Dies belegt auch die im Vergleich zur -FCS-Gruppe signifikant reduzierte TGF-β₁ 10 Gruppe beim ACTC1-Gen (Abbildung 18, S. 58). Ein potenzielles Fehlen der von Debold et al. 2010 beschriebenen Punktmutationen erklärt jedenfalls nicht tendenziellen die reduzierte Expression dieses Hypertrophiegens. Die Veränderungen der TGF-B₁ Gruppen bei den Genen ANP und BNP lassen sich methodenbedingt höheren Fehlerwahrscheinlichkeit wegen der bei den Zellkulturversuchen nicht verwerten (Abbildung 18, S. 58). Somit ist die Stimulation mit dem TGF-β₁ als Modell für die Simulation eines kardialen Remodellings in dieser Arbeit ungeeignet.

5.2.3 Potenzielle Erklärung für die untypische Wirkung des Wachstumsfaktors und andere Stimulationsmodelle

Die mittels Kollagenassay durchgeführte Überprüfung der komplizierten Verhältnisse auf mRNA-Ebene der Kollagengene zeigte keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 20, S. 60). Da das Kollagenassay eine im Vergleich zur gRT-PCR weniger fehlerbehaftete Untersuchungsmethode darstellt, sprechen die im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lijnen et al. 2005 und Catalán et al. 2012 fehlenden Unterschiede im Kollagengehalt des Mediums gegen die Entstehung einer kardialen Fibrose in RCF unter der Behandlung mit dem TGF-β₁. Seine mangelnde Wirkung lässt sich mit einer eventuell unbemerkt stattgehabten Differenzierung der RCF zu Myofibroblasten erklären, wie sie von Santiago et al. 2010 für höhere Zellpassagen beschrieben wird. Doch ergaben sich infolge der Stimulation mit dem TGF- β_1 auch bei Verwendung einer niedrigen, minimal vierten Zellpassage weder eine Erhöhung der Genexpression von Hypertrophie- oder Fibrosegenen noch lichtmikroskopische Anzeichen von Myofibroblasten (Kapitel 3.2.2.2, S. 24 f. u. Abbildung 3, S. 25). Außerdem kommt es bei Petrov et al. 2002 und Catalán et al. 2012 während der Transformation von Fibroblasten in Myofibroblasten zur kardialen Fibrose. Eine andere Erklärung liefert der bereits erwähnte Einsatz von gekauften, hier adulten RCF ohne Unterscheidung der Herkunft aus beiden Vorhöfen, Ventrikeln oder dem Septum, der herstellungsbedingt je Züchtung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen könnte. Deshalb sollte in zukünftigen Experimenten dieser Art eine selbständige Zellisolation aus RV angestrebt werden. Adiarto et al. 2012 beschreiben eine erhöhte Expression von Fibrosegenen unter der Stimulation mit Angiotensin-II, die laut He et al. 2010 und Jaffré et al. 2009 über eine Aktivierung des TGF- β_1 Signalweges bewirkt wird, jedoch nach Leask 2007 auch andere, noch nicht vollständig geklärte Signalwege involviert. Bei Carthy et al. 2011 führt die Stimulation mit dem Mitglied 3A der Familie vom Typ der flügellosen Maus-Mammatumorvirus-Integrationsstellen (WNT3A, engl. wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 3A) über die Aktivierung des TGF-β₁ Signalweges und die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten zur Fibrose. Da auch die Benutzung dieser Wirkstoffe aufgrund der Beteiligung desselben TGF-β₁ Signalweges in der vorliegenden Arbeit als nicht erfolgsversprechend erschien, erfolgte die mRNA-Analyse der Wirkstoffgruppen lediglich mit einer längeren BM-Einwirkzeit, die laut Petrov et al. 2002 eine kardiale Fibrose bewirken kann.

5.3 Erkenntnisse aus weiteren Zellkulturexperimenten

5.3.1 Fragliche Entstehung einer Fibrose in kardialen Rattenfibroblasten unter einer längeren Basalmedium Einwirkzeit

Die Interpretation der Ergebnisse auf mRNA-Ebene gestaltete sich bei den Basalversuchen schwierig. Da unter einer 72 Stunden dauernden Stimulation von RCF mit BM lediglich von Petrov et al. 2002 fibrotische Veränderungen in Form einer Erhöhung des löslichen Kollagengehalts beobachtet wurden, müssen die Basalexperimente dieser Arbeit unter Vorbehalt betrachtet werden. Im Kollagenassay wurden nämlich sowohl beim löslichen Kollagengehalt des Mediums als auch auf Proteinebene keine signifikanten Gruppenunterschiede festgestellt (Abbildung 25, S. 66). Der beabsichtigte Nachweis einer prophylaktischen Wirkung von Tergurid entsprechend der molekularbiologischen Analyse der RV bzw. den pulmonalen Tierexperimenten von Dumitrascu et al. 2011 ist damit nicht möglich (Abbildung 2, S. 23). Die Basalexperimente müssen vielmehr als Nebenwirkungsanalyse des Wirkstoffs Tergurid sowie seines Lösungsmittels Ethanol interpretiert werden, da sie ähnlich wie bei einem Teilexperiment von Königshoff et al. 2010 keine Stimulation mit einem Signalmolekül beinhalten.

5.3.2 Mangel an Nebenwirkungen von Tergurid

Beim 5-HTR2A-Gen zeigte sich eine signifikant reduzierte Expression in der Ethanol 1 µM gegenüber der -FCS-Gruppe; Ethanol 100 nM war tendenziell verringert (Abbildung 21, S. 61). Dies spricht für eine starke Beeinflussung der 5-HTR2A durch das Lösungsmittel Ethanol, da dieses laut Law u. Carver 2013 erst in viel höheren als den hier verwendeten Konzentrationen eine aktivierende Wirkung auf RCF aufweist. Für das 5-HTR2B-Gen ergaben sich entgegen Hutcheson et al. 2011 keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 21, S. 61). Dies widerspricht auf den ersten Blick auch den Ausführungen von Shyu 2009, der einen Wirkmechanismus über die 5-HTR2B in kardialen Fibroblasten postuliert. Da laut Schmidt u. Rothämel 2011 die ursprüngliche Anzahl an 5-HTR bei Anwendung der gRT-PCR unbekannt ist, schließt dieses Resultat eine Wirkung über die 5-HTR2B jedoch nicht aus. Die fehlende Unterscheidung zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten in den Tierexperimenten lässt auch den gewählten Zelltyp als mögliche Erklärung für dieses abweichende Ergebnis zu. Aufgrund des nach Law u. Carver 2013 starken Einflusses von Ethanol auf die Anzahl der 5-HTR2A sind die restlichen mRNA-Resultate nicht sehr zuverlässig, da in den Tierexperimenten fast nur Effekte einer kombinierten Manipulation beider 5-HTR gezeigt werden konnten, die in den Basalversuchen durch diesen Lösungsmittel-Einfluss möglicherweise verfälscht abgebildet wurden (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff. u. Kapitel 4.1.4, S. 47 ff.). Daher ist eine Analyse der tendenziellen Veränderungen, wie sie beispielsweise für das ANP-Gen festgestellt wurden, nicht sinnvoll (Abbildung 22, S. 63). Dasselbe gilt für die unerwartete, im Vergleich zur Ethanol 1 µM Gruppe signifikante Erhöhung der Expression in der Tergurid 1 µM Wirkstoffgruppe beim BNP-Gen (Abbildung 22, S. 63). Ähnlich wie beim 5-HTR2A-Gen stellten sich hierbei die beiden Ethanol-Gruppen signifikant vermindert dar, was auf eine Nebenwirkung des Lösungsmittels entsprechend Law u. Carver 2013 hindeutet und einer Interpretation der zugehörigen Wirkstoffgruppen entgegensteht. Somit lassen sich die in den PAB-Gruppen dieser Arbeit beobachteten Resultate bei den Genen ANP und BNP auf Zellkulturebene nicht nachvollziehen (Abbildung 8, S. 49). Eine andere Erklärung für diese unerwarteten Veränderungen stellt ein potenzieller methodischer Fehler bei der Durchführung der Zellkulturexperimente oder der gRT-PCR dar, auch wenn keine abgestorbenen Zellen registriert wurden (Kapitel 3.2.3, S. 28 f.). Laut Porter u. Turner 2009 können nämlich schon kleine Versuchsabweichungen wie

beispielsweise verschiedene Zellkulturmedien zu unterschiedlichen Reaktionen in kardialen Fibroblasten führen. So weichen die in den Zellkulturexperimenten benutzten, für RCF spezifischen Medien von den bei Petrov et al. 2002 zur Anwendung gekommenen ab. Für das COL2A1-Gen wurde eine signifikante Erhöhung der Expression in der Tergurid 100 nM gegenüber der Ethanol 100 nM Gruppe festgestellt; die restlichen Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 23, S. 64). Auch diese unerwartete Zunahme der Expression dieses nach Burgeson u. Nimni 1992 u. a. in krankhaft veränderten Herzklappen exprimierten Kollagengens spricht für einen methodischen Fehler, da sie den Ausführungen von Kekewska et al. 2012 entgegen steht, die eine konstante Kollagenproduktion nach Stimulation mit Tergurid in Zellen aus Aorten- und Mitralklappen von Schweinen beschreiben. Außerdem wird bei Ghofrani et al. 2012 kein direkter Einfluss von Tergurid auf Herzklappen erwähnt. Bei den übrigen Genen ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 22, S. 63 u. Abbildung 23, S. 64). Entsprechend Königshoff et al. 2010 weist eine erhöhte Genexpression in den Wirkstoffgruppen auf Nebenwirkungen in Form von myokardialem Remodelling hin. Daher sprechen die fehlenden Gruppenunterschiede formal zwar für mangelnde Tergurid-Nebenwirkungen, doch müssen auch diese qRT-PCR Ergebnisse wegen eines möglichen methodischen Fehlers oder einer unerkannten Ethanol-Interaktion mit Vorsicht betrachtet werden.

5.3.3 Hinweis auf Transformation der Fibroblasten in Myofibroblasten als Erklärung für die fehlende fibrotische Wirkung im Basalversuch

Die Untersuchung der Proteinebene des α -SMA-Gens erfolgte zwecks Überprüfung der auf mRNA-Ebene des ACTA2-Gens fehlenden Veränderungen (Abbildung 22, S. 63). Es zeigten sich auch bei der Proteinexpression des α -SMA-Gens keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 24, S. 65). Dieses mit der mRNA-Genexpression bei der Analyse der Tierexperimente übereinstimmende Ergebnis deutet wohl auf eine mangelnde Wirkung von Tergurid hin, doch kann aufgrund der relativ starken Expression eine nach Leask u. Abraham 2004 bereits stattgefundene Differenzierung der RCF zu Myofibroblasten in höheren Passagen entsprechend Santiago et al. 2010 nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 7, S. 48). Laut Santiago et al. 2010 bewirkt nämlich jede Zellpassage von RCF eine Erhöhung der Proteinexpression der Gene α -SMA und TGF- β_1 sowie bis zu einer bestimmten Stufe auch des COL1A1-Gens, welches laut Bishop u. Lindahl 1999 für kardiale Fibrose steht. Für eine darüber hinausgehende Stimulation mit dem TGF- β_1 kann dann laut Petrov et al. 2002 kein zusätzlicher fibrotischer Effekt mehr nachgewiesen werden. Nach Porter u. Turner 2009 können kleine Versuchsabweichungen die Reaktionen in kardialen Fibroblasten beeinflussen. Daher muss trotz der in der vorliegenden Arbeit erfolgten Verwendung von niedrigen, minimal vierten Zellpassagen und fehlenden lichtmikroskopischen Anzeichen einer Transformation der RCF in Myofibroblasten auch eine solche Transformation mit bereits entstandener Fibrose entsprechend Petrov et al. 2002 in Erwägung gezogen werden (Abbildung 3, S. 25). Dies erklärt eventuell auch die fehlende Wirkung des TGF- β_1 in den Zellkulturexperimenten (Kapitel 4.2.1, S. 56 ff.).

Die mittels Kollagenassay durchgeführte Verifizierung der Genexpression der Fibrosegene ergab sowohl beim löslichen Kollagengehalt des Mediums als auch auf Proteinebene keine signifikanten Gruppenunterschiede (Abbildung 25, S. 66). Da das Kollagenassay laut Catalán et al. 2012 eine im Vergleich zur qRT-PCR geringere Fehlerwahrscheinlichkeit aufweist, bestätigt dies die größtenteils nicht vorhandenen Gruppenunterschiede auf mRNA-Ebene der Kollagengene (Abbildung 23, S. 64). Da die Basalversuche keinen zuverlässigen Nachweis einer prophylaktischen Wirkung von Tergurid wie beim Monocrotalin-Modell von Dumitrascu et al. 2011 ermöglichen, sollten bei Vorliegen eines geeigneten krankheitssimulierenden Agens die untersuchten Gene noch einmal auf Proteinebene analysiert werden.

5.3.4 Diskussion eines Wirkmechanismus über die Serotonin-Rezeptoren 2A oder 2B anhand der Beeinflussung der Proliferation von Fibroblasten durch Ketanserin, SB204741 und Tergurid

Der in den Tierexperimenten länger anhaltende Krankheitszustand führte zu Veränderungen in der Expression der Gene COL1A1 und COL1A2, die laut Bishop u. Lindahl 1999 bei der Pathogenese der RVH erst später entstehende, dicke Kollagenfasern kodieren (Abbildung 10, S. 51). Zur Überprüfung einer schleichenden, prophylaktischen Wirkung der Blockade von 5-HTR erfolgte trotz der im Gegensatz zu den Ausführungen von Busk et al. 2002 an Kardiomyozyten in dieser Arbeit weitgehend unveränderten Expression des CCND1-Gens ein Proliferationsassay (Abbildung 9, S. 50). Für alle Wirkstoff-Experimente zeigte sich eine signifikante Erhöhung der jeweiligen Ethanol- bzw. DMSO-Kontrollgruppe gegenüber der -FCS-Gruppe (Abbildung 26, S. 67). Dies spricht laut Griffiths u.

Sundaram 2011 für eine regelrechte Proliferation. Lediglich bei den SB204741-Versuchen wurde eine schwache, jedoch signifikante Reduzierung der einzelnen DMSO-Kontrollgruppen gegenüber der +FCS-Gruppe festgestellt. Da in diesen Gruppen ein sehr kleines Fehlerintervall bei nur wenig abweichenden Werten vorlag. problemlose Versuchsdurchführung lässt dies auf eine äußerst des Proliferationsassays nach Griffiths u. Sundaram 2011 schließen. Die Ketanserin-Gruppen zeigten die stärkste, dosisabhängig signifikante Reduzierung der Proliferation gegenüber ihrer jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe (Abbildung 26, S. 67). Dies belegt einerseits die auf Kollagenebene der Tierexperimente aufgestellte Hypothese einer durch die Blockade der 5-HTR2A positiv beeinflussten kardialen Fibrose, wie sie von Yabanoglu et al. 2009 linksventrikulär beschrieben wird (Abbildung 10, S. 51 u. Abbildung 11, S. 52). Andererseits stützt diese Erkenntnis jedoch auch die Vermutung einer im Vergleich zu den 5-HTR2B relativ hohen ursprünglichen Anzahl an 5-HTR2A (Abbildung 5, S. 47). Die 5-HTR können nämlich nicht nur eine nach Berger et al. 2009 unterschiedliche Sensitivität besitzen, sondern deren ursprüngliche Anzahl ist bei Durchführung einer gRT-PCR laut Schmidt u. Rothämel 2011 aufgrund der Eigenart dieser Untersuchungsmethode unbekannt. Für die SB204741-Gruppen ergab sich die am schwächsten, dosisabhängig signifikant reduzierte Proliferation gegenüber der entsprechenden DMSO-Kontrollgruppe (Abbildung 26, S. 67). Dies deutet auf einen zwar vorhandenen, in RCF jedoch im Gegensatz zu den Ausführungen von Hutcheson et al. 2011 und Nebigil et al. 2003 untergeordneten Wirkmechanismus über eine Blockade der 5-HTR2B hin. Letztere assoziieren eine Erhöhung der 5-HTR2B mit Hypertrophiegenen wie MYH7, so dass auch der in dieser Arbeit ausgewählte Zelltyp der RCF eine Rolle spielen könnte. Eine andere mögliche Erklärung für die schwächere Beeinflussung der Prolieration durch SB204741 stellt die erst durch die PAB bewirkte höhere Expression der 5-HTR2B-Gene dar, welche den Ergebnissen von Dumitrascu et al. 2011 gleicht, die eine signifikante Erhöhung der 5-HTR2B in pulmonalen Muskelzellen aus der Gruppe mit PAH-Patienten beschreiben (Abbildung 5, S. 47). Eine erst mit der Zeit bewirkte Erhöhung der Anzahl an 5-HTR2B verringert vermutlich den Zeitraum für die potenzielle Wirkung einer Hemmung derselben durch SB204741. Das größte Problem bei der Diskussion eines überwiegenden Wirkmechanismus über einen der beiden 5-HTR2A oder 2B ist die Konzentrierung der bisherigen Literaturguellen auf die erhöhte mRNA-Expression der 5-HTR2B-Gene, wie sie von Hutcheson et al. 2011 für die Entstehung einer kardialen Fibrose und von Nebigil et al. 2003 im Hypertrophie-Modell der bezüglich des MYH6-Gens manipulierten Maus postuliert Einer entsprechend Schmidt u. Rothämel 2011 potenziell wird. höheren ursprünglichen Anzahl an 5-HTR2A oder einer nach Berger et al. 2009 möglicherweise besseren Sensitivität derselben in Bezug auf die Abschwächung einer RVH u. a. wird zu wenig Beachtung geschenkt, und das, obwohl weder in der vorliegenden Arbeit noch bei Hutcheson et al. 2011, Nebigil et al. 2003, Yabanoglu et al. 2009 oder in sonstigen bekannten Quellen ein Nachweis über die Proteinexpression dieser beiden 5-HTR-Gene im RV gelang (Abbildung 6, S. 47). Dabei ergibt ein Wirkmechanismus über die 5-HTR2A, wie er von Yabanoglu et al. 2009 für den linken Herzventrikel beschrieben wird, aus physiologischer Sicht sogar mehr Sinn, da Ketanserin laut Centurión et al. 2006 und Miao et al. 2003 über die Blockierung von α_1 Adrenozeptoren eine blutdrucksenkende Wirkung im Gefäßsystem besitzt. Eine positive Wirkung auf die RVH ist über eine begleitende Nachlastsenkung naheliegend. Ein bevorstehender Nachweis der Proteinexpression der 5-HTR2A und 2B in RV ist aufgrund des geringen Gewichts derselben und den damit einhergehenden beschränkten Möglichkeiten des Western Blots beizeiten nicht absehbar (Kapitel 3.2.1.2, S. 22 f. u. Kapitel 3.2.5, S. 34 ff.). Daher ist die Konzentration auf den Wirkstoff Tergurid, der laut Newman-Tancredi et al. 2002 dieselben hemmenden Eigenschaften an α_1 Adrenozeptoren besitzt wie Ketanserin, aktuell ein sinnvoller Kompromiss. Beim Tergurid-Experiment wurde eine signifikante Reduzierung der Proliferation in den Wirkstoffgruppen Tergurid 100 nM und 1 µM festgestellt, während sich Tergurid 500 nM nur tendenziell verringert darstellte (Abbildung 26, S. 67). Die Intensität der Abweichungen der Wirkstoffgruppen lag zwischen der in den beiden anderen Experimenten. Dies spricht für eine komplizierte Dosis-Wirkungs-Beziehung von Tergurid, die vermutlich mit der laut Berger et al. 2009 unterschiedlichen Sensitivität der 5-HTR2A und 2B zusammenhängt. Eine einfache Kumulation der Effekte von Ketanserin und SB204741 zeigte sich hierbei nicht. Bei der Analyse der Tierexperimente wurde in den Tergurid-Wirkstoffgruppen analog zu den pulmonalen Experimenten von Dumitrascu et al. 2011 und Königshoff et al. 2010 eine Reduzierung des Kollagengehalts der RV und der mRNA-Genexpression der untersuchten Fibrosegene festgestellt (Kapitel 4.1, S. 45 ff.). Während der kurzen Stimulationszeit in den Basalversuchen kam es zu keinen wegweisenden signifikanten Veränderungen in denselben Wirkstoffgruppen, die sich entsprechend den Teilexperimenten von Königshoff et al. 2010 als fehlende Tergurid-Nebenwirkungen deuten lassen (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff.). Nach Betrachtung der Resultate des Proliferationsassay kann daher von einem abwechselnden supportiven Einfluss des an den von Roth 2007 und Yabanoglu et al. 2009 beschriebenen 5-HTR2A und 2B seine Wirkung entfaltendenden Tergurids einerseits auf die Proliferation von RCF, andererseits auf die Kollagenproduktion ausgegangen werden, wie bereits von Kekewska et al. 2012 vermutet. Die entsprechend Kekewska et al. 2012 relativ schwache Wirkung der proliferativen Teilkomponente gegenüber der starken Beeinflussung der mRNA-Genexpression der Fibrosegene ist im Rahmen der kurzen Stimulationszeit der Zellkulturexperimente im Vergleich zu den Tierexperimenten zu sehen. Die optimale Tergurid-Dosierung sollte in weiteren Experimenten ermittelt werden. Eine Beteiligung von Kardiomyozyten ist wegen der Veränderungen bei den Genen ANP, MYH6 und MYH7, insbesondere jedoch beim MYH6-Gen unter der Behandlung mit SB204741, laut Calvieri et al. 2012, Potter et al. 2009 und Bogaard et al. 2009 zwar möglich, aufgrund der hauptsächlichen Beeinflussung des Kollagengehalts nach Bishop et al. 1994 aber unwahrscheinlich (Kapitel 4.1, S. 45 ff.). Dennoch sollte in zukünftigen Arbeiten auch ein potenzieller Wirkmechanismus in Kardiomyozyten diskutiert werden.

5.4 Fazit

Das biogene Amin 5-HT besitzt ein vielfältiges Wirkspektrum, das es über 14 Rezeptoren in verschiedenen Organen entfaltet (Pithadia u. Jain 2009, Berger et al. 2009). Im Bereich des Herzens konnte für den Wirkstoff Tergurid, einen kombinierten 5-HTR2A und 2B Antagonisten, ein im Vergleich zur Lunge relativ schwaches direktes Wirkpotenzial nachgewiesen werden (Abbildung 6, S. 47, Dumitrascu et al. 2011). In den Tierexperimenten zeigten sich hauptsächlich bei der mRNA-Expression der Fibrosegene und beim Kollagengehalt des RV positive Tergurid-Effekte, was nach Bishop et al. 1994 auf kardiale Firboblasten als ursächlichen Zelltyp für die Kollagenproduktion bei der RVH hindeutet (Kapitel 4.1.4, S. 47 ff. u. Kapitel 4.1.5, S. 53 ff.). Trotz erhöhter Expression der 5-HTR2B-Gene lassen die Ergebnisse entgegen den Postulaten von Hutcheson et al. 2011 indirekt eine vorwiegend über die 5-HTR2A vermittelte antifibrotische Wirkung vermuten (Abbildung 5, S. 47 u. Abbildung 10, S. 51, Yabanoglu et al. 2009). In den Zellkulturexperimenten wurde das Vorhandensein des TGF- β_1 Signalweges in RCF nachgewiesen (Abbildung 17, S. 57). Im Gegensatz zu Petrov et al. 2002, Butt et

al. 1995 und Eghbali et al. 1991 hatte die Behandlung mit dem TGF-β₁ jedoch keine Fibrose, sondern eine verlangsamte Proliferation zur Folge (Abbildung 19, S. 59 u. Abbildung 20, S. 60, Spender et al. 2009). Deshalb sollte in zukünftigen Experimenten ein vom TGF-B1 unabhängiges Stimulationsmodell für RCF entwickelt werden. In den Basalversuchen ergab sich ein starker Einfluss des entgegen Law u. Carver 2013 niedrig konzentrierten Lösungsmittels Ethanol auf die 5-HTR2A (Abbildung 21, S. 61). Es zeigten sich, abgesehen von methodenbedingten Veränderungen Z. Β. aufgrund von Materialfehlern oder spezifischen Zellkulturmedien, keine Hinweise auf eindeutige Tergurid-Nebenwirkungen (Kapitel 4.2.2, S. 61 ff. u. Kapitel 4.2.3, S. 65 f. u. Kapitel 4.2.4, S. 65 f., Königshoff et al. 2010). Beim α-SMA-Gen wurde eine relativ starke Proteinexpression ohne signifikante Gruppenunterschiede festgestellt, weshalb eine Differenzierung der RCF zu Myofibroblasten mit bereits entstandener Fibrose entsprechend Santiago et al. 2010 nicht ausgeschlossen werden kann (Abbildung 24, S. 65). In den Proliferationsversuchen ergab sich eine in Anbetracht der schwachen Proteinexpression der 5-HTR-Gene in den RV relativ gute prophylaktische Wirkung von Ketanserin, SB204741 und Tergurid (Abbildung 5, S. 47 u. Abbildung 26, S. 67). Während Ketanserin und SB204741 eine lineare Dosisabhängigkeit zeigten, stellte sich dies für Tergurid aufgrund der nach Berger et al. 2009 unterschiedlichen Sensitivität der 5-HTR2A und 2B kompliziert dar. Da in den Tierexperimenten jedoch nur für Tergurid eine adäguate Wirkung nachgewiesen werden konnte, sollte bis zum Nachweis der ursprünglichen Anzahl an 5-HTR2A und 2B v. a. dieser Wirkstoff näher untersucht werden (Kapitel 4.1.3, S. 47, Kekewska et al. 2012, Dumitrascu et al. 2011, Schmidt u. Rothämel 2011). Generell sprechen die Ergebnisse für eine wichtige Rolle von 5-HT bei der RVH. Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, konnte in der vorliegenden Arbeit die in RCF untypische Wirkung des mit dem 5-HT Signalweg interagierenden, ihm wahrscheinlich nachgeschalteten TGF- β_1 Signalweges aufgezeigt werden (Kapitel 4.2.1, S. 56 ff., Spender et al. 2009, Li et al. 2009, Petrov et al. 2002, Massagué 2000, Ruiz-Ortega et al. 2007). Im Bereich der Lunge stellt Tergurid einen vielversprechenden Wirkstoff dar (Dumitrascu et al. 2011). In Kombination mit einer begleitenden ERA Therapie ergibt sich für die Behandlung mit Tergurid im Rahmen einer Phase IIa Studie eine signifikante Verbesserung des pulmonalvaskulären Widerstands (Ghofrani et al. 2012). Obwohl es darunter insgesamt auch zu einem Anstieg an

schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen wie Dyspnoe, Obstipation oder abdominellen Schmerzen kommt, empfiehlt es sich aufgrund der hier festgestellten komplexen Zusammenhänge in der Dosis-Wirkungs-Beziehung nach erneuter Untersuchung dieses vielschichtigen Sachverhalts sowohl auf pulmonaler Ebene als auch in allen anderen in Frage kommenden Zelltypen die diesbezügliche Forschung fortzuführen (Kapitel 4.1, S. 45 ff. u. Kapitel 4.2.5, S. 66 f., Ghofrani et al. 2012, Dumitrascu et al. 2011, Antoniu 2011, Königshoff et al. 2010). Demzufolge sollte in zukünftigen Arbeiten die optimale Tergurid-Dosierung in Herz und Lunge ebenso wie u. a. eine laut Calvieri et al. 2012 mögliche Beteiligung von Kardiomyozyten untersucht werden.

Zusammenfassung

<u>Hintergrund:</u> Die pathologische rechtsventrikuläre Hypertrophie entsteht u. a. infolge der nicht seltenen pulmonalen Hypertonie und kann über Rechtsherzversagen zum Tode führen. Serotonin ist ein biogenes Amin, das seine Wirkung über 14 verschiedene Rezeptoren in unterschiedlichen Geweben entfaltet. Die Hemmung der Serotonin-Rezeptoren 2A und 2B durch die Substanz Tergurid zeigte vielversprechende Effekte in Bezug auf den strukturellen Gefäßwandumbau bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie. Diese Arbeit untersucht nun die Wirkung einer kombinierten Blockade von Serotonin-Rezeptoren am rechten Herzen.

<u>Methoden</u>: Männliche C57Bl6J-Mäuse wurden einer Pulmonalarterienstenose mittels eines Clips unterzogen und über einen Zeitraum von 14 Tagen mit dem Serotonin-Rezeptor 2A oder 2B Antagonisten Tergurid, SB204741 oder einer Trägersubstanz behandelt. Auf Zellkulturebene erfolgte die Stimulation von adulten kardialen Rattenfibroblasten mit dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) β_1 , Basaloder Wachstumsmedium und die Untersuchung des Einflusses von den oben genannten Substanzen und Ketanserin auf die Proliferation und Kollagensynthese dieser Zellen. Die Effekte einer Serotonin-Rezeptor Blockade wurden mittels Western Blot, quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, histologischer Färbung sowie Kollagen- und Proliferationstests untersucht.

<u>Ergebnisse</u>: In den Tierexperimenten zeigte sich eine protektive Wirkung von Tergurid und SB204741 bei der Entstehung der kardialen Fibrose mit Effekten auf die Produktion und Ablagerung von Kollagen. In den Zellkulturexperimenten gelang es nicht, mit TGF- β_1 eine Kollagensynthese zu induzieren, obwohl der nachgeschaltete SMAD Signalweg aktiviert wurde. Hier könnte eine mögliche Transformation der Fibroblasten in Myofibroblasten eine Rolle spielen. Allerdings konnte die Serum-induzierte Proliferation der Fibroblasten durch Ketanserin, aber auch von Tergurid beeinflusst werden.

<u>Schlussfolgerung</u>: Tergurid stellt auch für den direkten Einsatz am Herzen einen aussichtsreichen Wirkstoff dar. In Zellkulturexperimenten konnte ein anti-proliferativer und im Tiermodell ein anti-fibrotischer Effekt dargestellt werden. Weitergehende Untersuchungen sollten die exakten molekularen Mechanismen sowie eine mögliche Beteiligung des Serotonin Signalweges in Kardiomyozyten adressieren.

Summary

<u>Background</u>: Pathological right ventricular hypertrophy results among other reasons from pulmonary hypertension and may cause death by right heart failure. Serotonin is a biogenic amine, which signals via 14 different receptors in various tissues. The inhibition of the serotonin receptors 2A and 2B by terguride already demonstrated promising effects on pulmonary vascular remodelling in experimental pulmonary hypertension. This study now addresses the effects of serotonin receptor inhibition by terguride in the right ventricle under conditions of right heart hypertrophy.

<u>Methods:</u> Male C57Bl6J mice underwent pulmonary artery banding (PAB) by a titanium clip. They were treated with the serotonin receptor 2A or 2B antagonist terguride, SB204741 or a vehicle for a period of 14 days. On cell culture level, adult rat cardiac fibroblasts were stimulated by transforming growth factor (TGF) β_1 , basal or growth medium and treated with the same substances and ketanserin. The effect of the serotonin receptor blockers on collagen production and proliferation was analysed by use of western blot, quantitative realtime polymerase chain reaction, histological staining as well as collagen and proliferation assays.

<u>*Results:*</u> In animal experiments a protective effect of terguride and SB204741 on the formation of cardiac fibrosis was shown with effects on collagen production and deposition in the right heart. In cell culture experiments TGF- β_1 did not induce collagen synthesis although the downstream SMAD pathway was active. A transformation of fibroblasts into myofibroblasts may be one reason for this observation. However, the serum-induced proliferation of cardiac fibroblasts could be reduced by ketanserin and terguride.

<u>Conclusion</u>: Terguride represents a promising agent for treatment of right heart hypertrophy. In cell culture experiments a direct antiproliferative effect on serum-induced proliferation in fibroblasts was observed while it was demonstrated a strong cardiac anti-fibrotic effect in the model of PAB-induced right heart hypertrophy. Future studies should address in more detail the molecular mechanism and also the role of the serotonin pathway in cardiomyocytes.

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
5-HTR	5-HT-Rezeptor, z. B. 5-HT-Rezeptor 2A (5-HTR2A)
α	Signifikanzniveau
β-ΜΕ	β-Mercaptoethanol
-FCS	Kontrollgruppe mit BM
+FCS	Kontrollgruppe mit GM
ACE	Angiotensin-Konversions-Enzym (engl. angiotensin convertising
	enzyme)
ACTA2, α-SMA	Glattmuskuläres Alpha-Aktin (engl. alpha smooth muscle actin)
ACTC1	Kardiales Alpha-Aktin 1 (engl. alpha cardiac muscle actin 1)
ALK	Activin Rezeptor ähnliche Kinase (engl. activin receptor-like
	kinase), z. B. Activin Rezeptor ähnliche Kinase Typ 1 (ALK1)
ANOVA	Varianzanalyse (engl. analysis of variance)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AT ₁	Angiotensin-II Subtyp I
BLAST	Programm zur Analyse von Protein- und Nukleinsäuresequenzen
	(engl. basic local alignment search tool)
BMPR2	Knochen-morphogenetischer Protein Rezeptor Typ 2 (engl. bone
	morphogenetic protein receptor type 2)
bid	zweimal täglich (lat. <i>bis in die</i>)
BM	Basalmedium
BNP	Brain natriuretisches Peptid
Вр	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	ungefähr (lat. <i>circa</i>)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (engl. cyclic adenosine
	monophosphate)
CCND1	Zyklin D1 (engl. <i>cyclin D1</i>)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)

cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat (engl. cyclic guanosine
	monophosphate)
CILP	Cartilage intermediate layer Protein
COL	Kollagen (engl. <i>collagen</i>), z. B. Kollagen Typ I Subtyp α1
	(COL1A1), Kollagen Typ I Subtyp α2 (COL1A2) usw.
Ct	Schwellenwert-Zyklus (engl. cycle threshold)
СТЕРН	chronische thromboembolische pulmonale Hypertonie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Kontrollgruppe mit ca. derselben Menge an DMSO wie in der
	entsprechenden Wirkstoffgruppe (100, 500 nM oder 1 μM)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (engl. Dulbeccos
	phosphate buffered saline)
DR	Dopamin-Rezeptor, z. B. Dopamin-Rezeptor D2 (DRD2)
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (engl. epidermal growth factor)
engl.	auf Englisch
ERA	Endothelin-Rezeptor Antagonist
ERK1/2	durch extrazelluläre Signale regulierte Kinasen 1 und 2 (engl.
	extracellular-signal regulated kinases 1 and 2)
ETA	Endothelin-Rezeptor Typ A
Ethanol	Kontrollgruppe mit ca. derselben Menge an Ethanol wie in der
	entsprechenden Wirkstoffgruppe (100, 500 nM oder 1 μ M)
FASTA	textbasiertes Format zur Speicherung von Protein- und
	Nukleinsäuresequenzen
FCS	fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FGF2	Fibroblastenwachstumsfaktor 2 (engl. fibroblast growth factor 2)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes-Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM	Wachstumsmedium (engl. growth medium)
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren (engl. G-protein coupled
	receptors)
GTP	Guanosintriphosphat

HBSS	Hanks ausgewogene Salzlösung (engl. Hanks balanced salt
	solution)
HCI	Salzsäure
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
i. p.	intraperitoneal
KCNK3	Mitglied 3 der Kaliumkanal Unterfamilie K (engl. potassium
	channel subfamily K member 3)
Ketanserin	Wirkstoffgruppe mit Ketanserin-Konzentrationen von 100, 500 nM
	oder 1 µM
KG	Körpergewicht
lat.	auf Lateinisch
Μ	molar
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
MW	arithmetischer Mittelwert
MYH6, MHC-α	Myosin, schwere Kette, Alpha (engl. myosin heavy chain alpha)
ΜΥΗ7, ΜΗϹ-β	Myosin, schwere Kette, Beta (engl. myosin heavy chain beta)
n	Anzahl an Versuchstieren / Proben
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)
NTC	Leerprobe für qRT-PCR (engl. no template control)
р	Irrtumswahrscheinlichkeit (engl. probability)
P-SMAD2	phosphoryliertes Mitglied 2 der SMAD Familie
P-SMAD3	phosphoryliertes Mitglied 3 der SMAD Familie
PAB	Pulmonalarterienstenose (engl. pulmonary artery banding)
PAH	pulmonal-arterielle Hypertonie
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PCH	pulmonal kapilläre Hämangiomatose (engl. pulmonary capillary
	hemangiomatosis)
PDGF	thrombozytärer Wachstumsfaktor (engl. platelet-derived growth
	factor)
PDE-5	Phosphodiesterase-5

PH	pulmonale Hypertonie
pH-Wert	Maß für die saure / alkalische Reaktion einer wässrigen Lösung,
	"Gewicht (lat. <i>pondus, p</i>) des Wasserstoffs (lat. <i>hydrogenium, H</i>)"
Placebo	PAB-Kontrollgruppe mit Verabreichung einer Trägersubstanz aus
	Ethanol, verdünnter HCI und deionisiertem Wasser
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPHN	persistierende pulmonale Hypertonie des Neugeborenen
PVOD	pulmonal veno-okklusive Erkrankung (engl. pulmonary veno-
	occlusive disease)
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (engl. quantitative
	realtime polymerase chain reaction)
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RCF	kardiale Rattenfibroblasten (engl. rat cardiac fibroblasts)
RT	Raumtemperatur (ca. 22 °C)
RV	rechter Herzventrikel
RV / Tibia	Verhältnis von Gewicht des RV zu Tibialänge als Maß für die RVH
RVH	rechtsventrikuläre Hypertrophie
RVP _{sys}	systolischer Blutdruck des RV (engl. systolic right ventricular
	pressure)
SB204741	Wirkstoffgruppe mit SB204741-Konzentrationen von 5 mg/kg KG
	täglich bzw. 100, 500 nM oder 1 μM
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler (engl. standard error of the mean)
sGC	lösliche Guanylatzyklase (engl. soluble guanylate cyclase)
Sham	Kontrollgruppe nach Scheinoperation (engl. sham-operation)
SMAD	Proteinfamilie bestehend aus Homologen des Proteins MAD
	(engl. mother against decapentaplegic) der Taufliege Drosophila
	und des Proteins SMA des Fadenwurms Caenorhabditis elegans
SMAD2	Mitglied 2 der SMAD-Familie
SMAD2/3	Mitglieder 2 und 3 der SMAD-Familie

SMAD4	Mitglied 4 der SMAD-Familie
SMAD9	Mitglied 9 der SMAD-Familie
Src	Kinase aus der gleichnamigen, nach dem Rous-Sarkom-Virus
	benannten Familie
TBS	TRIS gepufferte Salzlösung (engl. TRIS buffered saline)
TBST	Lösung aus TBS und Tween 20
TCA	Trichloressigsäure (engl. trichloroacetic acid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tergurid	Wirkstoffgruppe mit Tergurid-Konzentrationen von 0,2 mg/kg KG
	bid bzw. 100, 500 nM oder 1 μM
TGF-β-R	transformierender Wachstumsfaktor β Rezeptor (engl.
	transforming growth factor β receptor), z. B. transformierender
	Wachstumsfaktor β Rezeptor Typ I (TGF-β-RI)
TGF-β₁	transformierender Wachstumsfaktor β_1 (engl. <i>transforming growth</i>
	factor β_1)
TGF-β₁	Wirkstoffgruppe mit TGF- β_1 -Konzentrationen von 5 oder 10 ng/ml
	GM
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u	atomare Masseneinheit (engl. atomic mass unit)
U.	und
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich (engl. United Kingdom)
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. United States of America)
USW.	und so weiter
v. a.	vor allem
WNT3A	Mitglied 3A der Familie vom Typ der flügellosen Maus-
	Mammatumorvirus-Integrationsstellen (engl. wingless-type mouse
	mammary tumor virus integration site family member 3A)
x	-fach konzentriert
z. B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von Serotonin	7
Abbildung 2: Versuchsaufbau der Tierexperimente	23
Abbildung 3: Adulte, kardiale Rattenfibroblasten in BM	25
Abbildung 4: Hypertrophie-Kennzahl und Hämodynamik des RV	46
Abbildung 5: mRNA-Expression von 5-HTR2A und 5-HTR2B im RV	47
Abbildung 6: Überblick über die Proteinexpression der 5-HTR-Gene im RV	47
Abbildung 7: mRNA-Expression von ACTA2 und ACTC1 im RV	48
Abbildung 8: mRNA-Expression von ANP und BNP im RV	49
Abbildung 9: mRNA-Expression von MYH6, MYH7 und CCND1 im RV	50
Abbildung 10: mRNA-Expression von COL1A1 und COL1A2 im RV	51
Abbildung 11: mRNA-Expression von COL2A1 und COL3A1 im RV	52
Abbildung 12: Ablagerung an Gesamtkollagen im RV	53
Abbildung 13: Gehalt an Gesamtkollagen im RV	54
Abbildung 14: Ablagerung an Kollagen Typ I und III im RV	55
Abbildung 15: Gehalt an Kollagen Typ I und III im RV	55
Abbildung 16: Überblick über die Proteinexpression der SMAD-Gene in RCF	56
Abbildung 17: Proteinexpression von SMAD2 und P-SMAD2 in RCF	57
Abbildung 18: mRNA-Expression von ACTA2, ACTC1, ANP, BNP, CCND1	
und CILP in RCF unter TGF- β_1	58
Abbildung 19: mRNA-Expression von COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1,	
COL4A1 und COL8A1 in RCF unter TGF- β_1	59
Abbildung 20: Kollagengehalt des Mediums unter TGF- β_1	60
Abbildung 21: mRNA-Expression von 5-HTR2A und 5-HTR2B in RCF unter	
Tergurid	61
Abbildung 22: mRNA-Expression von ACTA2, ACTC1, ANP, BNP, CCND1	
und CILP in RCF unter Tergurid	63
Abbildung 23: mRNA-Expression von COL1A1, COL1A2, COL2A1, COL3A1,	
COL4A1 und COL8A1 in RCF unter Tergurid	64
Abbildung 24: Überblick über die Proteinexpression von α-SMA in RCF	65
Abbildung 25: Kollagengehalt von Medium und RCF unter Tergurid	66
Abbildung 26: Proliferation der RCF	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Klassifikation der PH (Nizza, 2013)	2
Tabelle 2: Chemikalien, Reagenzien und Wirkstoffe	13
Tabelle 3: Kits	14
Tabelle 4: Primärantikörper	16
Tabelle 5: Sekundärantikörper	16
Tabelle 6: Maus-Primersequenzen	17
Tabelle 7: Ratten-Primersequenzen	18
Tabelle 8: Geräte	19
Tabelle 9: Sonstige Materialien	20
Tabelle 10: cDNA Reaktionsgemisch A	31
Tabelle 11: cDNA Reaktionsgemisch B	31
Tabelle 12: qRT-PCR Reaktionsgemisch	32
Tabelle 13: qRT-PCR Programm	33
Tabelle 14: 5 x SDS Probenpuffer	35
Tabelle 15: Laufpuffer	36
Tabelle 16: Blotting-Puffer	36
Tabelle 17: 10%iges Trenngel	37
Tabelle 18: 6%iges Sammelgel	37
Tabelle 19: SDS-PAGE Proteingehalt	37
Tabelle 20: mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene im RV	
unter Tergurid	111
Tabelle 21: mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene im RV	
unter SB204741	111
Tabelle 22: mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene in RCF	
unter TGF- β_1	112
Tabelle 23: mRNA-Expression der 5-HTR-, Hypertrophie- und Fibrosegene in	
RCF unter Tergurid	112
Tabelle 24: Proliferation der RCF	113

Literaturverzeichnis

Adiarto S, Heiden S, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Yagi K, Yanagisawa M, Emoto N. ET-1 from endothelial cells is required for complete angiotensin II-induced cardiac fibrosis and hypertrophy. *Life Sci.* 2012;91(13-14):651-657.

Almeda FQ, Kavinsky CJ, Pophal SG, Klein LW. Pulmonic valvular stenosis in adults: diagnosis and treatment. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;60(4):546-557.

Anderson AS, Krauss D, Lang R. Cardiovascular complications of malignant carcinoid disease. *Am. Heart J.* 1997;134(4):693-702.

Anderson JR, Nawarskas JJ. Pharmacotherapeutic management of pulmonary arterial hypertension. *Cardiol Rev.* 2010;18(3):148-162.

Antoniu SA. Terguride for pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin. Ther. Targets*. 2011;15(11):1333-1335.

Arif SA, Poon H. Tadalafil: a long-acting phosphodiesterase-5 inhibitor for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Clin Ther*. 2011;33(8):993-1004.

Baliga RS, MacAllister RJ, Hobbs AJ. New perspectives for the treatment of pulmonary hypertension. *Br. J. Pharmacol.* 2011;163(1):125-140.

Bartelds B, Borgdorff MA, Smit-van Oosten A, Takens J, Boersma B, Nederhoff MG, Elzenga NJ, van Gilst WH, Windt LJ de, Berger RMF. Differential responses of the right ventricle to abnormal loading conditions in mice: pressure vs. volume load. *Eur. J. Heart Fail.* 2011;13(12):1275-1282.

Batman AM, Munzar P, Beardsley PM. Attenuation of nicotine's discriminative stimulus effects in rats and its locomotor activity effects in mice by serotonergic 5-HT2A/2C receptor agonists. *Psychopharmacology (Berl.)*. 2005;179(2):393-401.

Bauer EP, Kuki S, Zimmermann R, Schaper W. Upregulated and downregulated transcription of myocardial genes after pulmonary artery banding in pigs. *Ann. Thorac. Surg.* 1998;66(2):527-531.

Benisty JI, McLaughlin VV, Landzberg MJ, Rich JD, Newburger JW, Rich S, Folkman J. Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest.* 2004;126(4):1255-1261.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* 2009;60:355-366.

Bishop JE, Laurent GJ. Collagen turnover and its regulation in the normal and hypertrophying heart. *Eur. Heart J.* 1995;16:38-44.

Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc. Res.* 1999;42(1):27-44.

Bishop JE, Rhodes S, Laurent GJ, Low RB, Stirewalt WS. Increased collagen synthesis and decreased collagen degradation in right ventricular hypertrophy induced by pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 1994;28(10):1581-1585.

Bjørnstad JL, Skrbic B, Marstein HS, Hasic A, Sjaastad I, Louch WE, Florholmen G, Christensen G, Tønnessen T. Inhibition of SMAD2 phosphorylation preserves cardiac function during pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 2012;93(1):100-110.

Black FM, Packer SE, Parker TG, Michael LH, Roberts R, Schwartz RJ, Schneider MD. The vascular smooth muscle alpha-actin gene is reactivated during cardiac hypertrophy provoked by load. *J. Clin. Invest.* 1991;88(5):1581-1588.

Bogaard HJ, Abe K, Vonk Noordegraaf A, Voelkel NF. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest*. 2009;135(3):794-804.

Budev MM, Arroliga AC, Wiedemann HP, Matthay RA. Cor pulmonale: an overview. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003;24(3):233-244.

Burch ML, Osman N, Getachew R, Al-Aryahi S, Poronnik P, Zheng W, Hill MA, Little PJ. G protein coupled receptor transactivation: extending the paradigm to include serine/threonine kinase receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012;44(5):722-727.

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1992;(282):250-272.

Busk PK, Bartkova J, Strøm CC, Wulf-Andersen L, Hinrichsen R, Christoffersen TEH, Latella L, Bartek J, Haunsø S, Sheikh SP. Involvement of cyclin D activity in left ventricle hypertrophy in vivo and in vitro. *Cardiovasc. Res.* 2002;56(1):64-75.

Butt RP, Laurent GJ, Bishop JE. Collagen production and replication by cardiac fibroblasts is enhanced in response to diverse classes of growth factors. *Eur. J. Cell Biol.* 1995;68(3):330-335.

Calvieri C, Rubattu S, Volpe M. Molecular mechanisms underlying cardiac antihypertrophic and antifibrotic effects of natriuretic peptides. *J. Mol. Med.* 2012;90(1):5-13.

Carthy JM, Garmaroudi FS, Luo Z, McManus BM. Wnt3a induces myofibroblast differentiation by upregulating TGF- β signaling through SMAD2 in a β -catenin-dependent manner. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e19809.

Catalán M, Smolic C, Contreras A, Ayala P, Olmedo I, Copaja M, Boza P, Vivar R, Avalos Y, Lavandero S, Velarde V, Díaz-Araya G. Differential regulation of collagen secretion by kinin receptors in cardiac fibroblast and myofibroblast. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012;261(3):300-308.

Centurión D, Mehotra S, Sánchez-López A, Gupta S, MaassenVanDenBrink A, Villalón CM. Potential vascular alpha1-adrenoceptor blocking properties of an array of 5-HT receptor ligands in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2006;535(1-3):234-242.

Chapman D, Weber KT, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ. Res.* 1990;67(4):787-794.

Chatterjee S. Pulmonary hypertension in systemic sclerosis. *Semin. Arthritis Rheum.* 2011;41(1):19-37.

Corte TJ, McDonagh TA, Wort SJ. Pulmonary hypertension in left heart disease: a review. *Int. J. Cardiol.* 2012;156(3):253-258.

Costagliola C, Iuliano G, Rinaldi M, Russo V, Scibelli G, Mastropasqua L. Effect of topical ketanserin administration on intraocular pressure. *Br J Ophthalmol*. 1993;77(6):344-348.

Dahal BK, Cornitescu T, Tretyn A, Pullamsetti SS, Kosanovic D, Dumitrascu R, Ghofrani HA, Weissmann N, Voswinckel R, Banat G, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010;181(2):158-167.

Debold EP, Saber W, Cheema Y, Bookwalter CS, Trybus KM, Warshaw DM, Vanburen P. Human actin mutations associated with hypertrophic and dilated cardiomyopathies demonstrate distinct thin filament regulatory properties in vitro. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;48(2):286-292.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray J, Ponikowski P, Poole-Wilson P, Stromberg A, van V, Atar D, Hoes A, Keren A, Mebazaa A, Nieminen M, Priori S, Swedberg K, Vahanian A, Camm J, De C, Dean V, Funck-Brentano C, Hellemans I, Kristensen S, McGregor K, Sechtem U, Silber S, Tendera M, Widimsky P, Zamorano J. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J*. 2008;29(19):2388-2442.

Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF)-β signaling in cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011;51(4):600-606.

Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Reed SI, Arnold A, Weinberg RA. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 1993;73(3):499-511.

Drake JI, Bogaard HJ, Mizuno S, Clifton B, Xie B, Gao Y, Dumur CI, Fawcett P, Voelkel NF, Natarajan R. Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2011;45(6):1239-1247.

Dumitrascu R, Kulcke C, Königshoff M, Kouri F, Yang X, Morrell N, Ghofrani HA, Weissmann N, Reiter R, Seeger W, Grimminger F, Eickelberg O, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. Respir. J.* 2011;37(5):1104-1118.

Eghbali M, Tomek R, Sukhatme VP, Woods C, Bhambi B. Differential effects of transforming growth factor-beta 1 and phorbol myristate acetate on cardiac fibroblasts. Regulation of fibrillar collagen mRNAs and expression of early transcription factors. *Circ. Res.* 1991;69(2):483-490.

Engelen M, Besche B, Lefay M, Hare J, Vlaminck K. Effects of ketanserin on hypergranulation tissue formation, infection, and healing of equine lower limb wounds. *Can. Vet. J.* 2004;45(2):144-149.

Fang Y, Piao L, Hong Z, Toth PT, Marsboom G, Bache-Wiig P, Rehman J, Archer SL. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. *J. Mol. Med.* 2012;90(1):31-43.

Forbes IT, Jones GE, Murphy OE, Holland V, Baxter GS. N-(1-methyl-5-indolyl)-N'-(3-methyl-5-isothiazolyl)urea: a novel, high-affinity 5-HT2B receptor antagonist. *J. Med. Chem.* 1995;38(6):855-857.

Galiè N, Hoeper MM, Humbert M, Torbicki A, Vachiery J, Barbera JA, Beghetti M, Corris P, Gaine S, Gibbs JS, Gomez-Sanchez MA, Jondeau G, Klepetko W, Opitz C, Peacock A, Rubin L, Zellweger M, Simonneau G. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* 2009;30(20):2493-2537.

Gershon MD, Tack J. The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*. 2007;132(1):397-414.

Geschka S, Kretschmer A, Sharkovska Y, Evgenov OV, Lawrenz B, Hucke A, Hocher B, Stasch J. Soluble guanylate cyclase stimulation prevents fibrotic tissue remodeling and improves survival in salt-sensitive Dahl rats. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e21853.

Ghofrani HA, Al-Hiti H, Vonk-Noordegraaf A, Behr J, Neurohr C, Jansa P, Wilkens H, Hoeper MM, Gruenig E, Opitz C, Speich R, Ewert R, Halank M, Torbicki A, Kaehler C, Olschewski H, Filusch A, Reiter R, Rosenkranz S. Proof-Of-Concept Study To Investigate The Efficacy, Hemodynamics And Tolerability Of Terguride Vs. Placebo In Subjects With Pulmonary Arterial Hypertension: Results Of A Double Blind, Randomised, Prospective Phase IIa Study. *American Thoracic Society 2012 International Conference*. San Francisco, USA; 18.-23. Mai 2012:A2496.

Ghofrani HA, Pepke-Zaba J, Barbera JA, Channick R, Keogh AM, Gomez-Sanchez MA, Kneussl M, Grimminger F. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):68S-72S.

Gomberg-Maitland M, Olschewski H. Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 2008;31(4):891-901.

Griffiths M, Sundaram H. Drug design and testing: profiling of antiproliferative agents for cancer therapy using a cell-based methyl-[3H]-thymidine incorporation assay. *Methods Mol. Biol.* 2011;731:451-465.

Grimminger F, Schermuly RT, Ghofrani HA. Targeting non-malignant disorders with tyrosine kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(12):956-970.

Gustafsen J, Lendorf A, Raskov H, Boesby S. Ketanserin versus placebo in carcinoid syndrome. A clinical controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.* 1986;21(7):816-818.

Gustafsson BI, Hauso O, Drozdov I, Kidd M, Modlin IM. Carcinoid heart disease. *Int. J. Cardiol.* 2008;129(3):318-324.

Gustafsson BI, Tømmerås K, Nordrum I, Loennechen JP, Brunsvik A, Solligård E, Fossmark R, Bakke I, Syversen U, Waldum H. Long-term serotonin administration induces heart valve disease in rats. *Circulation*. 2005;111(12):1517-1522.

Haddad F, Kudelko K, Mercier O, Vrtovec B, Zamanian R, de J. Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies. *Prog Cardiovasc Dis*. 2011;54(2):154-167.

He J, Chen S, Huang Y, Chen Y, Dong Y, Ma H. The nonpeptide AVE0991 attenuates myocardial hypertrophy as induced by angiotensin II through downregulation of transforming growth factor-beta1/Smad2 expression. *Heart Vessels*. 2010;25(5):438-443.

Herold G. Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die ärztliche Prüfung ; mit ICD-10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold; 2009:480-482.

Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.

Hutcheson JD, Setola V, Roth BL, Merryman WD. Serotonin receptors and heart valve disease--it was meant 2B. *Pharmacol. Ther.* 2011;132(2):146-157.

Inman GJ, Nicolás FJ, Hill CS. Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3, and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity. *Mol. Cell*. 2002;10(2):283-294.

Jaffré F, Bonnin P, Callebert J, Debbabi H, Setola V, Doly S, Monassier L, Mettauer B, Blaxall BC, Launay J, Maroteaux L. Serotonin and angiotensin receptors in cardiac fibroblasts coregulate adrenergic-dependent cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2009;104(1):113-123.

Janssen W, Schymura Y, Luitel H, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Reiter R, Seeger W, Schermuly RT. Combined Inhibition Of 5-HT2a And 5-HT2breceptor Ameliorates Myocardial Hypertrophy And Diastolic Dysfunction In The Pressure Overloaded Right Heart. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2010;181(1_MeetingAbstracts):A6589.

Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978;41(3):267-274.

Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry*. 1982;74(1):153-156.
Katz WE, Gasior TA, Quinlan JJ, Lazar JM, Firestone L, Griffith BP, Gorcsan J. Immediate effects of lung transplantation on right ventricular morphology and function in patients with variable degrees of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1996;27(2):384-391.

Kekewska A, Görnemann T, Jantschak F, Glusa E, Pertz HH. Antiserotonergic properties of terguride in blood vessels, platelets, and valvular interstitial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012;340(2):369-376.

Khan R, Sheppard R. Fibrosis in heart disease: understanding the role of transforming growth factor-beta in cardiomyopathy, valvular disease and arrhythmia. *Immunology*. 2006;118(1):10-24.

Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, Ghofrani HA, Grimminger F, Busch AE, Schäfer S. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation*. 2008;118(20):2081-2090.

Königshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Eickelberg O. Increased expression of 5-hydroxytryptamine2A/B receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax*. 2010;65(11):949-955.

Koolman J, Röhm K. *Taschenatlas Biochemie des Menschen.* 4. Aufl. Stuttgart, New York, USA: Thieme; 2009:242.

Kreymborg KG, Uchida S, Gellert P, Schneider A, Boettger T, Voswinckel R, Wietelmann A, Szibor M, Weissmann N, Ghofrani AH, Schermuly R, Schranz D, Seeger W, Braun T. Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;49(4):598-605.

Krowka MJ. Portopulmonary hypertension. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33(1):17-25.

Kulke MH, Mayer RJ. Carcinoid tumors. N. Engl. J. Med. 1999;340(11):858-868.

Lang G. *Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik.* 2. Aufl. Wien, Österreich: Springer; 2013:169-250.

Law BA, Carver WE. Activation of Cardiac Fibroblasts by Ethanol Is Blocked by TGF-β Inhibition. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2013;37(8):1286-1294.

Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc. Res.* 2007;74(2):207-212.

Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J.* 2004;18(7):816-827.

Lei B, Hitomi H, Mori T, Nagai Y, Deguchi K, Mori H, Masaki T, Nakano D, Kobori H, Kitaura Y, Nishiyama A. Effect of efonidipine on TGF-β1-induced cardiac fibrosis through Smad2-dependent pathway in rat cardiac fibroblasts. *J. Pharmacol. Sci.* 2011;117(2):98-105.

Li F, Zeng B, Chai Y, Cai P, Fan C, Cheng T. The linker region of Smad2 mediates TGF-beta-dependent ERK2-induced collagen synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009;386(2):289-293.

Lijnen PJ, Petrov VV, Turner M, Fagard RH. Collagen production in cardiac fibroblasts during inhibition of aminopeptidase B. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2005;6(2):69-77.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeyer TJ, Quaife RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J. Clin. Invest.* 1997;100(9):2315-2324.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265-275.

Machado RD, Eickelberg O, Elliott CG, Geraci MW, Hanaoka M, Loyd JE, Newman JH, Phillips JA, Soubrier F, Trembath RC, Chung WK. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54(1 Suppl):S32-42.

Massagué J. How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000;1(3):169-178.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 2005;19(23):2783-2810.

Meltzer HY, Roth BL. Lorcaserin and pimavanserin: emerging selectivity of serotonin receptor subtype-targeted drugs. *J. Clin. Invest.* 2013;123(12):4986-4991.

Miao C, Xie H, Yu H, Chu Z, Su D. Ketanserin stabilizes blood pressure in conscious spontaneously hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2003;30(3):189-193.

Modlin IM, Sandor A. An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors. *Cancer*. 1997;79(4):813-829.

Morán A, Ortiz de Urbina A, Martín M, García M, Rodriguez-Barbero A, Dorado F, San Román L. Characterization of contractile 5-hydroxytryptamine receptor subtypes in the in situ autoperfused kidney in the anaesthetized rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2008;592(1-3):133-137.

Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54(1 Suppl):S20-31.

Nebigil CG, Jaffré F, Messaddeq N, Hickel P, Monassier L, Launay J, Maroteaux L. Overexpression of the serotonin 5-HT2B receptor in heart leads to abnormal mitochondrial function and cardiac hypertrophy. *Circulation*. 2003;107(25):3223-3229.

Newman-Tancredi A, Cussac D, Audinot V, Nicolas J, Ceuninck F de, Boutin J, Millan MJ. Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. II. Agonist and antagonist properties at subtypes of dopamine D(2)-like receptor and alpha(1)/alpha(2)-adrenoceptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;303(2):805-814.

Palaniswamy C, Frishman WH, Aronow WS. Carcinoid heart disease. *Cardiol Rev.* 2012;20(4):167-176.

Peacock JD, Lu Y, Koch M, Kadler KE, Lincoln J. Temporal and spatial expression of collagens during murine atrioventricular heart valve development and maintenance. *Dev. Dyn.* 2008;237(10):3051-3058.

Pelouch V, Kolar F, Ost'adal B, Milerova M, Cihak R, Widimsky J. Regression of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and fibrosis: effect of enalapril. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1997;11(2):177-185.

Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2008;178(1):81-88.

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Transforming growth factor-beta(1) induces angiotensin-converting enzyme synthesis in rat cardiac fibroblasts during their differentiation to myofibroblasts. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2000;1(4):342-352.

Petrov VV, Fagard RH, Lijnen PJ. Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension*. 2002;39(2):258-263.

Piao L, Fang Y, Cadete VJJ, Wietholt C, Urboniene D, Toth PT, Marsboom G, Zhang HJ, Haber I, Rehman J, Lopaschuk GD, Archer SL. The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: resuscitating the hibernating right ventricle. *J. Mol. Med.* 2010;88(1):47-60.

Pithadia AB, Jain SM. 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes and their Modulators with Therapeutic Potentials. *J Clin Med Res*. 2009;1(2):72-80.

Porter KE, Turner NA. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol. Ther.* 2009;123(2):255-278.

Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol.* 2009;(191):341-366.

Pullamsetti SS, Berghausen EM, Dabral S, Tretyn A, Butrous E, Savai R, Butrous G, Dahal BK, Brandes RP, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rosenkranz S, Schermuly RT. Role of SRC tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(6):1354-1365.

Pullamsetti SS, Schermuly R, Ghofrani A, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Novel and emerging therapies for pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014;189(4):394-400.

Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 1948;176(3):1243-1251.

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol. Ther.* 2001;92(2-3):179-212.

Reid MR. Partial occlusion of the pulmonary aorta and inferior vena cava with the metallic band. Observations on changes in the vessel wall and in the heart. *J. Exp. Med.* 1924;40(3):289-291.

Reinard T. *Molekularbiologische Methoden: 41 Tabellen*. Stuttgart: Eugen Ulmer; 2010:79-102.

Reinard T. *Molekularbiologische Methoden: 41 Tabellen*. Stuttgart: Eugen Ulmer; 2010:195-216.

Ritchie M, Waggoner AD, Dávila-Román VG, Barzilai B, Trulock EP, Eisenberg PR. Echocardiographic characterization of the improvement in right ventricular function in patients with severe pulmonary hypertension after single-lung transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1993;22(4):1170-1174.

Rockman HA, Ono S, Ross RS, Jones LR, Karimi M, Bhargava V, Ross J, Chien KR. Molecular and physiological alterations in murine ventricular dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(7):2694-2698.

Rosenkranz S. Neue Konzepte in der Pathogenese der pulmonal arteriellen Hypertonie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2008;133 Suppl 6:S167-9.

Rosenkranz S. Pulmonale Hypertonie. In: Erdmann E, Hrsg. *Klinische Kardiologie*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2011:309-334.

Roth BL. Drugs and valvular heart disease. N. Engl. J. Med. 2007;356(1):6-9.

Roth BL, Willins DL, Kristiansen K, Kroeze WK. 5-Hydroxytryptamine2-family receptors (5-hydroxytryptamine2A, 5-hydroxytryptamine2B, 5-hydroxytryptamine2C): where structure meets function. *Pharmacol. Ther.* 1998;79(3):231-257.

Ruiz-Ortega M, Rodríguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc. Res.* 2007;74(2):196-206.

Santiago J, Dangerfield AL, Rattan SG, Bathe KL, Cunnington RH, Raizman JE, Bedosky KM, Freed DH, Kardami E, Dixon IMC. Cardiac fibroblast to myofibroblast differentiation in vivo and in vitro: expression of focal adhesion components in neonatal and adult rat ventricular myofibroblasts. *Dev. Dyn.* 2010;239(6):1573-1584.

Schäfer S, Ellinghaus P, Janssen W, Kramer F, Lustig K, Milting H, Kast R, Klein M. Chronic inhibition of phosphodiesterase 5 does not prevent pressure-overload-induced right-ventricular remodelling. *Cardiovasc. Res.* 2009;82(1):30-39.

Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8(8):443-455.

Schermuly RT, Janssen W, Weissmann N, Stasch J, Grimminger F, Ghofrani HA. Riociguat for the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opin Investig Drugs*. 2011;20(4):567-576.

Schmidt H, Rothämel S. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: Jansohn M, Hrsg. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer; 2011:135-171.

Schuster N, Krieglstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2002;307(1):1-14.

Shingala JR, Balaraman R. Antihypertensive effect of 5-HT1A agonist buspirone and 5-HT2B antagonists in experimentally induced hypertension in rats. *Pharmacology*. 2005;73(3):129-139.

Shyu K. Serotonin 5-HT2B receptor in cardiac fibroblast contributes to cardiac hypertrophy: a new therapeutic target for heart failure? *Circ. Res.* 2009;104(1):1-3.

Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez, Miguel Angel, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.

Simonneau G, Robbins I, Beghetti M, Channick R, Delcroix M, Denton C, Elliott C, Gaine S, Gladwin M, Jing Z, Krowka M, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(1 Suppl):S43-54.

Sitbon O, Morrell N. Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *Eur Respir Rev.* 2012;21(126):321-327.

Spender LC, O'Brien DI, Simpson D, Dutt D, Gregory CD, Allday MJ, Clark LJ, Inman GJ. TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL. *Cell Death Differ.* 2009;16(4):593-602.

Sweat F, Puchtler H, Rosenthal SI. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Arch Pathol.* 1964;78:69-72.

Sztrymf B, Yaïci A, Girerd B, Humbert M. Genes and pulmonary arterial hypertension. *Respiration*. 2007;74(2):123-132.

Tang Q, Li Z, Li W, Guo J, Sun H, Zhang X, Lau C, Tse H, Zhang S, Li G. The 5-HT2 antagonist ketanserin is an open channel blocker of human cardiac ether-à-go-go-related gene (hERG) potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 2008;155(3):365-373.

Thal SC, Wyschkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C. Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice. *J. Neurotrauma*. 2008;25(7):785-794.

Urashima T, Zhao M, Wagner R, Fajardo G, Farahani S, Quertermous T, Bernstein D. Molecular and physiological characterization of RV remodeling in a murine model of pulmonary stenosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2008;295(3):H1351-H1368.

van de Woestijne PC, Klompe L, de Jong PL, Peters TH, Kappetein AP, Sharma HS, Bogers AJ. Assessment of right ventricular fibrosis in different forms of pulmonary atresia with ventricular septal defect. *Exp Clin Cardiol*. 2004;9(3):187-192.

van Wolferen SA, Marcus JT, Westerhof N, Spreeuwenberg MD, Marques KM, Bronzwaer JG, Henkens IR, Gan CT, Boonstra A, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A. Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur Heart J*. 2008;29(1):120-127.

Venitz J, Zack J, Gillies H, Allard M, Regnault J, Dufton C. Clinical pharmacokinetics and drug-drug interactions of endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Pharmacol*. 2012;52(12):1784-1805.

Watson J, Baker T, Bell S, Gann A, Levine M, Losick R. *Watson Molekularbiologie*.6. Aufl., 1. dt. Ausg. München: Pearson Studium; 2011:803-848.

Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ. Res.* 1988;62(4):757-765.

Yabanoglu S, Akkiki M, Seguelas M, Mialet-Perez J, Parini A, Pizzinat N. Platelet derived serotonin drives the activation of rat cardiac fibroblasts by 5-HT2A receptors. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009;46(4):518-525.

Yakovlev DS, Spasov AA, Mal'tsev DV, Anisimova VA. Effect of 5-HT2A Receptor Antagonists on Blood Flow in the Carotid Vessels upon Elevation of Serotonin Level. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;157(3):350-352.

Yamada J, Sugimoto Y, Yoshikawa T, Horisaka K. Hyperglycemia induced by the 5-HT receptor agonist, 5-methoxytryptamine, in rats: involvement of the peripheral 5-HT2A receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 1997;323(2-3):235-240.

Anhang

Ergebnisse im Detail

Gen	Relative mRNA-Genexpression als MW (SEM-Intervall) [% von Sham]			
	Sham	Placebo	Tergurid	
ACTA2	100 (78-128) **	41 (37-45)	49 (44-55)	
ACTC1	100 (86-116)	127 (110-148)	142 (126-160)	
ANP	100 (77-130) ***	3204 (2637-3892)	1124 (860-1468) *	
BNP	100 (78-129) ***	684 (583-802)	696 (506-957)	
MYH6	100 (72-139) *	28 (23-35)	37 (30-45)	
MYH7	100 (88-114) ***	1912 (1640-2230)	743 (426-1295)	
CCND1	100 (83-121)	95 (85-106)	73 (63-85)	
COL1A1	100 (85-118) ***	480 (434-530)	178 (133-239) **	
COL1A2	100 (85-117) ***	446 (420-473)	159 (121-211) **	
COL2A1	100 (87-115) *	336 (275-411)	93 (57-150) *	
COL3A1	100 (78-128) *	406 (340-485)	293 (199-433)	

Tabelle 20: mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene im RV unter Tergurid

qRT-PCR-Werte normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 5-6, Gruppenunterschiede markiert mit * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$ vs. Placebo

Gen	Relative mRNA-Genexpression als MW (SEM-Intervall) [% von Sham]			
	Sham	Placebo	SB204741	
ACTA2	100 (91-110)	121 (108-136)	100 (77-131)	
ACTC1	100 (94-107)	88 (84-94)	76 (65-89)	
ANP	100 (88-114) ***	1481 (1252-1753)	1644 (1222-2211)	
BNP	100 (83-121) ***	1334 (1145-1554)	1283 (1087-1515)	
MYH6	100 (94-106) ***	45 (40-49)	83 (71-97) ***	
MYH7	100 (83-120) ***	1984 (1640-2398)	1819 (1294-2558)	
CCND1	100 (92-109)	134 (123-147)	117 (90-153)	
COL1A1	100 (93-108) ***	699 (640-763)	491 (293-823)	
COL1A2	100 (95-106) ***	669 (591-758)	508 (341-756)	
COL2A1	100 (91-110) ***	570 (454-715)	494 (367-666)	
COL3A1	100 (95-106) **	529 (495-564)	380 (232-621)	

Tabelle 21: mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene im RV unter SB204741

qRT-PCR-Werte normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 8, Gruppenunterschiede markiert mit ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$ vs. Placebo

Gen	Relative mRNA-Genexpression als MW (SEM-Intervall) [% von -FCS]			
	-FCS	TGF-β₁ 5	TGF-β₁ 10	
ACTA2	100 (95-106)	100 (92-109)	108 (96-122)	
ACTC1	100 (93-107)	104 (98-112)	71 (68-75) **	
ANP	100 (83-121)	101 (76-134)	157 (127-194)	
BNP	100 (96-104)	152 (125-184)	101 (91-112)	
CCND1	100 (88-114)	49 (47-52) **	36 (34-38) ***	
COL1A1	100 (76-132)	49 (41-58)	104 (95-114)	
COL1A2	100 (97-103)	64 (62-67) ***	98 (95-101)	
COL2A1	100 (87-115)	67 (62-73) *	140 (137-144) *	
COL3A1	100 (90-112)	46 (42-50) **	67 (64-70) *	
COL4A1	100 (95-106)	92 (85-99)	82 (77-87)	
COL8A1	100 (94-106)	117 (108-126)	78 (67-91)	
CILP	100 (82-122)	34 (28-41) **	24 (21-27) **	

Tabelle 22: mRNA-Expression der Hypertrophie- und Fibrosegene in RCF unter TGF-β₁

qRT-PCR-Werte normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$ vs. -FCS

	Relative mRNA-Genexpression als MW (SEM-Intervall) [% von -FCS]				
Gen	-FCS	Ethanol 100 nM	Tergurid 100 nM	Ethanol 1 μΜ	Tergurid 1 μΜ
5-HTR2A	100 (84-119) #	66 (62-70)	68 (56-83)	52 (48-57)	49 (48-51)
5-HTR2B	100 (92-108)	93 (87-99)	103 (90-117)	81 (72-91)	89 (86-93)
ACTA2	100 (89-112)	115 (105-126)	135 (121-150)	105 (98-113)	116 (112-121)
ACTC1	100 (84-120)	91 (80-103)	141 (115-174)	82 (70-97)	98 (87-111)
ANP	100 (63-159)	181 (111-295)	67 (51-88)	28 (11-71)	155 (122-198)
BNP	100 (82-122) * / #	36 (30-43)	38 (34-43)	44 (42-45)	167 (118-234) ##
CCND1	100 (93-108)	103 (95-110)	99 (90-110)	80 (75-87)	101 (100-101)
COL1A1	100 (72-139)	47 (41-54)	73 (56-95)	49 (44-54)	51 (46-57)
COL1A2	100 (96-104)	106 (105-108)	96 (87-106)	105 (99-111)	98 (95-100)
COL2A1	100 (94-106)	88 (80-98)	129 (121-137) *	95 (87-105)	86 (82-91)
COL3A1	100 (92-109)	109 (94-127)	115 (111-120)	111 (108-114)	91 (85-96)
COL4A1	100 (91-110)	94 (89-99)	93 (89-98)	93 (85-102)	95 (91-98)
COL8A1	100 (87-115)	70 (69-71)	88 (85-91)	80 (72-89)	84 (77-91)
CILP	100 (81-124)	87 (79-97)	142 (114-177)	85 (79-92)	72 (65-79)

Tabelle 23: mRNA-Expression der 5-HTR-, Hypertrophie- und Fibrosegene in RCF unter Tergurid

qRT-PCR-Werte normiert mit HPRT1, 25 ng cDNA / Probe, n = 3, Gruppenunterschiede markiert mit * p \leq 0,05 vs. Ethanol 100 nM, # p \leq 0,05, ## p \leq 0,01 vs. Ethanol 1 μ M

	Proliferation als MW ± SEM aus w Versuchen [% von +FCS]			
Gruppe	Tergurid-Versuche (w = 4)Ketanserin-Versuche (w = 6)		SB204741-Versuche (w = 3)	
-FCS	12,71 ± 1,05 *** / ### / †††	7,61 ± 1,08 *** / ### / †††	5,66 ± 0,27 *** / ### / †††	
+FCS	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0 *** / ### / †††	
Trägersubstanz 100 nM	101,17 ± 1,17	96,11 ± 2,35	95,67 ± 0,67	
Wirkstoff 100 nM	93,21 ± 1,43 **	87,74 ± 3,12 *	91,49 ± 0,48 ***	
Trägersubstanz 500 nM	99,55 ± 0,51	94,25 ± 1,90	96,21 ± 0,49	
Wirkstoff 500 nM	97,04 ± 1,53	85,64 ± 2,15 #	90,80 ± 0,63 ###	
Trägersubstanz 1 µM	96,60 ± 1,55	98,26 ± 1,15	95,20 ± 0,26	
Wirkstoff 1 µM	88,15 ± 1,55 †††	85,50 ± 2,77 ††	89,73 ± 0,30 †††	

Tabelle 24: Proliferation der RCF

Proliferationsassay-Werte aus mehreren Tergurid- (+FCS = 796,46 ± 30,65 Bq), Ketanserin- (+FCS = 788,83 ± 70,45 Bq) und SB204741-Versuchen (+FCS = 945,93 ± 15,76 Bq), Aktivitätswerte pro Versuch jeweils normiert auf den Gruppen-MW von +FCS, 30 000 ausgesäte Zellen / cm², n = 6 je Versuch, w = Anzahl an Versuchen, Wirkstoff-Trägersubstanz-Kombinationen bestehend aus Tergurid und Ethanol sowie Ketanserin bzw. SB204741 und DMSO, Gruppenunterschiede markiert mit * $p \le 0.05$, ** $p \le 0.01$, *** $p \le 0.001$ vs. Trägersubstanz 100 nM, # $p \le 0.05$, ### $p \le 0.001$ vs. Trägersubstanz 500 nM, †† $p \le 0.01$, ††† $p \le 0.001$ vs. Trägersubstanz 1 µM

Publikationsverzeichnis

Abstract

Krompiec DR, Janssen W, Savai Pullamsetti S, Schymura Y, Luitel H, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Reiter R, Seeger W, Schermuly RT. Terguride attenuates myocardial remodelling and diastolic dysfunction in the pressure overloaded right heart. *Pneumologie*. 2011;65(S 01).

Zugehöriges Kongressposter

Krompiec DR, Janssen W, Savai Pullamsetti S, Schymura Y, Luitel H, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Reiter R, Seeger W, Schermuly RT. Terguride attenuates myocardial remodelling and diastolic dysfunction in the pressure overloaded right heart. *52. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin*. Dresden; 7.-10. April 2011.

Publikation

Janssen W, Schymura Y, Novoyatleva T, Kojonazarov B, Boehm M, Wietelmann A, Luitel H, Murmann K, Krompiec DR, Tretyn A, Pullamsetti SS, Weissmann N, Seeger W, Ghofrani HA, Schermuly RT. 5-HT2B receptor antagonists inhibit fibrosis and protect from RV heart failure. *Biomed Res Int.* 2015;2015:438403.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen. die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder 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 Justuswissenschaftlicher Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter Praxis" eingehalten sowie ethische, niederaeleat sind. 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.

Gießen, den 10.08.2015

Damian Krompiec

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. T. Schermuly, Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik und Poliklinik II des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Unitersität Gießen für die Themenstellung der vorliegenden Arbeit, die zur Verfügung Stellung des Rahmens für die wissenschaftliche Tätigkeit sowie die konstruktiven, fachlich kompetenten Gespräche während der Betreuung bedanken.

Desweiteren danke ich meiner Betreuerin Frau Dr. S. Savai Pullamsetti für die exzellenten Ratschläge, kritischen Anmerkungen und unzähligen sachlichen Gespräche zu jeder Tageszeit.

Überdies möchte ich mich auch bei Frau Dr. W. Janssen sowie den Herren Dr. Y. Schymura und Dr. H. Luitel bedanken, die mich bei jeweils verschiedenen, speziellen Problemstellungen unterstützt haben.

Frau Dr. X. Tian und Herrn Dr. P. Sklepkiewicz danke ich für ihre fachliche Beratung und die damit einhergehenden, lehrreichen Diskussionen in unterschiedlichen Phasen der Entstehung meiner Arbeit.

Mein spezieller Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau K. Leib, Frau E. Jenike und Frau E. Bieniek für ihre ausgezeichnete Einarbeitung in die Arbeitsabläufe des Labors sowie die diversen Ratschläge bei der Durchführung der Experimente.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. J. Berk, Herrn Dr. P. K. Pamarthi, Herrn Dr. H. Al-Tamari, Frau Dr. A. Schmall, Herrn Dr. R. Savai, Frau Dr. A. Tretyn sowie allen bisher unerwähnten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schermuly, die mit ihrer lockeren, aber zielstrebigen Art für ein freundliches, professionelles und engagiertes Arbeitsklima gesorgt haben.

Zu guter Letzt möchte ich auch ganz besonders meinen Eltern, denen ich gleichzeitig meine Dissertation widme, sowie meinem Bruder Christoph danken, die mich während der Promotionsphase moralisch unterstützt haben.